

**Aromaten- und Chloraromatenabbau
durch *Pseudomonas* sp. Stamm B13:
3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase
und 3-OxoadipylCoA-Thiolase**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften des Fachbereiches Chemie
der Bergischen Universität – Gesamthochschule Wuppertal

vorgelegt von Bernd Kuhn
aus Hagen

Wuppertal, Juni 2002

Die vorliegende Dissertation entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Reineke am Institut für Chemische Mikrobiologie des Fachbereichs 9 der Bergischen Universität-Gesamthochschule Wuppertal in der Zeit vom Juli 1998 bis Juni 2002.

Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und durch die Europäische Union unter der Projektnummer BIO4-CT97-2040 gefördert.

Teile der Dissertation sind bereits publiziert:

KASCHABEK, S. R., KUHN, B., MÜLLER, D., SCHMIDT, E., REINEKE, W.: Degradation of aromatics and chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. strain B13: purification and characterization of 3-oxoadipate:succinyl-coenzyme A (CoA) transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase. *J. Bacteriol.* **184**, 207-215 (2002)

Danksagung

Herrn Professor Dr. Walter Reineke möchte ich in besonderer Weise danken für die Überlassung des interessanten Themas, die hilfreichen Diskussionen und Anregungen, sowie für seine großzügige Unterstützung und freundliche Geduld.

Weiterhin gilt mein Dank:

Herrn Privatdozent Dr. Eberhard Schmidt für die gute Zusammenarbeit, freundlich geleistete Unterstützung und die interessanten Anregungen.

Herrn Dr. Stefan Kaschabek für die freundliche Einweisung, die gute Zusammenarbeit, seine freundlich geleistete Unterstützung und die interessanten Anregungen.

Frau Müller und Herrn Dr. Elling, Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf, Außenstelle Jülich, für die Anfertigung der N-terminalen Aminosäuresequenzierung.

Frau Ilka Polanz für die Anfertigung der NMR-Spektren.

Frau Dipl.-Ing. Eva Smets für die Anfertigung der Massenspektren.

Herrn Dr. Axel Ligon für die Anfertigung der GC/MS-Spektren.

der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Reineke, namentlich: Frank, Markus (Cuno), Markus, Oliver und Kay für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

meiner Familie und meinen Freunden für Ihre Unterstützung, auch in schwierigen Zeiten.

Und nicht zuletzt gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe der Chemischen Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	X
Abstract.....	XI
1. Einleitung	1
1.1. Aerobes Abbau von Aromaten durch Bakterien.....	5
1.1.1. Der <i>ortho</i> -Weg aromatischer Kohlenwasserstoffe	7
1.1.2. Der „modifizierte“ <i>ortho</i> -Weg	9
1.2. Der Organismus <i>Pseudomonas</i> sp. Stamm B13	12
1.3. Aufgabenstellung.....	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Organismen.....	14
2.2. Stammerhaltung.....	14
2.3. Nährlösungen.....	15
2.4. Anzucht von Bakterienkulturen.....	16
2.5. Trübungsmessungen.....	17
2.6. Zellernte und Herstellung von Rohextrakt	17
2.7. Bestimmung des Proteingehalts	17
2.8. Bestimmung der Enzymaktivität	18
2.8.1. Maleylacetat-Reduktase (EC 1.3.1.32).....	18
2.8.2. Dienlacton-Hydrolase (EC 3.1.1.45)	19
2.8.3. 3-Oxo adipat-Enollacton-Hydrolase (EC 3.1.1.24)	19
2.8.4. 3-Oxo adipat:SuccinylCoA-Transferase (EC 2.8.3.6).....	20
2.8.5. 3-Oxo adipylCoA-Thiolase (EC 2.3.1.--).....	20
2.8.6. ATP und CoA-abhängiges 3-Oxo adipat umsetzendes Enzym	21
2.9. Enzymreinigungen.....	21
2.9.1. 3-Oxo adipat:SuccinylCoA-Transferase-Reinigung	22
2.9.1.1. Hitzefällung	22

	Seite
2.9.1.2. Ammoniumsulfat-Präzipitation.....	22
2.9.1.3. Phenyl-Sepharose CL-4B	
Hydrophobe Interaktionschromatographie	23
2.9.1.4. Ultrafiltration und Ultrafiltrations-Zentrifugation.....	23
2.9.1.5. Mono Q [®] Ionenaustauschchromatographie	24
2.9.1.6. Superose [®] 6 Gelfiltration.....	24
2.9.2. Lagerung der Transferasepräparation.....	24
2.9.3. 3-OxoadipylCoA-Thiolase-Reinigung	25
2.9.3.1. DEAE-Sepharose CL-6B Ionenaustauschchromatographie	25
2.9.3.2. Cibacron Blue 3G-A Agarose-Affinitätschromatographie.....	25
2.9.3.3. Reactive Brown 10 Agarose-Affinitätschromatographie	26
2.9.4. Lagerung der Thiolasepräparation.....	27
2.10. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.10.1. Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen.....	27
2.10.1.1. Färbung der Proteinbanden des SDS-Polyacrylamidgels	29
Silverstain-Färbung	29
Coomassie-Färbung.....	29
2.10.1.2. Molekulargewichtsbestimmung	30
2.10.2. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz von Proteinen	32
2.10.2.1. Elektroblothing nach KHYSER-ANDERSEN (1984).....	32
Amidoschwarzfärbung	33
2.11. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration.....	34
2.12. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	36
2.13. NMR-Spektroskopie	37
2.14. UV/VIS-Spektroskopie	37
2.15. Massenspektrometrie	37
2.16. Gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS)	38
2.17. pH-Bestimmung	38
2.18. Chloridbestimmung	38
2.19. Chemikalien.....	39
2.19.1. Darstellung von ChloracetylCoA.....	39
2.19.2. Darstellung einer etherischen Diazomethan-Lösung.....	40

	Seite
3. Experimente und Ergebnisse	41
3.1. Nachweis von CoA-Derivaten beim enzymatischen Umsatz substituierter 3-Oxoacidate mittels HPLC	42
3.1.1. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von 3-OxoacidipylCoA	45
3.2. Zur Synthese von Metaboliten des unteren 3-Oxoacidat-Weges.....	47
3.2.1. Darstellung von ChloracetylCoA.....	47
3.2.2. Darstellung von 3-OxoacidipylCoA.....	47
3.2.3. Darstellung von 2-Chlor-3-oxoacidat.....	48
3.2.3.1. Indirekter Nachweis von 2-Chlor-3-oxoacidat durch Derivatisierung.....	49
Darstellung von 5-Chlor-4-oxovaleriansäuremethylester	49
(= 5-Chlor-4-oxopentansäuremethylester)	
Darstellung von 5-Hydroxy-4-oxovaleriansäuremethylester	50
(= 5-Hydroxy-4-oxopentansäuremethylester)	
3.2.4. Darstellung von 4-Chlor-3-oxoacidat.....	51
3.2.5. Darstellung von 2-Methyl-3-oxoacidat	52
3.2.6. Darstellung von 4-Methyl-3-oxoacidat	52
3.3. Induktion von Enzymen des <i>ortho</i> - und des modifizierten <i>ortho</i> -Weges von <i>Pseudomonas</i> sp. B13	54
3.4. Reinigung und Charakterisierung der 3-Oxoacidat: Succinyl-CoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13	56
3.4.1. Reinigung der 3-Oxoacidat:SuccinylCoA-Transferase.....	56
3.4.1.1. Hitzefällung	56
3.4.1.2. Phenyl-Sepharose CL-4B Hydrophobe Interaktionschromatographie	56
3.4.1.3. Mono Q [®] Ionenaustauschchromatographie	58
3.4.1.4. Superose [®] 6 Gelfiltration.....	59

	Seite
3.4.2. Charakterisierung der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase.....	62
3.4.2.1. Enzymgröße.....	62
3.4.2.2. N-terminale Aminosäuresequenz der Enzym- Untereinheiten.....	63
3.4.2.3. pH-Optimum.....	63
3.4.2.4. Kinetische Daten	65
3.4.2.4.1. Reversibilität.....	67
3.4.2.5. Substratspektrum	68
Halogensubstituierte 3-Oxadipate	68
Methylsubstituierte 3-Oxadipate	71
Strukturverwandte Verbindungen des 3-Oxadipats.....	72
3.4.2.5.1. Abbau von 2-Chlor-3-oxoadipat	
durch Enzyme aus <i>Ralstonia</i> sp. PS12	73
Wachstum von <i>Ralstonia</i> sp. PS12.....	74
Enzymaktivität gegenüber 2-Chlor-3-oxoadipat	74
3.4.2.6. Hemmung	74
Komplexbildner	74
Schwermetallionen.....	75
NADH.....	76
2-Chlor-3-oxoadipat und Derivate	76
3.5. Reinigung und Charakterisierung der 3-OxadipylCoA-Thiolase	
aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13	79
3.5.1. Reinigung der 3-OxadipylCoA-Thiolase	79
3.5.1.1. DEAE Sepharose CL-6B Ionenaustauschchromatographie	80
3.5.1.2. Cibacron Blue 3G-A Agarose Affinitätschromatographie	81
3.5.1.3. Reactive Brown 10 Agarose Affinitätschromatographie	82
3.5.2. Charakterisierung der 3-OxadipylCoA-Thiolase	84
3.5.2.1. Enzymgröße.....	84
3.5.2.2. N-terminale Aminosäuresequenz	85
3.5.2.3. pH-Optimum.....	85
3.5.2.4. Kinetische Daten	86
3.5.2.5. Substratspektrum	89
Halogen- und methylsubstituierte 3-OxadipylCoA-Ester	89

	Seite
3.5.2.6. Hemmung	90
Komplexbildner	90
Schwermetallionen.....	90
NADH.....	90
4. Diskussion	91
4.1. 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase	91
4.1.1. Substratspezifität der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase.....	96
4.2. 3-OxoadipylCoA-Thiolase	99
4.2.1. Substratspezifität der 3-OxoadipylCoA-Thiolase	102
4.3. Fazit und Ausblicke	103
5. Zusammenfassung	104
6. Literatur	106
7. Anhang	117
Zur verwendeten Nomenklatur von Enlactonen und Dienlactonen.....	117
Abkürzungen	118
Lebenslauf	120

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1 Aktivierung des aromatischen Ringes durch Mono- und Dioxygenasen anhand des Beispiels Benzol.	5
Abb. 2 Die <i>ortho</i> -Spaltung am Beispiel von Brenzkatechin.	6
Abb. 3 Die <i>meta</i> -Spaltung am Beispiel von Brenzkatechin.	6
Abb. 4 Der <i>ortho</i> -Weg anhand des Beispiels Brenzkatechin.	8
Abb. 5 Der modifizierte <i>ortho</i> -Weg anhand des Beispiels 3,6-Dichlorbrenzkatechin.	10
Abb. 6 Eichgerade zur Bestimmung der Größe der Enzym-Untereinheiten der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase.	30
Abb. 7 Eichgerade zur Bestimmung der Größe der Enzym-Untereinheit der 3-OxoadipylCoA-Thiolase.	31
Abb. 8 Eichgerade zu Bestimmung der nativen Größe der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase durch Gelfiltration über eine Superose® 12 Gel-Säule.	34
Abb. 9 Eichgerade zu Bestimmung der nativen Größe der 3-OxoadipylCoA-Thiolase durch Gelfiltration über eine Superose® 6 Gel-Säule.	35
Abb. 10 Das UV-Spektrum von Coenzym A und SuccinylCoA.	36
Abb. 11 Zwei Metabolite des <i>ortho</i> -Weges, 3-Oxoadipat und 3-OxoadipylCoA, und ihr enzymatischer Umsatz durch die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase und die 3-OxoadipylCoA-Thiolase.	41
Abb. 12 3-OxoadipylCoA-Mg ²⁺ -Komplex.	42
Abb. 13 HPLC von CoA-Verbindungen, die beim enzymatischen Abbau von 3-Oxoadipat durch Enzyme aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 entstehen bzw. verschwinden oder als Cosubstrate fungieren.	43
Abb. 14 HPLC-Nachweis von CoA-Verbindungen durch Aufstockung.	44
Abb. 15 Eichgerade zur Ermittlung der SuccinylCoA-Konzentration einer proteinhaltigen Lösung durch HPLC.	45

	Seite
Abb. 16 Eichgerade zur Ermittlung der CoA-Konzentration einer proteinhaltigen Lösung durch HPLC.....	46
Abb. 17 Chemische Stabilität von 2-Chlor-3-oxoadipat in wässrigen Lösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert.	49
Abb. 18 5-Chlor-4-oxovaleriansäuremethylester.	50
Abb. 19 5-Hydroxy-4-oxovaleriansäuremethylester	51
Abb. 20 Phenyl-Sepharose Hydrophobe Interaktionschromatographie der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13.....	57
Abb. 21 Mono Q [®] Ionenaustauschchromatographie der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13.	59
Abb. 22 Superose [®] 6 Gelfiltration der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13.....	60
Abb. 23 SDS-PAGE einzelner Reinigungsstufen der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13.	62
Abb. 24 Faktor zur Abhängigkeit der Extinktion des 3-OxadipylCoA-Mg ²⁺ -Komplexes bei 305 nm vom pH-Wert einer wässrigen Tris/HCl gepufferten Lösung in Relation zur Extinktion bei pH 8,0.....	64
Abb. 25 Der Einfluss des pH-Wertes auf die 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase-Aktivität.	65
Abb. 26 Lineweaver-Burk-Diagramm der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 für das Substrat 3-Oxadipat bei fester SuccinylCoA-Anfangskonzentration.	66
Abb. 27 Lineweaver-Burk-Diagramm der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 für das Substrat SuccinylCoA bei fester 3-Oxadipat-Anfangskonzentration.	67

	Seite
Abb. 28 Enzymkatalysierte Bildung von 3-OxoadipylCoA durch 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 und enzymkatalysierte Rückreaktion durch Zugabe von Succinat.....	68
Abb. 29 Enzymkatalysierte Bildung von 3-OxoadipylCoA durch 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 und Zerstörung des CoA-Esters durch Zugabe von <i>p</i> -Chlormercuribenzoat.....	75
Abb. 30 Hemmung der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase-Aktivität durch 2-Oxoadipat.....	78
Abb. 31 DEAE Ionenaustauschchromatographie der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13.....	80
Abb. 32 Reactive Blue Affinitätschromatographie der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13.....	81
Abb. 33 Reactive Brown Affinitätschromatographie der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13.....	82
Abb. 34 SDS-PAGE von Proben der Anreicherung der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13.....	84
Abb. 35 Der Effekt des pH-Wertes auf die 3-OxoadipylCoA-Thiolase-Aktivität.....	86
Abb. 36 Lineweaver-Burk-Diagramm der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 für das Substrat 3-OxoadipylCoA bei fester CoA-Anfangs-Konzentration.....	88
Abb. 37 Lineweaver-Burk-Diagramm der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 für das Substrat CoA bei fester 3-OxoadipylCoA-Anfangs-Konzentration.....	89
Abb. 38 Mechanistisches Modell der Transferase-Reaktion.....	92
Abb. 39 Homologie der N-terminalen Aminosäuresequenz der Untereinheit A der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 zur Untereinheit A von Transferasen anderer Mikroorganismen.....	94

	Seite
Abb. 40 Homologie der N-terminalen Aminosäuresequenz der Untereinheit B der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA- Transferase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 zur Untereinheit B von Transferasen anderer Mikroorganismen.	95
Abb. 41 Modell der Entstehung verschiedener chlorierter 3-Oxoadipate beim mikrobiellen Abbau von 3,4,6-Trichlorbrenzkatechin.	96
Abb. 42 Prochirale Zentren des 3-Oxoadipats.	97
Abb. 43 Mögliches mechanistisches Modell der Thiolase-Reaktion.	100
Abb. 44 Homologie der N-terminalen Aminosäuresequenz der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13 zu Thiolasen anderer Mikroorganismen.	101
Abb. 45 Trivial- und IUPAC-Nomenklatur anhand des Beispiels einiger Enlactone und Dienlactone.	117

Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1 Der Einsatz von Chlor in der Grundstoffchemie.....	1
Tab. 2 Die Gesamtproduktions- und Importmengen einiger Chlorchemikalien in den USA im Jahr 1999.....	2
Tab. 3 Mikroorganismen, die beim Abbau industrieller chlororganischer Verbindungen besonders effektiv sind..	4
Tab. 4 Relative Retentionszeiten verschiedener CoA-Ester in Abhängigkeit von der Flussrate.....	43
Tab. 5 Substratabhängige Induktion von Enzymen während des exponentiellen Wachstums von <i>Pseudomonas</i> sp. B13.	54
Tab. 6 Anreicherungs-faktoren und Ausbeuten der Reinigung der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase.....	61
Tab. 7 Halogensubstituierte 3-Oxoadipate: Darstellung und Aktivität der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase..	69
Tab. 8 Methylsubstituierte 3-Oxoadipate: Darstellung und Aktivität der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase.	71
Tab. 9 Strukturverwandte Verbindungen des 3-Oxoadipates als Substrate der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase.	73
Tab. 10 Anreicherungs-faktoren und Ausbeute der Reinigung der 3-OxoadipylCoA-Thiolase..	83

Abstract

The degradation of 3-oxoadipate in *Pseudomonas* sp. strain B13, a chloroaromatics-degrading organism, was investigated and was shown to proceed through 3-oxoadipyl-CoA to give acetyl-CoA and succinyl-CoA. The 3-oxoadipate:succinyl-CoA transferase of strain B13 was purified by heat treatment and chromatography on Phenyl-Sepharose, Mono Q[®] and Superose[®] 6 gel. Estimation of the native M_r value gave 115 ± 5 kDa with a Superose[®] 12 column. Polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions resulted in two distinct bands of equal intensity. The subunit A and B values were 32.9 and 27.0 kDa. Therefore it was assumed that the enzyme is a heterotetramer of the type A_2B_2 with a M_r value of 119.8 kDa. The N-terminal amino acid sequences of both transferase subunits were obtained: subunit A: **AELLTLREAVRFVNDGTVALEGFTHLIPT**; subunit B: **SAYSTNEMMTVAAARRLKNQAVVFV**. The catalytical constant was 1430 min^{-1} . The pH optimum was 8.4. K_M and V_{\max} values were 0.4 mM and 10.3 U/mg protein for 3-oxoadipate, respectively, while 0.2 mM and 24.2 U/mg protein were the data for succinyl-CoA. Reversibility of the reaction was shown with succinate. The transferase of strain B13 failed to convert 2-chloro- and 2-methyl-3-oxoadipate. Some minor activity was observed with 4-methyl-3-oxoadipate. Even 2-oxoadipate and 3-oxoglutarate were shown to function as poor substrates of the transferase.

The 3-oxoadipyl-CoA thiolase was purified by chromatography on DEAE-Sepharose, Blue 3G-A, and Reactive Brown-Agarose. Estimation of the native M_r value gave 162 ± 13 kDa with a Superose[®] 6 column. The molecular mass of the subunit of the denatured protein, as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, was found to be 42 kDa. On the basis of these results, 3-oxoadipyl-CoA thiolase should be a tetramer of the type A_4 . The N-terminal amino acid sequence of 3-oxoadipyl-CoA thiolase was determined to be **SREVYI?DAVRTPIGRFG** (? = unknown). The catalytical constant was 470 min^{-1} . The pH optimum was 7.8. K_M and V_{\max} values were 0.15 mM and 1.5 U/mg protein for 3-oxoadipyl-CoA, respectively, while 0.01 mM and 0.9 U/mg protein were determined for CoA.

The N-termini of the B13-transferase subunits showed about 33-44% identical amino acids with the guloconate-CoA transferase of the anaerobic organism *Acidaminococcus fermentans*, but only an identity of 16-32% with the respective transferases of the aromatic degrading organisms *Pseudomonas putida* and *Acinetobacter calcoaceticus* was found. Sequence analysis of the B13-thiolase subunit N-terminus revealed the high percentage of 65-76% identity with thiolases of other organisms and of different functions.

1. Einleitung

Die Chlorchemie zählt auch heute noch zu den bedeutendsten Zweigen in der chemischen Industrie. Ohne Chlor als Reaktionsvermittler könnten viele Produkte nur schwer oder gar nicht hergestellt werden. Viele Grundstoffe sind Chlorverbindungen, die zur Herstellung anderer Zwischen- und Endprodukte benötigt werden. **Tab. 1** und **Tab. 2** geben Aufschluss über die Verwendung chlorierter Chemikalien und den Umfang der Jahresproduktionszahlen einiger ausgewählter Beispiele. Sie verdeutlichen die Relevanz für die moderne Chemie.

Tab. 1: Der Einsatz von Chlor in der Grundstoffchemie.

Quelle: Bayrisches Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen (1998)

Die Chlorierung von...	wird verwendet zur Darstellung von...
Methan	Silikonen, Methylcellulose, Lösemitteln
Ethan und Ethylen	PVC, Farbstoffen, Insektiziden, Pharmazeutika, Lösemitteln, Harzen
Propen	Kunststoffen, Weichmachern, Kosmetika, Pflanzenschutzmitteln
Butan, Butenen und Paraffinen	Kautschuk, Harzen, Klebstoffen, Schmiermitteln, Detergenzien
Aromaten	Lösemitteln, Polyurethanen, Harzen, Lacken, Farben, Pflanzenschutzmitteln, Pharmazeutika
Die Chlorverbindung...	wird verwendet zur Darstellung von...
Phosgen	Polyurethanen, Polycarbonaten
Bleichlauge	Desinfektionsmitteln
Chlorwasserstoff	Chlorierungsmitteln
Nichtmetallchloride	Spezialitäten

Tab. 2: Die Gesamtproduktions- und Importmengen einiger Chlorchemikalien in den USA im Jahr 1999. Quelle: chemexpo 2002

Chlorchemikalie	Produktions- und Importmengen der USA (1999) [kt]
Methylchlorid	400
Methylenchlorid	104
Chloroform	300
Chloressigsäure	46
Perchlorethylen	159
Chlorparaffine	45
Phosgen	1600
Chlorwasserstoff	4090
Monochlorbenzol	65

Neben der Verwendung von Chlorchemikalien als Zwischenprodukte gibt es auch einige relevante chlorhaltige Endprodukte, die in sehr großen Mengen produziert werden. So war beispielsweise Polyvinylchlorid Ende der 90iger Jahre mengenmäßig der bedeutendste chlororganische Kunststoff mit einer Produktionsmenge von ca. 1,5 Mt pro Jahr in Deutschland (Quelle: Umweltbundesamt 2001) und ca. 8,8 Mt in den USA (Quelle: chemexpo 2002).

Die Verwendung von Chlor und chlororganischen Verbindungen in der modernen Industrie und in Produkten des alltäglichen Gebrauchs bringt jedoch bei allen positiven Aspekten der Chlorchemie einige Schattenseiten hervor. Anfallende chlorierte Nebenprodukte und Abfälle aus Industrie und Haushalten, aber auch gewollt in die Umwelt ausgebrachte chlororganische Verbindungen, wie Pflanzenschutzmittel oder Insektizide, belasten das Ökosystem und gefährden die Umwelt und die Gesundheit von Menschen, Tieren und Pflanzen. Durch die Fähigkeit vieler Chloraromaten, sich in menschlichem und tierischem Fettgewebe zu akkumulieren, sind neben einer teilweise hohen akuten Toxizität Langzeiteffekte denkbar.

Aber nicht nur der Mensch, auch die Natur betreibt wohl schon seit jeher Chlorchemie. So konnten z. B. in Binnenseeablagerungen chlorierte Naturstoffe nachgewiesen werden. In solchen mittelalterlichen Sedimenten, zeitlich fern jeder technischen Chlorchemie, lassen sich

Tri-, Tetra- und Pentachlorphenole nachweisen (NAUMANN 1993; PAASIVIRTA et al. 1988). Pflanzen, Meeresorganismen, Bakterien, Pilze und Insekten produzieren viele verschiedene organische Halogenverbindungen. Etwa 900 biogene Chlorverbindungen sind bis heute bekannt. Jedes Jahr werden ca. 30-40 neue Verbindungen entdeckt (Quelle: EU.L.E 2002).

Viele dieser natürlichen Chlororganika sind biologisch sehr aktiv. Manche nützliche oder auch unerfreuliche toxikologische Eigenschaft von tierischen oder pflanzlichen Meeresorganismen beruht auf der Reaktivität eines Chlorsubstituenten im Naturstoff (NAUMANN 1993; NEIDLEMAN & GEIGER 1986). Aber auch terrestrische Organismen produzieren wirkungsvolle chlororganische Verbindungen. So ist beispielsweise Epibatidin, eine im Drüsensekret einer südamerikanischen Froschart (*Epipedobates tricolor*) nachgewiesene chlorhaltige Substanz, ein 200-fach wirksameres Schmerzmittel als Morphin (Quelle: EU.L.E 2002).

Der Nutzen für pflanzliche und tierische Chlororganika-Produzenten liegt zum Einen in der Abwehr von Feinden und Wettbewerbern um die Nahrung, was eine Wirkung gegen unbeteiligte Organismen allerdings nicht ausschließt (WATANABE et al. 1989). Im Weiteren haben organische Chlorverbindungen Funktionen wie Hormon-regulatorische Wirkungen, z.B. Morphogene in Schleimpilzen, welche die Differenzierung der pilzlichen Zellen verursachen (MORRIS et al. 1985; OKA et al. 1985) oder die Chlorindolessigsäure, ein bekanntes Pflanzenwuchshormon.

Die Menge an natürlich produzierten chlorhaltigen Stoffen ist recht unterschiedlich, sie ist jedoch sicher nicht gering und kann lokal Ausmaße annehmen, die an industrielle Umweltverschmutzung grenzt (HIGA & SAKEMI 1983).

Die Stabilität chlorhaltiger Naturstoffe reicht von labilen bis hin zu sehr stabilen, mehrfach chlorierten Verbindungen. Erstaunlich ist die Tatsache, dass sich diese Stoffe im Laufe der Jahrtausende nicht angereichert haben. Dies lässt den Schluss zu, dass es natürliche Abbaumechanismen gibt (NAUMANN 1993).

Flüchtige organische Verbindungen werden oft in der Troposphäre abgebaut (ZETSCH 1991). Eine unrühmliche Ausnahme bilden Fluor-Chlor-Kohlenwasserstoffe (FCKW), welche maßgeblich an der Zerstörung der stratosphärischen Ozonschicht beteiligt sind.

Schwerflüchtige Organo-Chlorverbindungen könnten angesichts der knappen Bioverfügbarkeit des für viele Organismen lebenswichtigen anorganischen Chlorids eine Art Fixierung des Chlors in Böden des Festlandes bewirken, da sich diese durch Regenwasser im Gegensatz zu anorganischen Chloriden nicht leicht ausspülen lassen. Sie können an die lipophilen Bestandteile der Bodenmatrix binden. Durch den biologischen Abbau dieser Stoffe, auch als Mineralisierung bezeichnet, wird in Folge anorganisches Chlorid aus „organischer Quelle“ wieder verfügbar.

In diesen Kreislauf werden auch anthropogene Chloremissionen einbezogen. Für hochchlorierte Verbindungen, beispielsweise vom Typ der Polychlorierten Biphenyle (PCB), reichen diese natürlichen Abbaukapazitäten offenbar bei weitem nicht. Denkbar ist auch, dass die geringe Wasserlöslichkeit die Verwertung dieser hochchlorierten Substanzen durch Mikroorganismen sehr erschwert. Sie reichern sich in der Umwelt an, führen zu massiven Umweltproblemen und verursachen z. T. gesundheitliche Schäden, auch des Menschen.

Nachfolgende **Tab. 3** zeigt eine Auswahl an Mikroorganismen, die in der Lage sind, effektiv Chlorverbindungen zu mineralisieren.

Tab. 3: Mikroorganismen, die beim Abbau industrieller chlororganischer Verbindungen besonders effektiv sind (DMOCHEWITZ & BALLSCHMITER 1988; ENGVILD 1986).

Bakterien	Pilze
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Phanerochaete</i> sp.
<i>Alcaligenes</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Rhodococcus</i> sp.	
<i>Acinetobacter</i> sp.	
<i>Arthrobacter</i> sp.	
<i>Corynebacterium</i> sp.	
<i>Hyphomicrobium</i> sp.	
<i>Flavobacterium</i> sp.	

Das am weitesten gefächerte Abbaupotential für Chlororganika zeigen die in Kläranlagen und Oberflächengewässern lebenden Pseudomonaden. Die Untersuchung eines Stammes dieser Mikroorganismen, *Pseudomonas* sp. B13, wird im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen.

1.1. Aerober Abbau von Aromaten durch Bakterien

Die in der Natur zahlreich vorkommenden aromatischen Kohlenstoffverbindungen können in Gegenwart von Sauerstoff durch Mikroorganismen bis hin zu Verbindungen des Tricarbonsäure-Cyclus abgebaut werden. Erste Stufe der Umsetzung aromatischer Verbindungen durch Bakterien (Prokaryonten) ist die Aktivierung des aromatischen Ringes durch sauerstoffabhängige Enzyme, den Monooxygenasen und Dioxygenasen (REINEKE 2001). Sie führt zu den „zentralen“ Metaboliten des mikrobiellen Aromatenabbaus, den diphenolischen Verbindungen der Brenzkatechine, Resorcine und Hydrochinone.

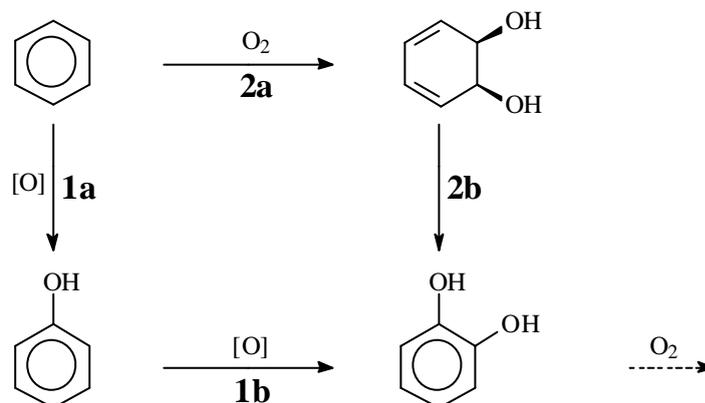


Abb. 1: Aktivierung des aromatischen Ringes durch Mono- und Dioxygenasen anhand des Beispiels Benzol. **1a** und **1b** Monooxygenasen, **2a** Dioxygenase, **2b** *cis*-Dihydrodiol-Dehydrogenase.

Mit wenigen Ausnahmen ist die Einführung zweier Hydroxylgruppen eine Voraussetzung für die anschließende Ringspaltung und somit für die Aufhebung der Aromatizität der Verbindungen (REINEKE 2001). Die Ringspaltung findet unter Verbrauch molekularen Sauerstoffs katalysiert durch Dioxygenasen (SISTROM & STANIER 1954; HAYAISHI et al. 1957; KOJIMA et al. 1961; NOZAKI et al. 1963; HAYAISHI et al. 1963) statt. In Abhängigkeit der Position der Ringspaltung zu den beiden Hydroxylgruppen des Diphenols kann zwischen *ortho*- und *meta*-Spaltung unterschieden werden. Die *ortho*-Spaltung, auch

Intradiolspaltung genannt, bezeichnet die oxygenolytische Ringspaltung zwischen zwei benachbarten Hydroxylgruppen:

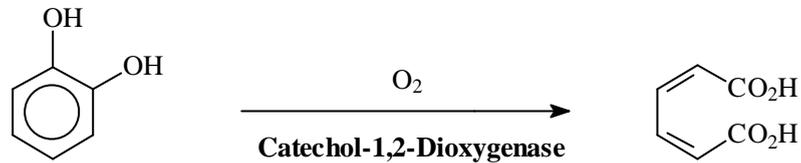


Abb. 2: Die *ortho*-Spaltung am Beispiel von Brenzkatechin.

Die Spaltung zwischen einem hydroxylierten und einem nicht Hydroxyl-substituierten Kohlenstoffatom des aromatischen Ringes eines Diphenols wird als *meta*-Spaltung oder Extradiolspaltung bezeichnet:

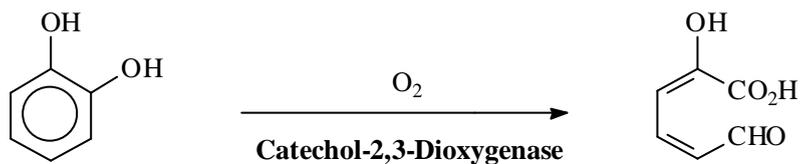


Abb. 3: Die *meta*-Spaltung am Beispiel von Brenzkatechin.

Die in dieser Arbeit untersuchten Reaktionen sind Teile des *ortho*-Weges (1.1.1.) bzw. des modifizierten *ortho*-Weges (1.1.2.). Inhalte des *meta*-Weges werden in dieser Arbeit nicht behandelt. Sie sind jedoch Inhalt zahlreicher Arbeiten (SALA-TREPAT & EVANS 1971; HARAYAMA et al. 1984; BAYLY & BARBOUR 1984; SHINGLER et al. 1992).

1.1.1. Der *ortho*-Weg aromatischer Kohlenwasserstoffe

Der auch als 3-Oxadipat-Weg bezeichnete *ortho*-Weg wird, wie unter 1.1. beschrieben, durch eine Dioxygenase-Reaktion unter Verbrauch molekularen Sauerstoffs eingeleitet. Die weitere Reaktionsfolge, wie sie für das Beispiel Brenzkatechin in **Abb. 4** gezeigt wird, beinhaltet die Cyclisierung der bei der Ringöffnung entstandenen Dicarbonsäure durch die Muconat-Cycloisomerase (SISTROM & STANIER 1954; ORNSTON 1966, 1970), die anschließende Umwandlung des entstandenen Muconolactons durch Muconolacton-Isomerase (ORNSTON 1966, 1970) und die hydrolytische Öffnung des 3-Oxadipat-Enollactons durch eine Hydrolase (ORNSTON 1966, 1970). Das durch die Hydrolase gebildete 3-Oxadipat ist Substrat für die 3-Oxadipat:Succinyl-CoA-Transferase (KATAGIRI & HAYAISHI 1957). Das von der Transferase für die Umsetzung des 3-Oxadipats als Cosubstrat benötigte SuccinylCoA wird in der nachfolgenden CoA-abhängigen Thiolyse durch die 3-OxadipylCoA-Thiolase (KATAGIRI & HAYAISHI 1957) zurückgebildet. Bei dieser letzten Stufe des Abbaus von Brenzkatechin entsteht AcetylCoA, welches in den Tricarbonsäure-Cyclus mündet.

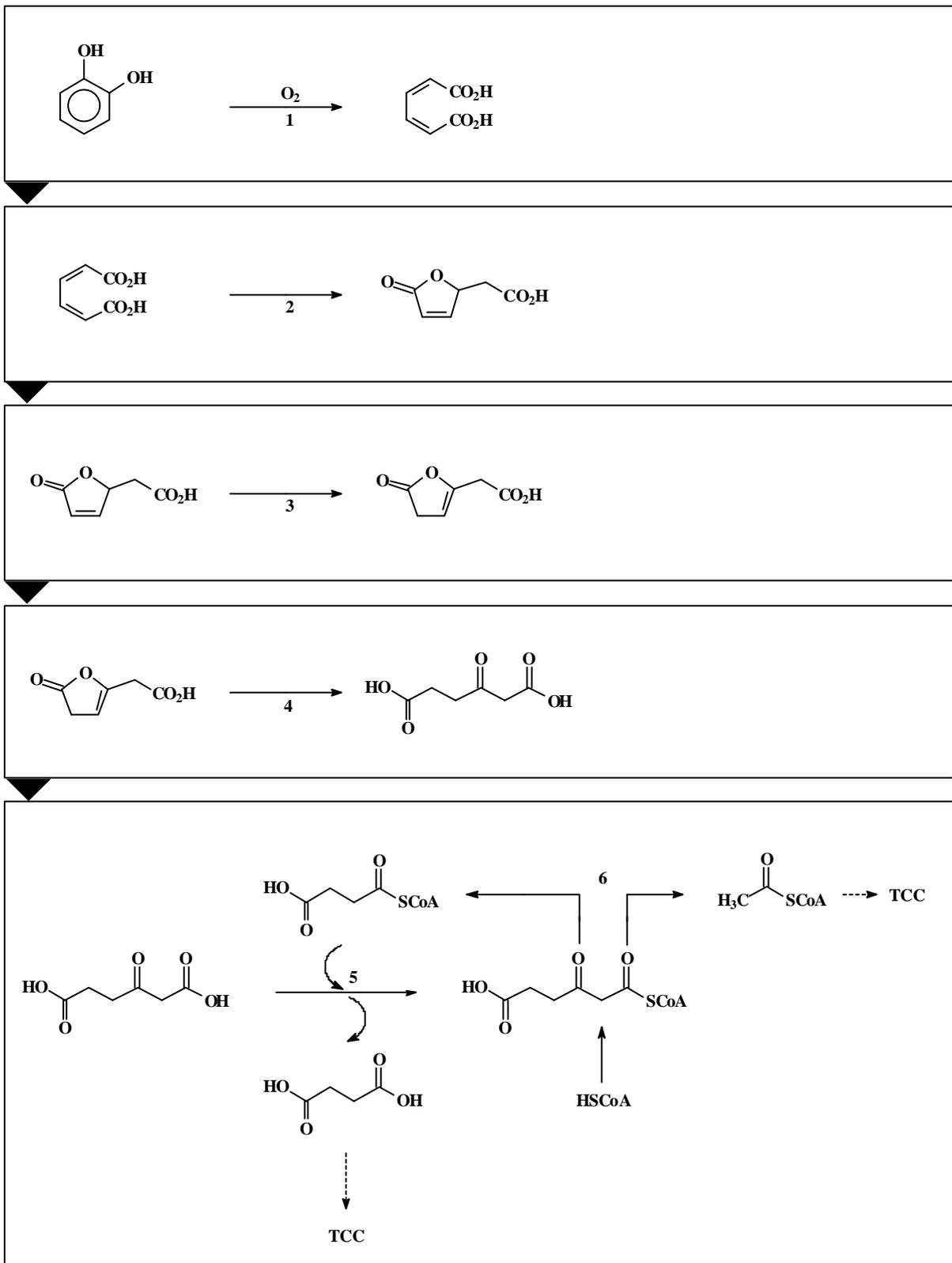


Abb. 4: Der *ortho*-Weg anhand des Beispiels Brenzkatechin. **1** Catechol-1,2-Dioxygenase, **2** Muconat-Cycloisomerase, **3** Muconolacton-Isomerase, **4** 3-Oxadipat-Enollacton-Hydrolase, **5** 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase, **6** 3-OxadipylCoA-Thiolase.

1.1.2. Der „modifizierte“ *ortho*-Weg

In Anlehnung an den *ortho*-Weg aromatischer Kohlenwasserstoffe wird die Mineralisierung chloraromatischer Verbindungen, insofern diese durch Intradiolspaltung der als „zentrale“ Metabolite entstehenden Chlordiphenole eingeleitet wird, als modifizierter *ortho*-Weg bezeichnet. Diese bekannte Folge von Abbaureaktionen beinhaltet neben den Metaboliten und Enzymen des *ortho*-Weges (1.1.1.) solche, die speziell am Abbau chlorierter Aromaten beteiligt sind (DORN & KNACKMUSS 1978a, 1978b; SCHMIDT et al. 1980; SCHMIDT & KNACKMUSS 1980; SCHWIEN et al. 1988; KUHM et al. 1990; VOLLMER & SCHLÖMANN 1995; SCHLÖMANN et al. 1990; KUHN 1998; KASCHABEK & REINEKE 1992, 1993, 1995; VOLLMER et al. 1993; MÜLLER et al. 1996)

In Abhängigkeit von der Anzahl der Chlorsubstituenten einer aromatischen Verbindung mündet der modifizierte *ortho*-Weg früher oder später in den herkömmlichen *ortho*-Weg und somit letztendlich in den Tricarbonsäure-Cyclus.

Entscheidend für die Verwendung chlorierter aromatischer Verbindungen als Kohlenstoff- und Energiequelle ist die Umwandlung des organisch gebundenen Chlors in „mineralisches“ Chlorid. Dies geschieht zum Einen durch enzymkatalysierte Dechlorierungsreaktionen, wie auch durch spontane Eliminierung des Chlors aufgrund der chemischen Eigenschaften entstehender Metabolite einer vorangegangenen Umwandlung. Dechlorierungsreaktionen waren und sind Inhalt zahlreicher Arbeiten (SCHMIDT & KNACKMUSS 1980; KASCHABEK & REINEKE 1992, 1993, 1995; VOLLMER et al. 1993; MÜLLER et al. 1996).

Ausgehend von chlorierten diphenolischen Verbindungen, wie in **Abb. 5** am Beispiel von 3,6-Dichlorbrenzkatechin gezeigt, folgt der modifizierte *ortho*-Weg zunächst einer Ringaktivierung durch Sauerstoff mit anschließender Spaltung des aromatischen Ringes zwischen zwei benachbarten Diolgruppen (siehe auch *ortho*-Spaltung **Abb. 2**). Die durch Chorcatechol-1,2-Dioxygenasen katalysierte Reaktion führt zunächst zur Bildung von Chlormuconaten (DORN & KNACKMUSS 1978a, 1978b; SCHMIDT et al. 1980). Diese werden in Folge durch Chlormuconat-Cycloisomerasen unter Bildung eines 5-Ringes zu entsprechenden Enlactonen umgesetzt. Enthält das Enlacton, wie in dem in **Abb. 5** gezeigten

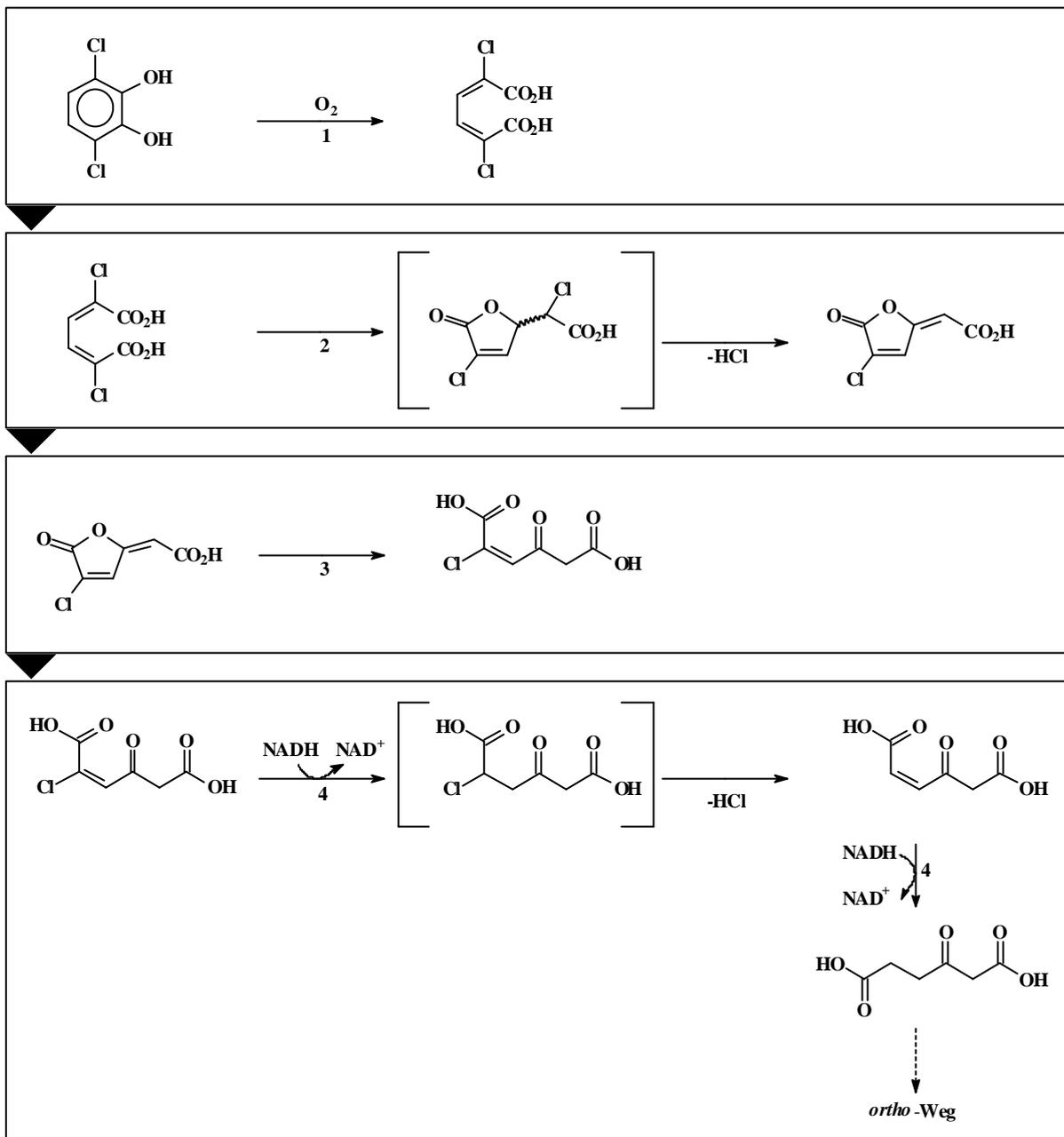


Abb. 5: Der modifizierte *ortho*-Weg anhand des Beispiels 3,6-Dichlorbrenzkatechin.
 1 Chlorcatechol-1,2-Dioxygenase, 2 Chlormuconat-Cycloisomerase, 3 Dienlacton-Hydrolase, 4 Maleylacetat-Reduktase.

Beispiel, in der dem Ring anhängenden Seitenkette lediglich ein Chloratom kommt es zur Chlorideliminierung, offenbar unter Beteiligung der Chlormuconat-Cycloisomerase (PIEPER 1991). Bei dieser Reaktion entstehen Dienlactone, welche anschließend durch Dienlacton-Hydrolasen zu Maleylacetaten geöffnet werden (SCHLÖMANN et al. 1990; KUHN 1998). Maleylacetate sind in Folge Substrate von Maleylacetat-Reduktasen, welche diese zu

3-Oxadipaten umsetzen (KASCHABEK & REINEKE 1992, 1993, 1995; VOLLMER et al. 1993; MÜLLER et al. 1996).

Auf der Stufe des 3-Oxadipats mündet der modifizierte *ortho*-Weg in den herkömmlichen *ortho*-Weg des mikrobiellen Abbaus von Aromaten (1.1.1.).

In Abhängigkeit von der Entstehung chlorierter Dienlactone und in Folge von chlorierten Maleylacetaten können chlosubstituierte 3-Oxadipate entstehen (KASCHABEK 1995) (siehe hierzu auch 3.2.3.). Die weitere Umsetzung von chlorierten 3-Oxadipaten ist bislang nicht untersucht worden. Eine Aktivität der 3-Oxadipat-verwertenden Enzyme des *ortho*-Weges, der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase und der 3-OxadipylCoA-Thiolase, wären möglich. Denkbar wäre auch ein eigenes enzymatisches System, welches den modifizierten *ortho*-Weg fortsetzt. Bislang ist ein solches System oder eine Aktivität der Enzyme des herkömmlichen *ortho*-Weges (1.1.1.) jedoch nicht nachgewiesen.

1.2. Der Organismus *Pseudomonas* sp. Stamm B13

Der Abbau chloraromatischer Verbindungen mit Chlorbrenzkatechin oder anderen Diolen als zentralen Metaboliten ist inzwischen für zahlreiche Bakterien belegt. Der Stamm *Pseudomonas* sp. B13 war einer der ersten Organismen, dessen Wachstum auf chloraromatischen Verbindungen belegt wurde (DORN et al. 1974). Heute ist dieser Stamm Inhalt zahlreicher Forschungen und Publikationen. Sowohl die während des Abbaus entstehenden Intermediate (DORN & KNACKMUSS 1978, SCHMIDT et al. 1980), wie auch die am Abbau beteiligten Enzyme (SCHMIDT & KNACKMUSS 1980) und deren Spezifität (DORN & KNACKMUSS 1978, KASCHABEK & REINEKE 1995, KUHN 1998, VOLLMER et al. 1999) wurden untersucht. Die Fähigkeit einzelner Enzyme aus *Pseudomonas* sp. B13, Chlor aus organischen Verbindungen während des Abbaus zu eliminieren, war ebenfalls von besonderem Interesse (KASCHABEK & REINEKE 1995, SCHMIDT & KNACKMUSS 1980).

Die Genetik des Stammes in Bezug auf die Verwertung von Chloraromaten (FRANTZ et al. 1987; KASBERG et al. 1995; VAN DER MEER et al. 2001; GÖBEL et al. 2002) ist in Ergänzung zur Biochemie des Chloraromatenabbaus ebenfalls von großem Interesse für die aktuelle Forschung.

In dieser Arbeit sind die beiden Enzyme 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase und 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 Mittelpunkt der Untersuchungen. Sie bilden den Abschluss des *ortho*-Weges und sind diejenigen Enzyme, deren Produkte in Form von Succinat und AcetylCoA in die Stoffwechselkreisläufe der Zelle, wie beispielsweise dem Tricarbonsäure-Cyclus, münden.

Die Frage, ob diese beiden Enzyme in der Lage sind, auch chlorierte 3-Oxoadipate umzusetzen und somit auch den Abschluss des modifizierten *ortho*-Weges für chlorierte Metabolite zu bilden, ist bislang unbeantwortet und wird daher ebenfalls in dieser Arbeit von Interesse sein.

1.3. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Enzyme 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase und 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 gereinigt und charakterisiert werden. Sie stellen den Abschluss des *ortho*-Weges und möglicherweise auch des modifizierten *ortho*-Weges bei der Verwertung von Aromaten und Chloraromaten als Energie- und Kohlenstoffquelle dar und bilden somit die Brücke hin zum Tricarbonsäure-Cyclus.

Die Aufgabenstellung umfasste im Einzelnen:

- Die Etablierung einer Analytik für Coenzym A-Derivate durch HPLC.
- Die Herstellung größerer Mengen zellfreien Rohextraktes aus *Pseudomonas* sp. B13.
- Die Reinigung der Enzyme 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase und 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase.
- Die Ermittlung der Enzymgrößen und der N-terminalen Aminosäuresequenzen.
- Die Ermittlung enzymkinetischer Daten.
- Die Untersuchung der Substratspezifität und des Substratspektrums der Enzyme. Von besonderem Interesses sind neben den Substraten des *ortho*-Weges, 3-Oxoadipat bzw. 3-OxoadipylCoA, chloresubstituierte Verbindungen. Hier insbesondere 2-Chlor-3-oxoadipat als potentieller Metabolit der Mineralisation von 1,2,4-Trichlorbenzol und 3,4-Dichlorbenzoat.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen

Folgende Organismen wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

- *Pseudomonas* sp. Stamm B13 (DSMZ 6978)

Der von DORN et al. (1974) isolierte Stamm ist in der Lage, auf 3-Chlorbenzoat als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen.

- *Ralstonia* sp. Stamm PS12 (DSMZ 8910)

Der Stamm wurde von SANDER et al. (1991) isoliert und ist in der Lage, 1,2- und 1,4-Dichlorbenzol, 1,2,4-Trichlorbenzol und 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol als Wachstumssubstrat zu nutzen.

- *Escherichia coli* BL 21(DE3) (pESBLT8)

Der Organismus wurde als Expressionsstamm für die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. Stamm B13 verwendet (M. Göbel und Dr. E. Schmidt, persönliche Mitteilung).

2.2. Stammerhaltung

Die Aufbewahrung der Organismen *Pseudomonas* sp. Stamm B13 und *Ralstonia* sp. Stamm PS12 erfolgte bei 4°C auf Agarplatten (1,5 Gew.% Agar, 70 mM Phosphatpuffer pH 7,3, Salzlösung wie unter 2.3.). *Pseudomonas* sp. Stamm B13 diente 2 mM 3-Chlorbenzoat im Medium als Substrat. Der Stamm wurde einmal im Monat überimpft. *Ralstonia* sp. Stamm PS12 erhielt 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol über die Gasphase und wurde 14-tägig überimpft. Der Stamm *Escherichia coli* BL 21(DE3) (pESBLT8) wurde in LB-Flüssigmedium nach Miller (siehe 2.3.) angezogen, 1:1 mit Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

2.3. Nährlösungen

Für die Anzucht der Organismen *Pseudomonas* sp. Stamm B13 und *Ralstonia* sp. Stamm PS12 wurde die von DORN et al. (1974) angegebene Mineralsalzlösung verwendet, bei der zwecks besserer pH-Stabilisierung des Mediums die Pufferkonzentration verdoppelt wurde:

Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	7,0	g
KH ₂ PO ₄	2,0	g
Ca(NO ₃) ₂	0,05	g
Ammonium-Fe(III)-citrat · 7H ₂ O	0,1	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,2	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0	g
Spurenelementlösung nach PFENNIG & LIPPERT (1966), ohne EDTA und FeSO ₄	1,0	mL
bidest. H ₂ O	ad 1000	mL

Als Energie- und Kohlenstoffquelle wurde für die Anzucht von *Pseudomonas* sp. Stamm B13 3-Chlorbenzoat, Benzoat oder Acetat in Konzentrationen zwischen 5 und 10 mM verwendet. Für die Anzucht von *Ralstonia* sp. Stamm PS12 wurde festes 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol dem Medium zugesetzt. Die Anzucht von *Escherichia coli* BL 21(DE3) (pESBLT8) erfolgte in LB-Flüssigmedium folgender Zusammensetzung (MILLER 1972):

NaCl	10	g
Select Pepton 140 (Fa. Life Technologies, Paisley, Schottland)	10	g
Select Yeast Extract (Fa. Life Technologies, Paisley, Schottland)	5	g
bidest. H ₂ O	ad 1000	mL

2.4. Anzucht von Bakterienkulturen

Zur Anzucht größerer Zellmengen von *Pseudomonas* sp. B13 wurden Vorkulturen in 100 mL Schikanenkolben angezogen, welche 20 mL Nährlösung enthielten. Für die Anzucht der Vorkulturen betrug die 3-Chlorbenzoatkonzentration 5 mM. Größere Zellmengen wurden in 3000 mL Schikanenkolben mit je 500 mL Medium angezogen. Für diese Hauptkulturen wurde eine Konzentration von 10 mM 3-Chlorbenzoat als Energie- und Kohlenstoffquelle eingesetzt.

Die Kulturen wurden bei 30°C auf einem Rotationsschüttler (Typ RC 106, Infors AG, Basel/Schweiz) bei ca. 100 Upm inkubiert.

Zur Anzucht größerer Zellmengen von *Ralstonia* sp. Stamm PS12 wurde eine mit dem Stamm bewachsene Mineralsalz-Agarplatte mit 3 mL sterilem Phosphatpuffer (70 mM, pH 7,3) digeriert. Auf 10 Mineralsalz-Agarplatten wurden jeweils 300 µL dieser Zellsuspension ausplattiert. Als Energie- und Kohlenstoffquelle diente 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol, welches über die Gasphase zugefüttert wurde. Die Kulturen wurden bei 30°C inkubiert. Zur Darstellung zellfreien Rohextraktes wurden die Organismen dieser Mineralsalz-Agarplatten mit jeweils 400 µL Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,0, 0,5 mM DTT) digeriert und anschließend vereinigt.

Zur Anzucht größerer Zellmengen von *Escherichia coli* LB21 wurden Vorkulturen in 300 mL Schikanenkolben angezogen. Diese enthielten 50 mL LB-Flüssigmedium unter Zusatz von 1,5 mg Chloramphenicol und 2,5 mg Ampicilin. Zur Anzucht der Hauptkulturen wurden 50 mL LB-Flüssigmedium unter Zusatz von 1,5 mg Chloramphenicol und 2,5 mg Ampicilin mit Vorkultur zu einer OD von 0,05 EE angeimpft. Als Vergleichslösung diente LB-Flüssigmedium. Bei einer optischen Dichte von 0,6-0,8 EE wurden zur Induktion der 3-Oxoadipat: SuccinylCoA-Transferase 200 µL 100 mM Lösung von IPTG zugegeben und die Zellen nach 1,5 h (OD bei ca. 2,8 EE) geerntet.

Die Kulturen wurden bei 30°C auf einem Rotationsschüttler (Typ RC 106, Infors AG, Basel/Schweiz) bei ca. 100 Upm inkubiert.

2.5. Trübungsmessungen

Die optische Dichte von Zellsuspensionen wurde durch Extinktionsmessung bei 546 nm und einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer (Uvikon 710, Fa. Kontron, Eching oder Cary 50 Bio, Fa. Varian, Darmstadt) bestimmt. Zum Nullabgleich diente Phosphatpuffer (70 mM, pH 7,3). Bei Extinktionen über 0,3 EE wurden die Proben entsprechend verdünnt.

2.6. Zellernte und Herstellung von Rohextrakt

Die noch in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Kulturen aus 2.4. wurden in einer Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5B Superspeed Centrifuge, Fa. Du Pont, Bad Nauheim) bei einer Temperatur von 4°C 20 Minuten bei 8.000 Upm zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des Zellrückstandes mit Tris/HCl-Puffer (100 mM, pH 7,0, 0,5 mM DTT) erfolgte Resuspension in ca. 5 mL des gleichen Puffers. Die resuspendierten Zellen wurden nach Zugabe von 0,5 µL Desoxyribonuclease (DNAse I, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA) mit einer auf 4°C vorgekühlten French-Press (Fa. American Instruments Co., Silver Springs, USA) bei einem Druck von 140 MPa aufgeschlossen.

Ganze Zellen und Zelltrümmer wurden anschließend in einer Ultrazentrifuge (Sorvall, OTB50B, Fa. Du Pont, Bad Nauheim) bei 100.000 x g über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand (= Rohextrakt) wurde abgehebert und für enzymatische Tests bzw. für die Enzymanreicherung verwendet. Das Sediment wurde verworfen. Die Lagerung der Rohextrakte erfolgte bei -20°C.

2.7. Bestimmung des Proteingehalts

Die Proteinbestimmung in zellfreien Rohextrakten erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Proteinbestimmungs-Kits (Bio-Rad-Protein Assay, Fa. Bio-Rad, München) beruhend auf der Coomassie-Blue-Methode nach BRADFORD (1976). Als Standard diente kristallines Rinderserumalbumin.

Bei chromatographischen Trennungen erfolgte eine grob quantitative online-Kontrolle der Proteinkonzentration durch Extinktionsmessung des Eluates bei 254 nm mit Hilfe eines UV-Detektors (Uvicord SII, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden).

2.8. Bestimmung der Enzymaktivität

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte in 1 cm Quarzküvetten mit einem der folgenden Spektralphotometer:

- Uvikon 710, Fa. Kontron, Eching; Schreiber Uvikon Recorder 21
- Varian Cary 50 Bio, Fa. Varian, Darmstadt; computergesteuert

Eine Enzymeinheit [U] wird definiert als die Aktivität, die den Umsatz von 1 μmol Substrat in einer Minute bei 25°C katalysiert. Die spezifische Aktivität wird in Einheiten pro Milligramm Protein angegeben.

2.8.1. Maleylacetat-Reduktase (EC 1.3.1.32)

= 3-Oxoadipat:NAD(P)⁺Oxidoreduktase

Die Aktivität der Maleylacetat-Reduktase wurde modifiziert nach GAAL & NEUJAHR (1979) anhand der Substratabnahme über deren Extinktion bei 340 nm verfolgt. Der Reaktionsansatz enthielt bezogen auf 1 mL:

10	μmol	Tris/HCl-Puffer, pH 7,0
0,4	μmol	NADH
0,4	μmol	Maleylacetat
10	μL	verdünnter Rohextrakt

2.8.2. Dienlacton-Hydrolase (EC 3.1.1.45)

= 4-Carboxymethylenbut-2-en-4-olid-Lacton-Hydrolase

Zur Bestimmung der Aktivität der Dienlacton-Hydrolase wurde die Substratabnahme anhand der Extinktion bei 280 nm photometrisch verfolgt. Nach SCHMIDT & KNACKMUSS (1980) und SCHLÖMANN et al. (1990) enthielt der Reaktionsansatz auf 1 mL bezogen:

10	μmol	Histidin/HCl-Puffer, pH 6,5
0,1	μmol	<i>cis</i> -Dienlacton
10	μL	verdünnter Rohextrakt

2.8.3. 3-Oxoadipat-Enollacton-Hydrolase (EC 3.1.1.24)

= 4-Carboxymethylbut-3-en-4-olid-Enollacton-Hydrolase

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Abnahme der Substratkonzentration durch Messung der Extinktion photometrisch bei 230 nm verfolgt [$\epsilon_M = 2050 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]. Verändert nach ORNSTON (1966) enthielt der Reaktionsansatz bezogen auf 1 mL:

30	μmol	Tris/HCl-Puffer pH 7,5
0,5	μmol	Muconolacton* ¹
20	μL	Muconolacton-Isomerase-Präparat* ²
		<u>Inkubationszeit: 5 min</u>
10	μL	verdünnter Rohextrakt

*¹ Das Muconolacton wurde nach der Methode von ELVIDGE (1950) synthetisiert und freundlicherweise von Herrn Dr. E. Schmidt zur Verfügung gestellt.

*² Muconolacton-Isomerase-Präparat: Das Isomerase-Präparat wurde freundlicherweise von Herrn Dr. E. Schmidt zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung der Enzympräparation erfolgte durch Hitzebehandlung des Rohextraktes bei 55°C für 30 min aus auf Benzoat (5mM) gewachsenen *Pseudomonas putida* A3.12 (nach ORNSTON 1966).

2.8.4. 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase (EC 2.8.3.6)

Zur Bestimmung der Aktivität der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase wurde die Zunahme der Konzentration des 3-OxoadipylCoA-Mg²⁺-Komplexes bei 305 nm photometrisch verfolgt. Verändert nach KATAGIRI & HAYAISHI (1957) enthielt der Reaktionsansatz bezogen auf 1 mL:

35	μmol	Tris/HCl-Puffer pH 8,0
25	μmol	MgCl ₂
0,15	μmol	SuccinylCoA
3,5	μmol	3-Oxoadipat* ³
10	μL	verdünnter Rohextrakt bzw. verdünnte Transferase-Enzympräparation

*³ 3-Oxoadipat-Lösung wurde aus *cis*-Enlacton (= 5-Oxotetrahydrofuran-2-ylidenessigsäure) durch alkalische Hydrolyse mit einer aliquoten Menge an 1N KOH-Lösung dargestellt. Die Darstellung substituierter 3-Oxoadipate ist in den Kapiteln 3.2.3. – 3.2.6. beschrieben.

2.8.5. 3-OxoadipylCoA-Thiolase (EC 2.3.1.--)

Zur Bestimmung der Aktivität der 3-OxoadipylCoA-Thiolase wurde die Abnahme des 3-OxoadipylCoA-Mg²⁺-Komplexes bei 305 nm photometrisch verfolgt. Verändert nach KATAGIRI & HAYAISHI (1957) enthielt der Reaktionsansatz bezogen auf 1 mL:

980	μL	3-OxoadipylCoA-Präparation [Reaktionsansatz wie unter 2.8.4., mit verdünnter Transferase-Enzympräparation oder verdünntem Rohextrakt aus <i>Escherichia coli</i> BL 21(DE3) (pESBLT8) präpariert; Gleiche Mengen eingesetzter Substanzen bezogen auf 0,98 mL anstatt 1 mL]
0,2	μmol	Coenzym A
10	μL	verdünnter Rohextrakt bzw. verdünnte Thiolase-Enzympräparation

2.8.6. ATP und CoA-abhängiges 3-Oxadipat umsetzendes Enzym

Eine Aktivität des Enzyms im Rohextrakt aus *Pseudomonas* sp. B13 wurde durch den Nachweis von AcetylCoA per HPLC bestimmt (siehe 2.12.). Das durch das Enzym gebildete 3-OxadipylCoA konnte nicht direkt nachgewiesen werden, da dieses durch die im Rohextrakt enthaltene 3-OxadipylCoA-Thiolase direkt zu AcetylCoA und SuccinylCoA umgesetzt wurde. Ein Versuch der Abtrennung der 3-OxadipylCoA-Thiolase durch Hitzebehandlung des Rohextraktes bei Temperaturen von 35° - 60°C verlief erfolglos, da hierbei auch das ATP/CoA-abhängige 3-Oxadipat umsetzende Enzym deaktiviert wurde. Verändert nach POWLOWSKI & DAGLEY (1985) enthielt der Reaktionsansatz bezogen auf 1 mL:

35	μmol	Tris/HCl-Puffer pH 8,0
25	μmol	MgCl ₂
0,2	μmol	CoA
0,2	μmol	ATP
3,5	μmol	3-Oxadipat (Präparation siehe 2.8.4.)
10	μL	verdünnter Rohextrakt

2.9. Enzymreinigungen

Die chromatographischen Trennungen zur Reinigung der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 wurden bei 4°C und die chromatographischen Trennungen zur Anreicherung der 3-OxadipylCoA-Thiolase bei Raumtemperatur durchgeführt, da in Vorversuchen hierdurch kein signifikanter Aktivitätsverlust zu verzeichnen war. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Fraktionen mit entsprechender Enzymaktivität auf Eis gelagert. Alle chromatographischen Trennungen wurden mit Hilfe einer FPLC-Anlage der Fa. Pharmacia (Uppsala/Schweden) durchgeführt, die aus folgenden Komponenten bestand:

- Pumpen (2 Stck.): Präzisions-Kolbenpumpe P-500
- Controller: Chromatographie-Controller GP-250-Plus
- Injektor: Injektions-Motorventil MV-7
- Detektor: Einkanal-UV-Monitor Uvicord SII mit 254 nm Filter
- Schreiber: Zweikanal-Laborschreiber REC-102
- Fraktionssammler: Frac-100

2.9.1. 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase-Reinigung

2.9.1.1. Hitzefällung

Die eingesetzte Menge zellfreien Rohextraktes (25 mL) aus *Pseudomonas* sp. B13 wurde in einem Metallbecher im Wasserbad für 15 Minuten unter schwenken auf 59°C erhitzt, anschließend im Eisbad gekühlt und das ausgefallene Protein bei 8.000 x g und 4°C über 20 Minuten abzentrifugiert (Sigma-Zentrifuge 3-K-1). Der aktive Überstand wurde abgehebert und zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das Pellet wurde in 3 mL **Puffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 0,5 mM EDTA)** digeriert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum abgehebert, mit dem zuerst gelagerten Überstand vereinigt und für die nachfolgenden Reinigungsschritte eingesetzt.

2.9.1.2. Ammoniumsulfat-Präzipitation

Der hitzebehandelte Rohextrakt wurde in einem Metallbecher durch einen motorisch betriebenen Glaswendel unter Eiskühlung gerührt. Nach der Zugabe von 0,1 mM Na₂EDTA zur Bindung von Schwermetallionen wurde schrittweise festes Ammoniumsulfat bis zu einem Sättigungsgrad von 75% hinzugefügt und 30 Minuten nachgerührt. Das ausgefallene Protein wurde bei 4°C 20 Minuten mit 8.000 x g abzentrifugiert (Sigma-Zentrifuge 3-K-1). Der inaktive Überstand wurde abgehebert und verworfen. Das Pellet wurde in **Puffer B (50 mM Tris/HCl, pH 7,0, 1,0 mM EDTA, 1 M (NH₄)₂SO₄)** zu einem Gesamtvolumen von 30 mL digeriert und erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Der klare Transferase-aktive Überstand wurde sofort für nachfolgende Reinigungsschritte eingesetzt.

2.9.1.3. Phenyl-Sepharose CL-4B Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die bereits in Puffer B vorgequollene und von „fines“ befreite Phenyl-Sepharose CL-4B (Fa. Sigma, Deisenhofen) wurde nach 10-minütigem Entgasen in eine FPLC-Säule des Typs HR16/50 (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) – Durchmesser 1,6 cm - zu einer Höhe von 20 cm gefüllt. Die Säule wurde anschließend durch Spülen mit Puffer B äquilibriert. Die Auftragung der Ammoniumsulfat-haltigen Fraktion (aus 2.9.1.2.) erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 mL/min. Nichtbindendes Protein wurde durch Spülen der Säule mit 150 mL Puffer B bei einer Flussrate von 1 mL/min entfernt. Die Elution der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase erfolgte durch 30 mL Puffer A in einem linearen Salzgradienten von 1,0–0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Gradientensteilheit betrug 35 mM/mL bei einer Flussrate von 1 mL/min. Fraktionen von 2 mL Volumen wurden gesammelt und wie unter 2.8.4. beschrieben auf Transferase-Enzymaktivität getestet. Die 10 aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und durch mehrfache Ultrafiltration (siehe 2.9.1.4) über eine DIAFLO[®] YM10-Membran (Fa. Amicon, Beverly, USA) eingeeengt, durch Spülen entsalzt und in Puffer A überführt. Die so erhaltene Proteinlösung wurde für den nächsten Reinigungsschritt eingesetzt.

2.9.1.4. Ultrafiltration und Ultrafiltrations-Zentrifugation

Zum Entsalzen und Einengen größerer Volumina an Proteinlösung diente die Ultrafiltration. Unter ständigem Rühren wurde hierzu bei einem Heliumdruck von ca. 2 bar in einer 10 mL Ultrafiltrationszelle (Modell 75 PSI, Fa. Amicon, Beverly, USA) über eine Ultrafiltrationsmembran (DIAFLO[®] YM10 bzw. DIAFLO[®] YM30, Fa. Amicon, Beverly, USA) eingeeengt und mit dem jeweils gewünschten Puffer gespült.

Gleichfalls diente zur Entsalzung und Konzentrierung von Proteinlösungen die Ultrafiltrations-Zentrifugation, bei der die Proben in verschiedenen Ultrafiltrationseinheiten (Centriplus[™] 100-, Centriprep[™] 100-, Centriprep[™] 50-, Microcon[™] 50-Filter, Fa. Amicon, Beverly, USA) entsprechend den Herstellerangaben eingeeengt und gespült wurden. Die verwendeten Ultrafiltrationseinheiten sind jeweils unter den entsprechenden Punkten beschrieben (2.9.3.1.; 2.9.3.2.; 2.9.3.3.). Folgende Zentrifugen wurden verwendet: Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Fa. Du Pont, Bad Nauheim (Centriplus), Sigma-

Zentrifuge 3-K-1(Centriprep), Hermele Z 233M – Tischzentrifuge, Fa. Hermele, Wehingen (Microcon).

Die entsalzte Fraktion wurde im entsprechenden Puffer aufgenommen und für den nächsten Reinigungsschritt eingesetzt.

2.9.1.5. Mono Q[®] Ionenaustauschchromatographie

Die entsalzten und vereinigten Fraktionen aus 2.9.1.3. wurden bei einer Flussrate von 0,3 mL/min auf eine zuvor mit Puffer A äquilibrierte Säule (Typ Mono Q[®] HR 5/5, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Anschließend wurde nichtbindendes Protein bei einer Flussrate von 0,5 mL/min mit 10 mL Puffer A von der Säule gespült. Die nachfolgende Elution erfolgte bei einer Flussrate von 0,5 mL/min durch 20 mL Puffer A und einem linearen Salzgradienten von 0-1,0 M NaCl. Die Gradientensteilheit betrug 50 mM/mL. Es wurden Fraktionen von 0,25 mL gesammelt und auf Transferase-Aktivität getestet (2.8.4.). Die 4 aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration wie unter Punkt 2.9.1.4 (Filter: DIAFLO[®] YM30, Fa. Amicon, Beverly, USA) beschrieben zu 0,2 mL eingengt und direkt für den nächsten Reinigungsschritt eingesetzt.

2.9.1.6. Superose[®] 6 Gelfiltration

Die verwendete Säule (Typ Superose[®] 6, HR 10/30, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde durch Spülen mit **Puffer C (150 mM Tris/HCl, pH 7,0, 100 mM KCl, 1 mM EDTA)** äquilibriert. Nach dem Auftragen der eingengten Proteinlösung aus 2.9.1.5. wurden bei gleicher Flussrate von 0,4 mL/min Fraktionen von 0,2 mL gesammelt und auf Transferase-Aktivität getestet (2.8.4.). Die 10 aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und die so erhaltene Enzymlösung durch Ultrafiltration über eine DIAFLO[®] YM10-Membran (Fa. Amicon, Beverly, USA) zu einem Volumen von 1 mL konzentriert.

2.9.2. Lagerung der Transferasepräparation

Die unter 2.9.1.6. erhaltene 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase-Lösung (1 mL) wurde mit

Glycerin zu einem Volumen von 2 mL verdünnt. Diese Enzymlösung, welche im weiteren als Transferase-Enzympräparation bezeichnet wird, wurde in 0,5 mL-Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Entnahme erfolgte zügig und ohne Erwärmung des Vorrates.

2.9.3. 3-OxoadipylCoA-Thiolase-Reinigung

2.9.3.1. DEAE-Sepharose CL-6B Ionenaustauschchromatographie

Die verwendete DEAE-Sepharose CL-6B (Fa. Sigma, Deisenhofen) wurde in **Puffer D (25 mM Tris/HCl, pH 7,0, 0,5 mM DTT)** vorgequollen und von „fines“ befreit. Nach 10-minütigem Entgasen wurde die DEAE-Sepharose CL-6B in eine FPLC-Säule des Typs M26/40 – Durchmesser 2,5 cm – zu einer Höhe von 17 cm gefüllt. Die Säule wurde anschließend durch Spülen mit Puffer D äquilibriert.

Vor dem Auftragen auf die Säule wurden 5 mL Rohextrakt (100 mM an Tris/HCl) mit 25 mL Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 7,0, 0,5 mM DTT) zu einer finalen Pufferkonzentration von 25 mM Tris/HCl verdünnt. Der verdünnte Rohextrakt wurde bei einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Anschließend wurde nichtbindendes Protein durch Spülen der Säule mit 175 mL Puffer D bei einer Flussrate von 1 mL/min entfernt. Die Elution der 3-OxoadipylCoA-Thiolase erfolgte durch 90 mL **Puffer E (25 mM Tris/HCl, pH 7,0, 0,5 mM DTT, 1 M KCl)** in einem linearen Salzgradienten von 0-1,0 M KCl. Die Gradientensteilheit entsprach 11,11 mM/mL. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 3 mL/min wurden Fraktionen von 6 mL gesammelt. Die 6 aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltrations-Zentrifugation wie unter Punkt 2.9.1.4. beschrieben entsalzt und zu 3,1 mL aufkonzentriert (Filter: Centriplus™ 100, Fa. Amicon, Beverly, USA). Diese Proteinlösung wurde für den nächsten Reinigungsschritt eingesetzt.

2.9.3.2. Cibacron Blue 3G-A Agarose-Affinitätschromatographie

Die bereits vorgequollene Cibacron Blue 3G-A Agarose (Typ 5000-CL; Fa. Sigma, Deisenhofen) wurde mehrfach mit Puffer D gespült, von „fines“ befreit und nach 10-minütigem Entgasen in eine FPLC-Säule des Typs H10/16 (Fa. Pharmacia, Uppsala,

Schweden) – Durchmesser 1 cm – zu einer Höhe von 11 cm gefüllt. Die Säule wurde durch Spülen mit Puffer D äquilibriert.

Die unter 2.9.3.1. erhaltene Proteinlösung wurde bei einer Flussrate von 0,25 mL/min auf die Säule aufgetragen. Durch Spülen mit 30 mL Puffer D und bei einer Flussrate von 0,5 mL/min wurde nichtbindendes Protein entfernt. Die Elution der 3-OxoadipylCoA-Thiolase erfolgte durch 100 mL Puffer E bei einer Flussrate von 1 mL/min in einem linearen Salzgradienten von 0-1,0 M KCl und einer Gradientensteilheit von 10 mM/mL. Elutionen von 1 mL Volumen wurden gesammelt und die 9 aktivsten Fraktionen vereinigt. Entsalzen und Aufkonzentrieren erfolgte durch Ultrafiltrations-Zentrifugation wie unter Punkt 2.9.1.4. beschrieben (Filter: Centriprep™ 100, Fa. Amicon, Beverly, USA) zu einem Volumen von 3,15 mL. Diese Proteinlösung wurde für den nächsten Reinigungsschritt eingesetzt.

2.9.3.3. Reactive Brown 10 Agarose-Affinitätschromatographie

Die mehrfach mit Puffer D gespülte vorgequollene Reactive Brown 10 Agarose (Fa. Sigma, Deisenhofen) wurde von „fines“ befreit und nach 10-minütigem Entgasen in eine FPLC-Säule des Typs H 16/16 (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) – Durchmesser 1,6 cm – zu einer Höhe von 11 cm gefüllt. Äquilibration der Säule erfolgte durch Spülen mit Puffer D.

Die Proteinlösung aus 2.9.3.2. wurde bei einer Flussrate von 0,25 mL/min auf die Säule aufgetragen. Nichtbindendes Protein wurde durch Spülen der Säule mit 70 mL Puffer D bei einer Flussrate von 1 mL/min entfernt. Die Elution der 3-OxoadipylCoA-Thiolase erfolgte durch einen linearen Salzgradienten von 0-1,0 M KCl in 100 ml Puffer E bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 mL/min und einer Gradientensteilheit von 10 mM/mL. Es wurden Fraktionen von 2 mL Volumen gesammelt. Die 7 aktivsten Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltrations-Zentrifugation wie unter Punkt 2.9.1.4. beschrieben (Filter: Centriprep™ 50 und Microcon™ 50, Fa. Amicon, Beverly, USA) aufkonzentriert und durch mehrfaches Spülen in 120 µL Lagerungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,0, 0,5 mM DTT) überführt.

2.9.4. Lagerung der Thiolasepräparation

Die unter Punkt 2.9.3.3. erhaltene Enzymlösung wurde zu gleichen Teilen mit Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert. Die Entnahme dieser im weiteren als Thiolase-Enzympräparation bezeichneten Lösung erfolgte zügig und ohne Erwärmung des Vorrates.

2.10. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.10.1. Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen

Die einzelnen Stufen der Enzymanreicherungen sowie die angereicherten Enzympräparationen wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf ihre Reinheit überprüft. Hierzu wurde ein Gel mit einer Schichtdicke von 1 mm und folgender Zusammensetzung hergestellt:

Trenngel

9,65	mL	30 % Acrylamidlösung (Mono-/Bisverhältnis 30:0,8)
6,00	mL	Puffer 1 (1,5 M Tris/HCl, pH 8,5, 0,4% SDS)
8,35	mL	bidestilliertes Wasser
75	μL	10% Ammoniumpersulfatlösung
10	μL	N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin (TEMED)

Sammelgel

1,25	mL	30 % Acrylamidlösung (Mono-/Bisverhältnis 30:0,8)
2,00	mL	Puffer 2 (0,5 M Tris/HCl, pH 6,7, 0,1% SDS)
4,75	mL	bidestilliertes Wasser
50	μL	10% Ammoniumpersulfatlösung
10	μL	TEMED

Die Proben wurden mit Aufschlusspuffer denaturiert. Hierzu wurde jeweils 10 μL Probe mit einem Gehalt an Protein zwischen 5 und 20 μg , mit 10 μL Puffer folgender Zusammensetzung 5 Minuten bei 90°C inkubiert:

0,125 M	Tris/HCl pH 6,8
4%	SDS
20%	Glycerin
10%	2-Mercaptoethanol
0,05%	Bromphenolblau

Folgender Elektrophoresepuffer (pH 8,5) wurde verwendet:

3,0	g	Tris
14,4	g	Glycin
1,0	g	SDS
ad 1	L	bidestilliertes Wasser

Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C. Die Spannung wurde 1,5 Stunden bei 100 V und 4,5 Stunden bei 200 V gehalten. Anschließend wurde das Gel sofort in einer wässrigen Fixierlösung (30% Methanol, 10% Eisessig) fixiert.

2.10.1.1. Färbung der Proteinbanden des SDS-Polyacrylamidgels

Silverstain-Färbung

Das zu färbende Gel wurde durch mehrfaches Spülen mit Fixierlösung (30% Methanol, 10% Eisessig) von SDS und Tris befreit. Die Färbung erfolgte über mehrere Arbeitsschritte, wobei jeweils ein Volumen von 200 mL der im Folgenden aufgelisteten wässrigen Lösungen eingesetzt wurde:

Zusammensetzung	Einwirkungsdauer
50% Methanol, 15% Eisessig, 2% CuCl_2	15 min
10% Ethanol, 5% Eisessig	15 min
0,002% KMnO_4	15 min
10% Ethanol, 5% Eisessig	15 min
10% Ethanol	15 min
Bidestilliertes Wasser	15 min
0,2% AgNO_3	15 min

Nach zweimaligem Waschen in bidestilliertem Wasser für jeweils ca. 20 Sekunden wurden die Banden mit nachfolgender Lösung entwickelt:

2% K_2CO_3 , 40 μL 37% Formaldehyd bis Banden gut sichtbar waren

Anschließend erfolgte mehrmaliges Waschen in bidestilliertem Wasser. Das Gel wurde nach der Färbung fotografiert bzw. gescannt und in 20%iger Glycerin-Lösung gelagert.

Coomassie-Färbung

Das fixierte SDS-Gel wurde für ca. 3 Stunden in der nachfolgend beschriebenen Färbelösung geschwenkt:

525 mg Coomassie Brilliant Blue R250
 150 ml Methanol
 150 ml bidestilliertes Wasser
 30 ml Eisessig

Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel in einer wässrigen Entfärberlösung (10% Eisessig, 30% Methanol) geschwenkt. Die Entfärberlösung wurde dabei mehrmals gegen frische Lösung ausgetauscht.

2.10.1.2. Molekulargewichtsbestimmung

3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase

Zur Molekulargewichtsbestimmung der Transferase-Untereinheiten durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde folgende Eichgerade unter Verwendung von Standardproteinen (Fa. Sigma, Deisenhofen) erstellt:

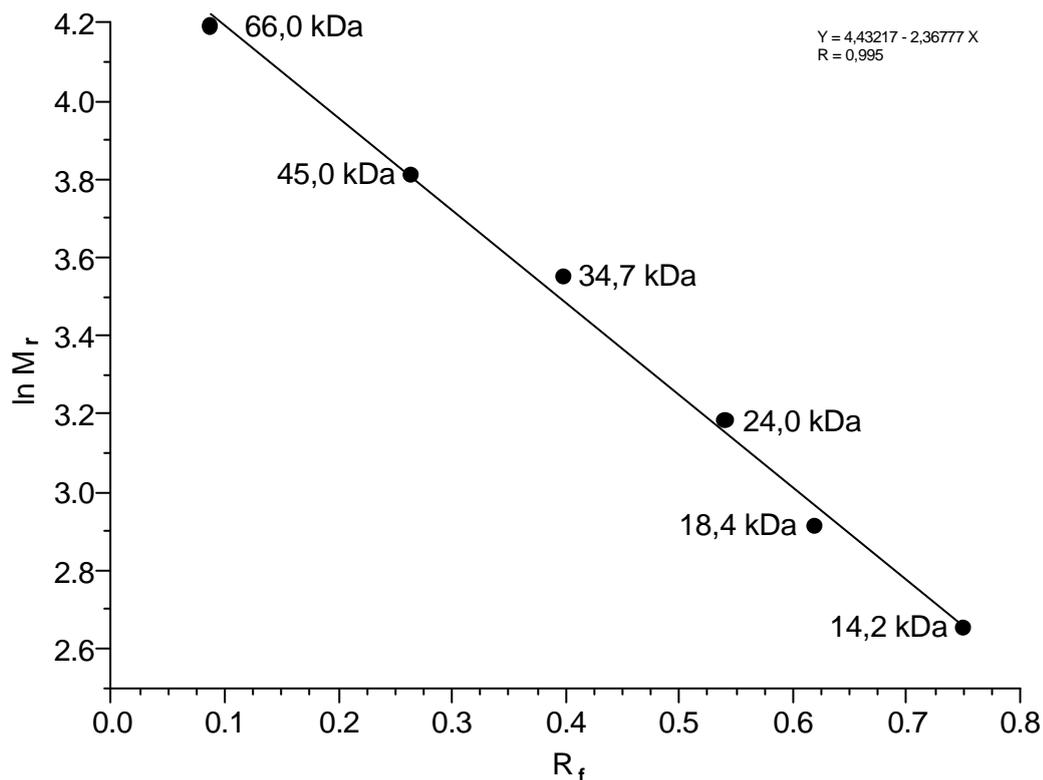


Abb. 6: Eichgerade zur Bestimmung der Größe der Enzym-Untereinheiten der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase.

Standardproteine (Fa. Sigma, Deisenhofen): 66 kDa [Rinderserum-Albumin, $R_f = 0,088$], 45 kDa [Ovalbumin, $R_f = 0,265$], 34,7 kDa [Pepsin, $R_f = 0,398$], 24 kDa [Trypsinogen, $R_f = 0,541$], 18,4 kDa [β -Lactoglobulin, $R_f = 0,619$], 14,2 kDa [α -Lactalbumin, $R_f = 0,751$]

3-OxoadipylCoA-Thiolase

Die Größenbestimmung der Thiolase-Untereinheit durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte mittels folgender Eichgerade unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Proteinstandards (Dalton Mark VII-L, Fa. Sigma, Deisenhofen):

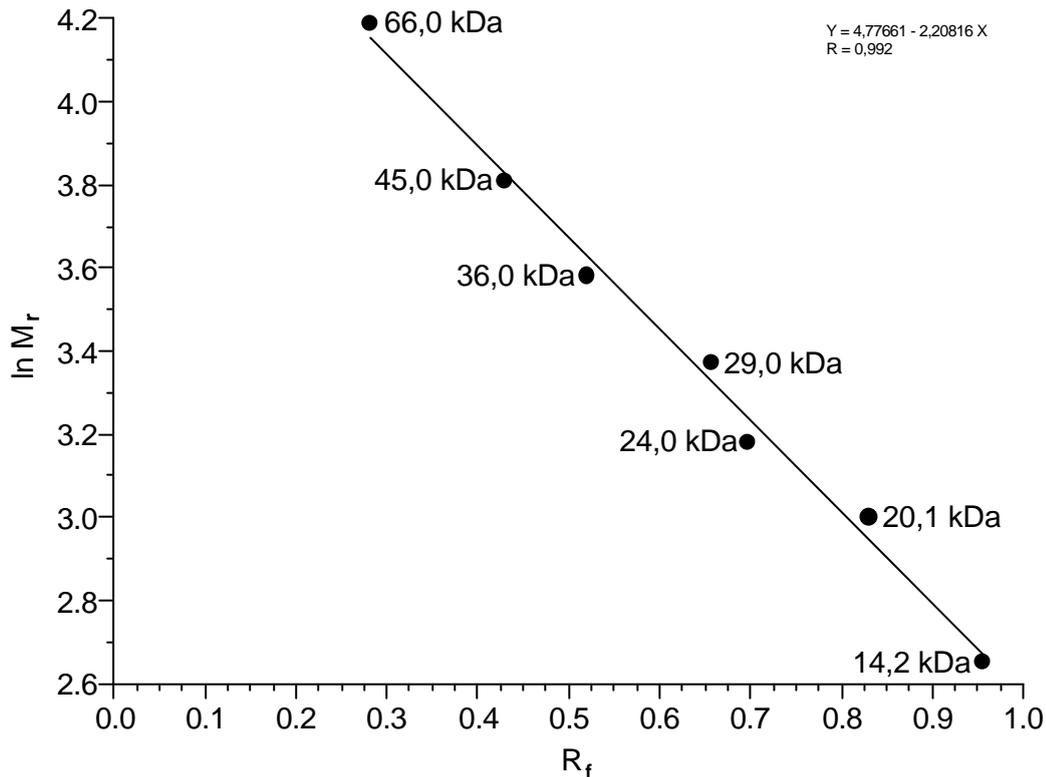


Abb. 7: Eichgerade zur Bestimmung der Größe der Enzym-Untereinheit der 3-OxoadipylCoA-Thiolase.

Standardproteine (Dalton Mark VII-L, Fa. Sigma, Deisenhofen): 66 kDa [Rinderserum-Albumin, $R_f = 0,281$], 45 kDa [Ovalbumin, $R_f = 0,430$], 36 kDa [Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, $R_f = 0,521$], 29 kDa [Carbonsäure-Anhydrase, $R_f = 0,657$], 24 kDa [Trypsinogen, $R_f = 0,698$], 20,1 kDa [Trypsin-Inhibitor, $R_f = 0,831$], 14,2 kDa [α -Lactalbumin, $R_f = 0,955$].

2.10.2. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz von Proteinen

Die für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz gedachten SDS-Polyacrylamidgele aus 2.10.1. wurden ohne Fixierung und ohne die unter 2.10.1.1. beschriebene Färbung geblottet (KHYSER-ANDERSEN 1984) („semi dry blotting“). Hierdurch wurden die zuvor getrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen. Die Sequenzierung erfolgte am Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf, Außenstelle Jülich, durch Frau Müller und Herrn Dr. Elling.

2.10.2.1. Elektroblotting nach KHYSER-ANDERSEN (1984)

Das SDS-Polyacrylamid-Gel wurde nach erfolgter Elektrophorese gründlich mit bidestilliertem Wasser gewaschen und im Kathodenpuffer (25 mM Tris, 40 mM ϵ -Amino-*n*-hexansäure, pH 9,4, 10% Methanol) äquilibriert.

Die für das Blotting verwendete PVDF-Membran (Amersham Highbond polyvinylidene difluoride membrane, Fa. Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, USA) wurde 5 min in Methanol eingelegt, mit Wasser gewaschen und anschließend 5 min im Anodenpuffer II (25 mM Tris, pH 10,4, 10% Methanol) äquilibriert.

Zwei mit Anodenpuffer I (0,3 M Tris, pH 10,4, 10% Methanol) befeuchtete Filterpapiere wurden auf die Anode der Blotting-Apparatur (Bio-Rad Trans Blot SD, Fa. Bio-Rad, München) gelegt. Ein weiteres mit Anodenpuffer II befeuchtetes Filterpapier wurde auf die bereits aufgebrauchten Filterpapiere aufgebracht. Anschließend erfolgte die Aufbringung der PVDF-Membran, dann des Gels und schließlich drei mit Kathodenpuffer befeuchtete Filterpapiere. Abschließend erfolgte die Auflegung des Kathoden-Deckels. Bei allen Arbeitsschritten wurde auf unbedingte Luftblasenfreiheit zwischen den Schichten geachtet. Die Filterpapiere sowie die PVDF-Membran entsprachen in ihrer Größe dem eingesetzten Gel. Das Elektroblotting erfolgte mit einer Stromdichte von 1,5 mA pro cm² Geloberfläche über einen Zeitraum von 45 Minuten. Anschließend wurden die Proteinbanden auf der Membran mit Amidoschwarz gefärbt.

Amidoschwarzfärbung

Zur Anfärbung der Proteinbanden in 2.10.2.1. wurde die Membran nach dem Blotten gründlich mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend 30 min in einer Amidoschwarzlösung (0,1 % Lösung von Amidoschwarz (Fa. Sigma, Deisenhofen) in Methanol/Eisessig/Wasser 40:10:50 v/v/v) gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch mehrfaches Waschen der Membran mit „Entfärber-Lösung“ (Methanol/Eisessig/Wasser 25:10:65 v/v/v) entfernt, wodurch die gefärbten Proteinbanden sichtbar wurden.

2.11. Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration

3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase

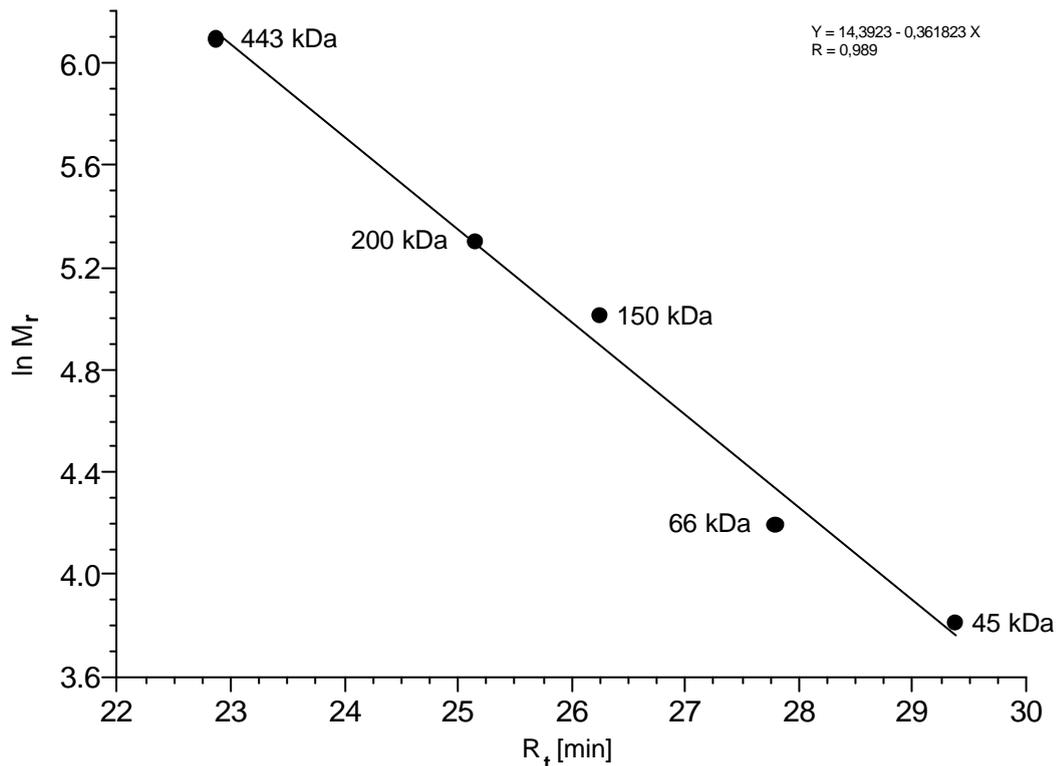


Abb. 8: Eichgerade zur Bestimmung der nativen Größe der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase durch Gelfiltration über eine Superose[®] 12 Gel-Säule (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden).

Proteinstandards (Fa. Sigma, Deisenhofen): 443 kDa [Pferde-Ferritin, $R_t = 22,88$ min], 200 kDa [Süßkartoffel- β -Amylase, $R_t = 25,15$ min], 150 kDa [Alkohol-Dehydrogenase, $R_t = 26,25$ min], 66 kDa [Rinderserum-Albumin, $R_t = 27,8$ min], 45 kDa [Ovalbumin, $R_t = 29,38$ min].

Die verwendete Superose[®] 12 Gel FPLC-Säule (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde durch Spülen mit Laufpuffer (150 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM KCl) äquilibriert. Jeweils 100 μ L Probe wurden bei einer Flussrate von 0,4 mL/min auf die Säule aufgegeben. Eluiertes Protein wurde mit Hilfe eines UV-Detektors (Uvicord SII, Fa. Pharmacia, Uppsala,

Schweden) bei 254 nm registriert. Die Erstellung einer Eichgerade erfolgte mit Hilfe kommerziell erhältlicher Proteinstandards.

3-Oxoacetyl-CoA-Thiolase

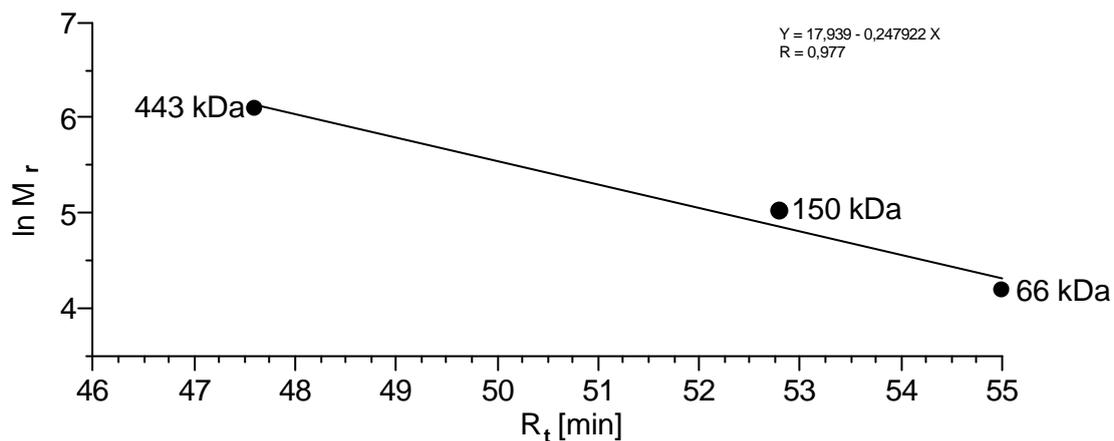


Abb. 9: Eichgerade zur Bestimmung der nativen Größe der 3-Oxoacetyl-CoA-Thiolase durch Gelfiltration über eine Superose[®] 6 Gel-Säule (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden). Proteinstandards (Fa. Sigma, Deisenhofen): 443 kDa [Pferde-Ferritin, $R_t = 47,6$ min], 150 kDa [Alkohol-Dehydrogenase, $R_t = 52,8$ min], 66 kDa [Rinderserum-Albumin, $R_t = 55,0$ min].

Die verwendete Superose[®] 6 Gel FPLC-Säule (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde durch Spülen mit Laufpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM KCl) äquilibriert. Jeweils 100 μ L Probe wurden bei einer Flussrate von 0,3 mL/min auf die Säule aufgegeben. Eluiertes Protein wurde mit Hilfe eines UV-Detektors (Uvicord SII, Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) bei 254 nm registriert. Die Erstellung einer Eichgerade erfolgte mit Hilfe kommerziell erhältlicher Proteinstandards.

2.12. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Analyse von CoA-Estern, welche als Edukte bzw. Produkte am enzymatischen Umsatz der 3-Oxadipate beteiligt sind, erfolgte durch reverse-phase-HPLC. Als Säulenmaterial wurde LiChrosphere[®] 100Å RP-18 (Fa. Merck, Darmstadt; refilled Fa. Knauer, Berlin) verwendet. Als mobile Phase diente 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 5,7, 8% Methanol bei einer Flussrate von 1 mL/min oder 1,1 mL/min. Da das Säulenmaterial unpolarer als das Fließmittel ist, erfolgte Auftrennung nach aufsteigend lipophilem Charakter der detektierten CoA-Ester. Die Detektion erfolgte bei 260 nm im UV-Maximum der Absorption von CoA-Estern.

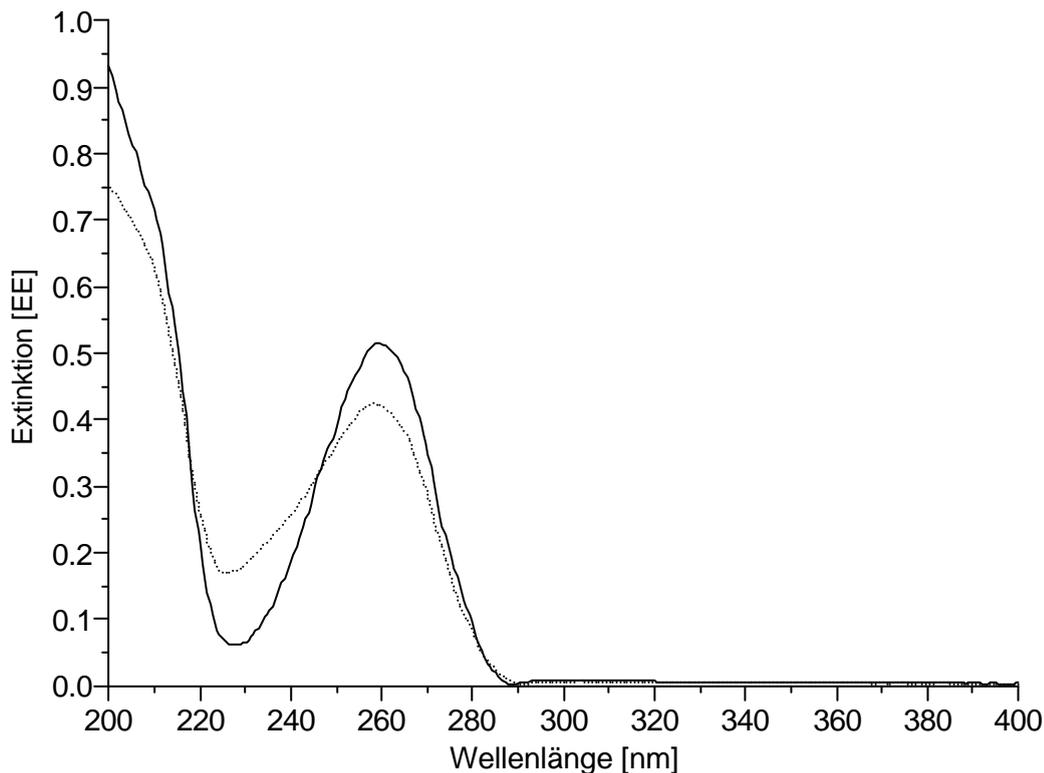


Abb. 10: Das UV-Spektrum von Coenzym A (40 µM) (—) und SuccinylCoA (30 µM) (.....).

Die HPLC-Anlage setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- Pumpe L 6200 (Fa. Merck-Hitachi, Tokio, Japan)

- Säule LiChrosphere® 100Å RP-18, Partikelgröße 5 µm, l = 12,5 cm,
d = 0,46 cm (Fa. Merck, Darmstadt; refilled Fa. Knauer, Berlin)

- Detektor Knauer Variable Wavelength Monitor (Fa. Knauer, Berlin)

- Integrator D-2000 Chromato Integrator (Fa. Merck-Hitachi, Tokio, Japan)

2.13. NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme von NMR-Spektren erfolgte an einem 400 MHz-Gerät (Bruker ARX 400, Fa. Bruker, USA).

Die Messfrequenz für ¹H-NMR-Spektren beträgt bei diesem Gerät 400,13 MHz, für ¹³C-NMR-Spektren 100,61 MHz. Proben wurden in d-Chloroform, d₆-Aceton oder d₄-Methanol gelöst. Als Standard diente TMS.

2.14. UV/VIS-Spektroskopie

Die Aufnahme von UV/VIS-Absorptionsspektren erfolgte in Quarzküvetten mit einem Spektralphotometer mit angeschlossenen Computer (Cary 50 Bio, Fa. Varian, Darmstadt).

2.15. Massenspektrometrie

Die Messung von Massenspektren erfolgte mit Hilfe eines Varian MAT 311A Gerätes (Fa. Varian, Darmstadt) bei einer Elektronenenergie von 70 eV.

2.19. Chemikalien

Es wurden handelsübliche p.a.-Chemikalien der Firmen Aldrich (Steinheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Lancaster (Mülheim am Main), Merck (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) verwendet. Die verwendeten Enlactone und Dienlactone wurden im Rahmen früherer Arbeiten des Arbeitskreises Chemische Mikrobiologie an der Bergischen Universität – Gesamthochschule Wuppertal chemisch synthetisiert (KASCHABEK 1995).

2.19.1. Darstellung von ChloracetylCoA

Die Darstellung von ChloracetylCoA erfolgte modifiziert nach SIMON & SHEMIN (1953) durch die Thiolyse von Chloressigsäureanhydrid mittels CoA.

Hierzu wurden 25 mg (31 μmol) CoASH unter Eiskühlung in 2,5 mL Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit festem K_2CO_3 auf pH 7,5 eingestellt. Nach der Zugabe von 1 mg (7 μmol) DTT wurde die Lösung 1 h im Eisbad gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 36 mg (210 μmol) Chloressigsäureanhydrid in 5 gleichen Portionen im Abstand von 15 min. Während der Reaktion erfolgte Kühlung im Eisbad und eine Stabilisierung des pH-Wertes auf pH 7,5 durch die Zugabe von festem K_2CO_3 . Nach vollständiger Zugabe des Chloressigsäureanhydrides wurde das Reaktionsgemisch 30 min nachgerührt. Zur Entfernung nicht umgesetzten Anhydrids wurde anschließend der pH-Wert der Lösung durch Zugabe von HCl-Lösung (1 M) auf pH 3,0 eingestellt und das Gemisch 4 x mit wässrigem Diethylether extrahiert. Nachfolgend wurde die wässrige Phase mit festem K_2CO_3 auf pH 6 eingestellt und restlicher in der wässrigen Phase verbliebener Diethylether durch Spülen mit N_2 -Gas entfernt. Die so erhaltene ChloracetylCoA-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

2.19.2. Darstellung einer etherischen Diazomethan-Lösung

In einem 100 mL Zweihalskolben wurden 2,14 g (10 mmol) N-Methyl-N-nitroso-*p*-toluolsulfonamid in 30 mL Diethylether unter Eiskühlung gelöst. Zu dieser Lösung wurde im Eisbad 0,4 g KOH gelöst in 10 mL verdünntem Ethanol (90% v/v) hinzugefügt und 5 min gerührt. Anschließend wurde die etherische Diazomethan-Lösung im Wasserbad bei 55°C und einer Kopftemperatur von 32 °C destilliert. Die hellgelbe etherische Lösung von Diazomethan wurde stets frisch zubereitet, auf Eis gelagert und ohne weitere Reinigung für Methylierungs-Reaktionen eingesetzt (3.2.3.1.).

3. Experimente und Ergebnisse

Das Kapitel Experimente und Ergebnisse unterteilt sich in 5 Teilbereiche. Im ersten Teil wird die Einführung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie als analytische Methode zur Identifizierung von CoA-Estern und die sich daraus ergebenden Möglichkeiten der Aktivitätsprüfung von Enzymen vorgestellt. Im zweiten „chemischen“ Teil dieser Arbeit werden Synthesen von Metaboliten des unteren *ortho*-Abbauweges behandelt. Der dritte Teilbereich des Kapitels betrifft die Induktion der Dienlacton-Hydrolase, der 3-Oxadipat-Enollacton-Hydrolase, der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase, der 3-OxadipylCoA-Thiolase und eines CoA und ATP abhängigen 3-Oxadipat umsetzenden Enzyms aus *Pseudomonas* sp. B13 beim Wachstum des Stammes auf unterschiedlichen Kohlenstoff- und Energiequellen. Die beiden letzten und größten Teile beschreiben die Reinigung der Enzyme 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase und 3-OxadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13, sowie deren Charakterisierung und Spezifität mit besonderem Augenmerk auf eine mögliche Aktivität gegenüber chlorierten Substraten. Die nachfolgende **Abb. 11** zeigt die beiden enzymatischen Reaktionen mit ihren „ursprünglichen“ Substraten 3-Oxadipat und 3-OxadipylCoA, die Metabolite des *ortho*-Weges beim mikrobiellen Abbau von Aromaten sind:

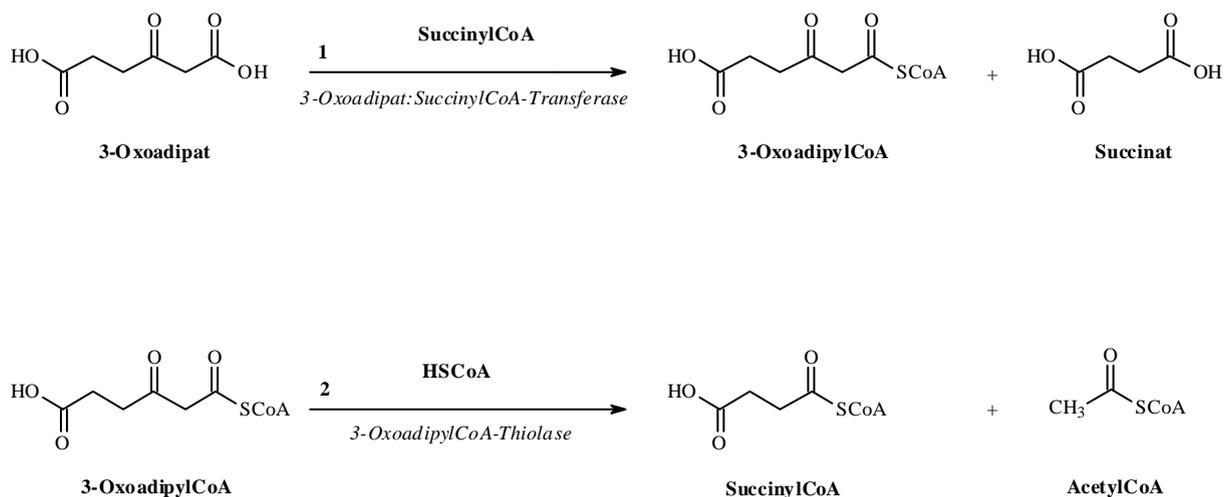


Abb. 11: Zwei Metabolite des *ortho*-Weges, 3-Oxadipat und 3-OxadipylCoA, und ihr enzymatischer Umsatz durch die 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase (1) und die 3-OxadipylCoA-Thiolase (2).

3.1. Nachweis von CoA-Derivaten beim enzymatischen Umsatz substituierter 3-Oxadipate mittels HPLC

Bei der Untersuchung des enzymatischen Umsatzes verschiedener 3-Oxadipate und 3-OxadipylCoA-Ester durch Enzyme aus *Pseudomonas* sp. B13 und *Ralstonia* sp. PS12 sollte zu den optischen Enzymtests eine weitere analytische Methode etabliert werden, da der optische Test auf der Bildung eines 3-OxadipylCoA-Mg²⁺-Komplexes beruht und eine Störung der Komplexbildung bei substituierten 3-Oxadipaten nicht auszuschließen war.

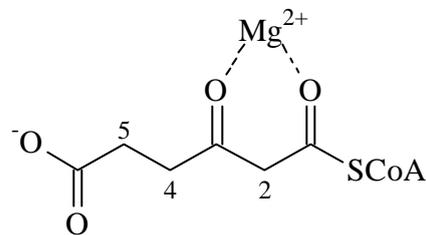


Abb. 12: Modell des 3-OxadipylCoA-Mg²⁺-Komplexes

Ein Nachweis der Enzymaktivität erfolgte mittels HPLC durch die Detektion verschiedener CoA-Ester, welche in den enzymkatalysierten Reaktionen als Edukte und Produkte erwartet wurden.

Wie in **Abb. 13** verdeutlicht, konnte durch dieses Verfahren sowohl die Abnahme an SuccinylCoA, wie auch die Bildung von 3-OxadipylCoA während des Umsatzes von 3-Oxadipat durch die 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 gezeigt werden. Ferner ließ sich der Umsatz des entstandenen 3-OxadipylCoA durch die 3-OxadipylCoA-Thiolase dokumentieren: Unter Verbrauch von CoA entstanden AcetylCoA und SuccinylCoA.

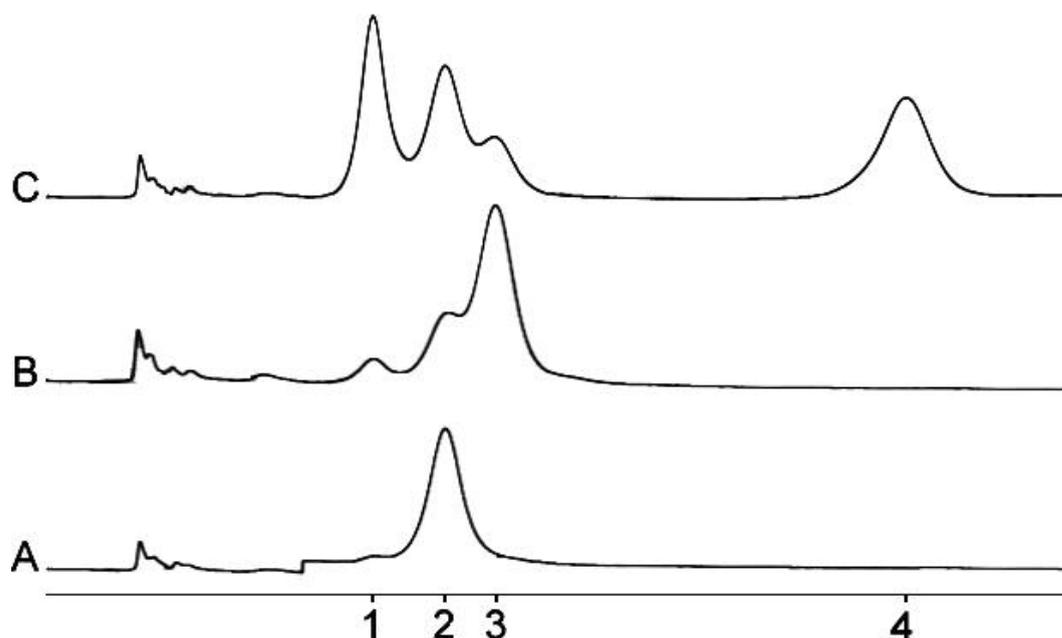


Abb. 13: HPLC von CoA-Verbindungen, die beim enzymatischen Abbau von 3-Oxadipat durch Enzyme aus *Pseudomonas* sp. B13 entstehen bzw. verschwinden oder als Cosubstrate fungieren. **1** CoA ($R_t = 6,66$ min), **2** SuccinylCoA ($R_t = 8,15$ min), **3** 3-OxadipylCoA ($R_t = 9,15$ min), **4** AcetylCoA ($R_t = 17,63$ min). **A** Chromatogramm vor der Enzymzugabe [Präparation der Probenlösung siehe 2.8.4.]. **B** Chromatogramm nach der Zugabe der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase. **C** Chromatogramm nach der Zugabe der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase und der 3-OxadipylCoA-Thiolase und von CoA. Säule: LiChrosphere® 100Å RP-18, 12,5 cm. Eluent: 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 5,7, 8% Methanol. Flussrate: 1,1 mL/min.

Da die Säulen nicht temperierbar waren, ergaben sich leichte Schwankungen des Säulendruckes und der Retentionszeiten der untersuchten CoA-Ester. Bei feststehender Flussrate blieb das Retentionsverhältnis der untersuchten CoA-Verbindungen untereinander jedoch gleich. Daher wurde die relative Retentionszeit ($R_{t,rel.}$) in bezug auf die Retentionszeit von CoA (gesetzt auf den Wert 1.0) eingeführt. Für die beiden genutzten Flussraten wurden folgende relative Retentionszeiten erhalten:

Tab. 4: Relative Retentionszeiten verschiedener CoA-Ester in Abhängigkeit von der Flussrate

Flussrate [mL/min]	$[R_{t,rel.}]$ CoA	$[R_{t,rel.}]$ SuccinylCoA	$[R_{t,rel.}]$ 3-OxadipylCoA	$[R_{t,rel.}]$ AcetylCoA
1	gesetzt 1	1,14	1,25	1,83
1,1	gesetzt 1	1,23	1,39	2,67

Die eindeutige Zuordnung der einzelnen Signale erfolgte durch die Zugabe kommerziell erhältlicher CoA-Ester. Bei verschiedenen Proben der gleichen Reaktionslösung (Stammlösung) wurde vor dem Auftragen auf die HPLC-Säule jeweils ein CoA-Ester hinzugegeben, was eine Vergrößerung des jeweiligen Peaks bewirkte.

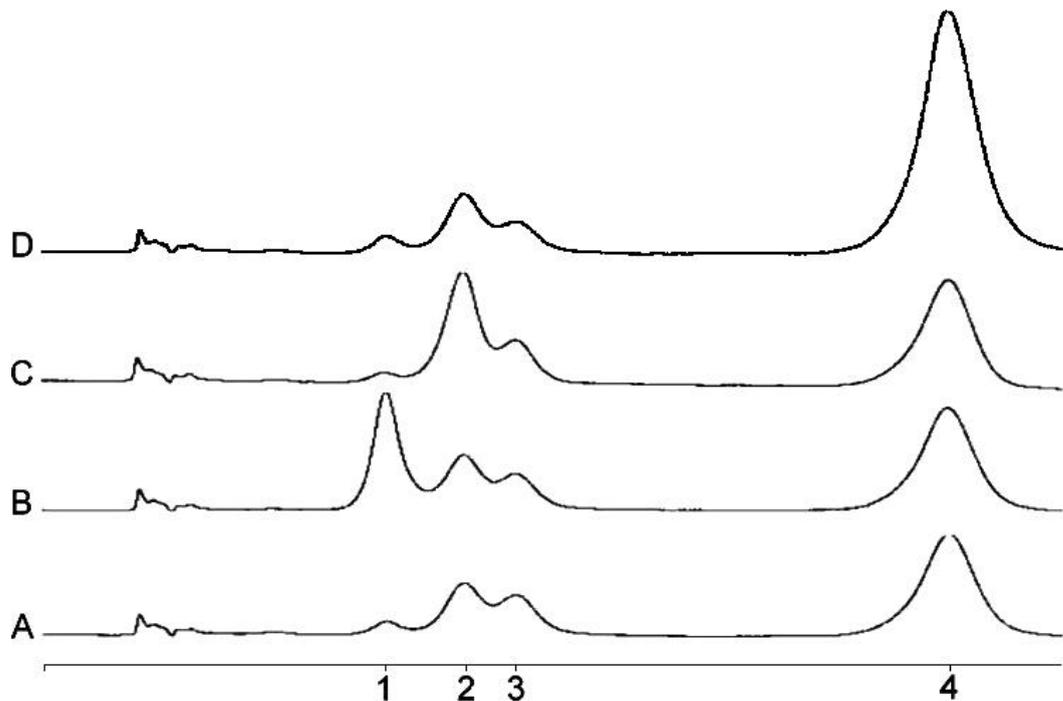


Abb. 14: HPLC-Nachweis von CoA-Verbindungen durch Aufstockung. **A** Stammlösung: Die Präparation der Stammlösung erfolgte aus 3-Oxo adipat, SuccinylCoA und CoA mittels Rohextrakt aus *Pseudomonas* sp. B13. **1** Coenzym A ($R_{t,rel.} = \text{gesetzt } 1,0$), **2** SuccinylCoA ($R_{t,rel.} = 1,23$), **3** 3-Oxo adipylCoA ($R_{t,rel.} = 1,39$), **4** AcetylCoA ($R_{t,rel.} = 2,67$). Aufstockung der Konzentration der CoA-Verbindungen in der Stammlösung: **B** durch Coenzym A, **C** durch SuccinylCoA, **D** durch AcetylCoA. Säule: LiChrosphere® 100Å RP-18, 12,5 cm. Eluent: 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 5,7, 8% Methanol. Flussrate: 1,1 mL/min.

Da 3-Oxo adipylCoA als Standard nicht kommerziell erhältlich war, konnte hiermit keine Aufstockung durchgeführt werden. Entsprechend dem Produkt der Transferase und dem Edukt der Thiolase konnte jedoch die Entstehung und der Abbau der Verbindung durch HPLC gezeigt werden.

3.1.1. Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von 3-OxoadipylCoA

Für die Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von 3-OxoadipylCoA wurde die Konzentration einer Lösung indirekt aus der Differenz der eingesetzten zur verbrauchten Menge an SuccinylCoA bei der Transferase-Bildungsreaktion durch HPLC bestimmt. Ein thermischer Zerfall von SuccinylCoA wurde hierbei durch die Bestimmung der Menge an gebildetem CoA berücksichtigt. Die Konzentrationen an SuccinylCoA und an CoA wurden durch Eichgeraden ermittelt.

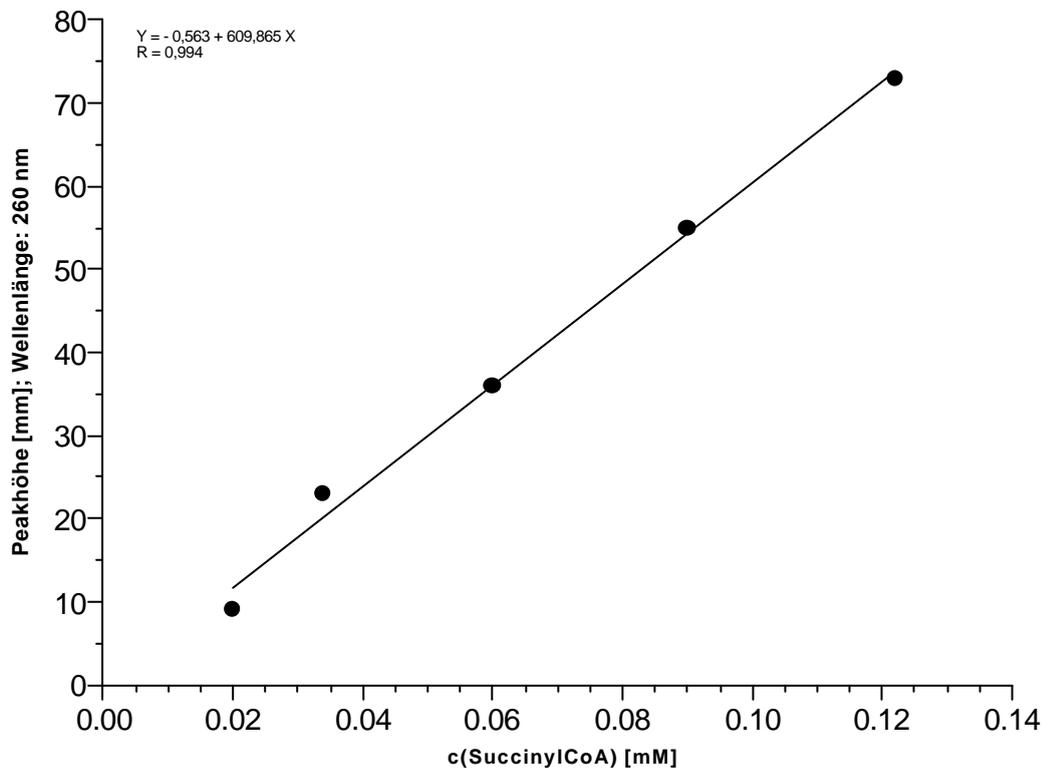


Abb. 15: Eichgerade zur Ermittlung der SuccinylCoA-Konzentration einer proteinhaltigen Lösung durch HPLC. Es wurden jeweils 10 μ L Probe auf die Säule aufgetragen. Den einzelnen Standards wurde jeweils 10 μ L Transferase-Enzympräparation pro mL hinzugesetzt, um den Versuchsbedingungen des Enzymtests zur Darstellung des 3-OxoadipylCoA zu entsprechen.

Säule: LiChrosphere[®] 100Å RP-18, 12,5 cm. Eluent: 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 5,7, 8% Methanol.

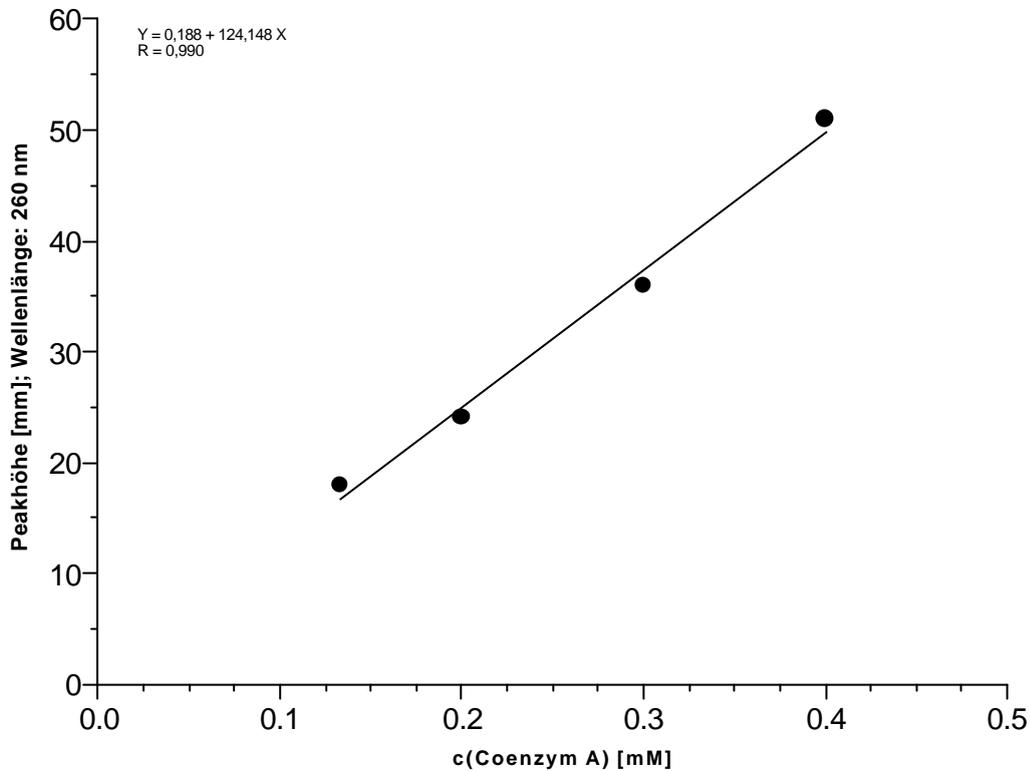


Abb. 16: Eichgerade zur Ermittlung der CoA-Konzentration einer proteinhaltigen Lösung durch HPLC. Es wurden jeweils 10 μL Probe auf die Säule aufgetragen. Den einzelnen Standards wurde jeweils 10 μL Transferase-Enzympräparation pro mL hinzugesetzt, um den Versuchsbedingungen des Enzymtests zur Darstellung des 3-OxadipylCoA zu entsprechen.

Säule: LiChrosphere[®] 100Å RP-18, 12,5 cm. Eluent: 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH: 5,7, 8% Methanol.

Durch die chromatographische Bestimmung der 3-OxadipylCoA-Konzentration einer enzymatisch präparierten Lösung (2.8.4.) und gleichzeitiger Bestimmung der Extinktion dieser Lösung konnte der molare Extinktionskoeffizient des 3-OxadipylCoA-Mg²⁺-Komplexes berechnet werden:

$$e_{\text{M}(305)} \text{ 3-OxadipylCoA} \cdot \text{Mg}^{2+} = 16.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Der ermittelte Extinktionskoeffizient ist nur gültig für die im Standardzymtest für die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase (2.8.4.) gegebenen Rahmenbedingungen (pH 8,0, 0,25 mM MgCl_2), da eine starke Abhängigkeit der Extinktion des 3-OxoadipylCoA- Mg^{2+} -Komplexes vom pH-Wert der Lösung und der Magnesiumkonzentration der Lösung gegeben ist (siehe 3.4.2.3.).

3.2. Zur Synthesen von Metaboliten des unteren 3-Oxoadipat-Weges

Die Darstellung von Metaboliten des unteren 3-Oxoadipat-Weges kann auf chemischem, enzymatischem oder mehrstufig gekoppelt chemisch/enzymatischem Wege erfolgen. Ausgehend von entsprechenden Dienlactonen und Enlactonen (siehe Anhang: Nomenklatur) wurden verschiedene Substrate für die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase synthetisiert. Dienlactone und Enlactone wurden in früheren Arbeiten des Arbeitskreises chemische Mikrobiologie durch Wittig-Reaktion dargestellt (KASCHABEK & REINEKE 1995). Als mögliches Produkt des Umsatzes von 2-Chlor-3-oxoadipat durch die Transferase und Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 wurde ChloracetylCoA synthetisiert und als Standard in der HPLC verwendet.

3.2.1. Darstellung von ChloracetylCoA

Die Darstellung von ChloracetylCoA erfolgte nach SIMON & SHEMIN (1953) (siehe Punkt 2.19.1.). Die erhaltene ChloracetylCoA-haltige Lösung wurde ohne weitere Reinigung als Standard in der HPLC verwendet.

3.2.2. Darstellung von 3-OxoadipylCoA

In Ermangelung des entsprechenden Anhydrides (3-Oxoadipinsäureanhydrid) konnte eine chemische Darstellung von 3-OxoadipylCoA nicht nach der Methode von SIMON & SHEMIN (1953) erfolgen. Die Verbindung wurde daher ausschließlich enzymatisch aus 3-Oxoadipat und SuccinylCoA dargestellt.

3.2.3. Darstellung von 2-Chlor-3-oxoadipat

2-Chlor-3-oxoadipat ist Produkt des Umsatzes von 5-Chlormaleylacetat durch die Maleylacetat-Reduktase aus *Pseudomonas* sp. B13 (siehe 3.4.2.5., S. 69, **Tab. 7**) und möglicher Metabolit beim Abbau von 3,4-Dichlorbenzoat (KASCHABEK 1995).

Nach SANDER et al. (1991) ist auch beim Abbau von 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol über 3,4,6-Trichlorbrenzkatechin 2-Chlor-3-oxoadipat als Metabolit entstanden.

HARTMANN et al. (1979) beschrieben eine Stamm WR912 der mit 3-Chlor-, 4-Chlor- und 3,5-Dichlorbenzoat wachsen kann. Dieser Stamm war durch Übertragung des TOL-Plasmides aus *Pseudomonas putida* mt-2 nach B13 entstanden. Eine weitere Selektion führte zum Wachstum mit 3,4-Dichlorbenzoat (HARTMANN, unveröffentlicht). Dies bedeutete, dass der Stamm B13 in der Lage sein musste, den Abbau von 3,4-Dichlorbrenzkatechin durchzuführen, d. h. 2-Chlor-3-oxoadipat sollte also mineralisiert werden können. Leider ist der Stamm, der sich als schlecht handhabbar zeigte, verloren gegangen.

Interessant in diesem Zusammenhang ist also die Frage, ob die 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 als Folgeenzym der Maleylacetat-Reduktase in der Lage ist, 2-Chlor-3-oxoadipat als Substrat zu nutzen.

Zur Darstellung von 2-Chlor-3-oxoadipat-Lösungen diene die alkalische Hydrolyse von 5-Chlor-*trans*-enlacton. Die alkalische Hydrolyse von 5-Chlor-*trans*-enlacton erfolgte bei Raumtemperatur mittels aliquoter Mengen an NaHCO₃-Lösung um einen Anstieg des pH-Wertes während der Hydrolyse > pH 8 zu vermeiden. Bei Hydrolyseversuchen, in denen aliquote Mengen NaOH-Lösungen anstelle der NaHCO₃-Lösung eingesetzt wurden, konnte eine teilweise nucleophile Substitution des Chlors unter Freisetzung von Chlorid beobachtet werden.

Ein Abnahme des pH-Wertes unter pH 6,5 ist bei der Hydrolyse ebenfalls zu vermeiden, da ansonsten eine spontane Decarboxylierung des 2-Chlor-3-oxoadipats erfolgt (**Abb. 17**). Diese Eigenschaft von 3-Oxadipaten sowie auch von anderen 3-Ketocarbonsäuren, wie z.B. Maleylacetat, wurde bereits mehrfach beschrieben (SCHMIDT & KNACKMUSS 1980, CHAPMAN & RIBBONS 1976).

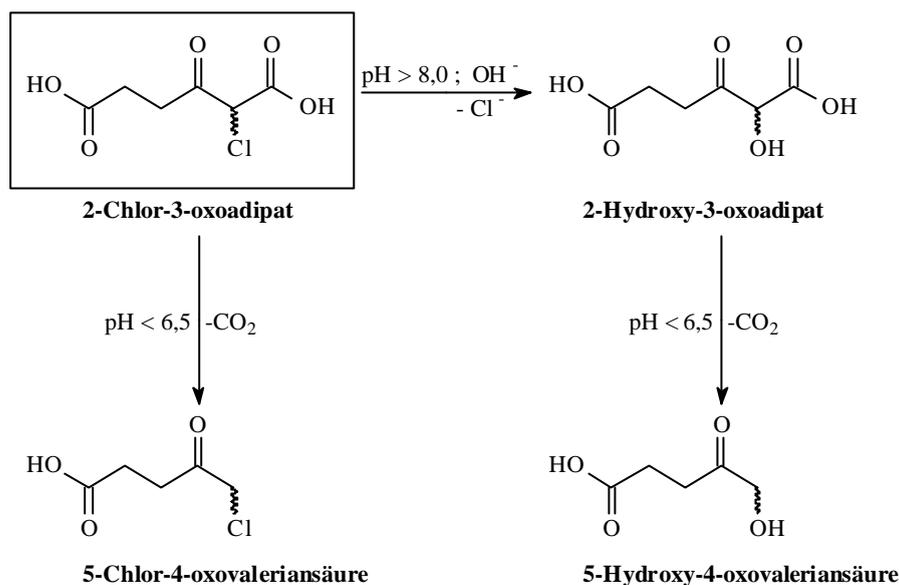


Abb. 17: Chemischen Stabilität von 2-Chlor-3-oxoadipat in wässrigen Lösungen in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Der Nachweis von 2-Chlor-3-oxoadipat erfolgte als Methylester-Derivat des Decarboxylierungsproduktes (5-Chlor-4-oxovaleriansäure) und des dehalogenierten, hydroxylierten Decarboxylierungsproduktes (5-Hydroxy-4-oxovaleriansäure) von 2-Chlor-3-oxoadipat (siehe Punkt 3.2.3.1.), da eine Isolierung und der direkter Nachweis des 2-Chlor-3-oxoadipates aufgrund der geringen Stabilität der Verbindung nicht möglich war.

Neben der alkalischen Hydrolyse wurde 2-Chlor-3-oxoadipat auch auf enzymatischem Weg aus 5-Chlor-*cis/trans*-dienlacton mittels Dienlacton-Hydrolase und Maleylacetat-Reduktase aus *Pseudomonas* sp. B13 dargestellt und in Versuchen zum Substratspektrum der Transferase eingesetzt (siehe 3.4.2.5.).

3.2.3.1. Indirekter Nachweis von 2-Chlor-3-oxoadipat durch Derivatisierung

3.2.3.1.1. Darstellung von 5-Chlor-4-oxovaleriansäuremethylester (= 5-Chlor-4-oxopentansäuremethylester)

100 mg 5-Chlorenlacton (0,57 mmol) wurden in 11 mL NaHCO_3 -Lösung (100 mM) gelöst und diese Lösung anschließend 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nachfolgend wurde die Lösung mit NaCl gesättigt sowie mit einigen Tropfen konz. HCl-Lösung auf $\text{pH} \sim 2$ eingestellt. Hierbei konnte eine Gasentwicklung entsprechend der Decarboxylierungsreaktion

des 2-Chlor-3-oxoadipats beobachtet werden (siehe Punkt 3.2.3.). Die so erhaltene Lösung wurde im Eisbad gekühlt und mit 3 x 15 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und tropfenweise mit etherischer Diazomethan-Lösung versetzt, bis eine leichte Gelbfärbung der Reaktionslösung erhalten blieb sowie keine weitere N₂-Entwicklung mehr zu beobachten war. 15 Minuten nach der letzten Zugabe von Diazomethanlösung wurde die Reaktionslösung erneut über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

Ausbeute: 25 mg hellgelbes Öl (entspricht 27 % Ausbeute)

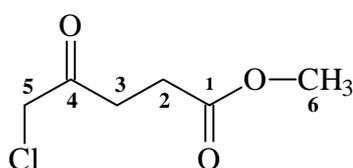


Abb. 18: 5-Chlor-4-oxovaleriansäuremethylester

¹H-NMR (CDCl₃) δ [ppm]: 4,11 (s, 2H, R(CO)CH₂Cl), 3,65 (s, 3H, CH₃OR), 2,87 [(t, 2H, CH₂Cl(CO)CH₂CH₂R), ³J(H,H) = 6,4 Hz], 2,63 [(t, 2H, CH₂Cl(CO)CH₂CH₂R) ³J(H,H) = 6,4 Hz]. ¹³C-NMR {¹H} (CDCl₃) δ [ppm]: 201,2 (4), 172,7 (1), 51,8 (6), 48,1 (5), 34,3 (3), 27,8 (2). **MS** *m/z* (% rel. Intensität): 135 (34) / 133 (96) [M⁺ - OCH₃], 116 (16), 115 (91) [M⁺ - CH₂Cl], 114 (15), 87 (26)[M⁺-COCH₂Cl], 79 (23) / 77 (78)[COCH₂Cl], 59 (100)[CO₂CH₃], 55 (91)[M⁺-CH₂Cl, -CO₂CH₃, -H], 51 (14) / 49 (42) [CH₂Cl⁺], 45 (52). Dies entspricht den in der Literatur gefundenen Daten. Lit.: MONTFORTS et al. (1990); SANDER et al. (1991); SEGATE-DIOURY et al. (2000).

3.2.3.1.2. Darstellung von 5-Hydroxy-4-oxovaleriansäuremethylester (= 5-Hydroxy-4-oxopentansäuremethylester)

100 mg 5-Chlor-*trans*-enlacton (0,57 mmol) wurden in 1,5 mL NaOH-Lösung (1 M) gelöst und mit Wasser zu 10 mL verdünnt. Die Lösung wurde für einige Sekunden zum Sieden erhitzt. Hierdurch wurde eine weitgehend vollständige Dehalogenierung bewirkt. Anschließend erfolgte Abkühlung auf Raumtemperatur. Nachfolgend wurde die Lösung mit NaCl gesättigt sowie mit einigen Tropfen konz. HCl-Lösung auf pH ~2 eingestellt. Hierbei konnte eine Gasentwicklung entsprechend der Decarboxylierungsreaktion des 2-Hydroxy-3-oxoadipats beobachtet werden (siehe Punkt 3.2.3.). Die so erhaltene Lösung wurde im Eisbad gekühlt mit 3 x 15 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Phasen

wurden über Na_2SO_4 getrocknet und tropfenweise mit etherischer Diazomethan-Lösung versetzt, bis eine leichte Gelbfärbung der Reaktionslösung erhalten blieb sowie keine weitere N_2 -Entwicklung mehr zu beobachten war. 15 Minuten nach der letzten Zugabe von Diazomethanlösung wurde die Reaktionslösung erneut über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt.

Ausbeute: 15 mg hellgelbes Öl (entspricht 18 % Ausbeute)

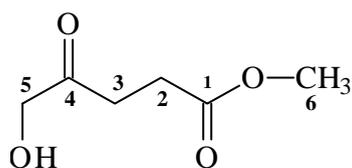


Abb. 19: 5-Hydroxy-4-oxovaleriansäuremethylester

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ [ppm]: 4,14 (s, 2H, RCH_2OH), 3,69 (s, 3H, ROCH_3), 2,90 [t, 2H, $\text{R}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^2$, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6,6$ Hz], 2,67 [t, 2H, $\text{R}^1\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}^2$, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6,6$ Hz]. **$^{13}\text{C-NMR}$** {1H} (CDCl_3) δ [ppm]: 201,2 (4), 172,7 (1), 68,2 (5), 51,9 (6), 32,8 (3), 27,5 (2). **GC-MS** m/z (% rel. Intensität): 143 (5), 129 (8), 125 (7), 115 (93) [$\text{M}^+-\text{CH}_2\text{OH}$], 113 (4), 97 (4), 87 (16) [$\text{M}^+-\text{COCH}_2\text{OH}$ und $\text{M}^+-\text{CO}_2\text{CH}_3$], 69 (8), 59 (87) [COCH_2OH und CO_2CH_3], 56 (11), 55 (100) [$\text{M}^+-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$, $-\text{H}$], 53 (6), 45 (47), 43 (13), 42 (24), 39 (14). Dies entspricht den in der Literatur gefundenen Daten. Lit.: LÜÖND et al. (1992).

3.2.4. Darstellung von 4-Chlor-3-oxoadipat

Der Versuch der Darstellung von 4-Chlor-3-oxoadipat aus 3-Chlor-*cis/trans*-dienlacton auf enzymatischem Weg mittels Dienlacton-Hydrolase und Maleylacetat-Reduktase aus *Pseudomonas* sp. B13 blieb erfolglos. Zwar konnte ein Umsatz des Eduktes durch die beiden Enzyme photometrisch detektiert werden, jedoch ergab die HPLC-Analyse kein eindeutig identifizierbares Produkt. Vielmehr zeigte sich eine rasche Zersetzung der entstandenen Verbindung(en). Auch bei einem „in situ“-Aktivitäts-Test, in dem neben der Dienlacton-Hydrolase und Maleylacetat-Reduktase auch Transferase bzw. Transferase und Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 eingesetzt wurden, zeigte das Chromatogramm eine Vielzahl nicht identifizierbarer Signale. AcetylCoA als Produkt der Thiolase-Reaktion wurde in diesen Tests nicht gefunden.

3.2.5. Darstellung von 2-Methyl-3-oxoadipat

2-Methyl-3-oxoadipat wurde im Rahmen dieser Arbeit als potentielles Substrat der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase untersucht (siehe Punkt 3.4.2.5.). Zur Darstellung von 2-Methyl-3-oxoadipat-Lösungen diente die alkalische Hydrolyse von 5-Methyl-*trans*-enlacton (Dr. S.R. Kaschabek, persönliche Mitteilung).

25 mg 5-Methyl-*trans*-enlacton (0,15 mmol) wurden mit 0,31 mL 1 M NaOH-Lösung versetzt, anschließend mit bidestilliertem Wasser auf 3,2 mL verdünnt und vor Gebrauch 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen.

3.2.6. Darstellung von 4-Methyl-3-oxoadipat

4-Methyl-3-oxoadipat wurde im Rahmen dieser Arbeit als potentielles Substrat der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase untersucht (siehe Punkt 3.4.2.5.). Die Darstellung von 4-Methyl-3-oxoadipat erfolgte aus 3-Methyl-*trans*-dienlacton durch alkalische Hydrolyse und anschließender enzymatischer Reduktion des bei der Hydrolyse entstehenden 3-Methylmaleylacetats mittels gereinigter Maleylacetat-Reduktase.

25 mg 3-Methyl-*trans*-dienlacton (0,16 mmol) wurden in 0,32 mL NaOH-Lösung (1 M) gelöst, mit bidestilliertem Wasser zu 3,25 mL verdünnt und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die so erhaltene 3-Methylmaleylacetat-Lösung wurde anschließend wie folgt enzymatisch zu 4-Methyl-3-oxoadipat umgesetzt:

100	μL	0,5 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,0
100	μL	40 mM NADH-Lösung
100	μL	50 mM 3-Methylmaleylacetat-Lösung
20	μL	gereinigte Maleylacetat-Reduktase
680	μL	bidestilliertes Wasser

Zusammengefasst standen folgende chemisch und/oder enzymatisch präparierte Substrate in Lösung für Enzymtests mit 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase und 3-OxoadipylCoA-Thiolase zur Verfügung:

- 3-Oxoadipat
- 2-Chlor-3-oxoadipat
- 2-Methyl-3-oxoadipat
- 4-Methyl-3-oxoadipat
- 3-OxoadipylCoA

3.3. Induktion von Enzymen des *ortho*- und des modifizierten *ortho*-Weges von *Pseudomonas* sp. B13

Fragestellung bei diesem Versuch war, welche Enzyme beim Wachstum von *Pseudomonas* sp. B13 auf unterschiedlichen Substraten induziert werden. Welche Unterschiede gibt es im unteren Abbauweg von Aromaten und halogensubstituierten Aromaten? **Tab. 5** gibt Aufschluss über die Induktion und die spezifische Aktivität der induzierten Enzyme während des exponentiellen Wachstum von *Pseudomonas* sp. B13:

Tab. 5: Substratabhängige Induktion von Enzymen während des exponentiellen Wachstums von *Pseudomonas* sp. B13.

Enzym	Spezifische Aktivität [U/g Protein] im Rohextrakt aus <i>Pseudomonas</i> sp. B13, gewachsen auf		
	Acetat	Benzoat	3-Chlorbenzoat
Dienlacton-Hydrolase ^{a)}	15	15	720
3-Oxadipat-Enollacton-Hydrolase ^{b)}	nn	160	280
3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase ^{b)}	< 1	156	113
3-OxadipylCoA-Thiolase ^{b)}	nn	324	370
CoA und ATP abhängiges 3-Oxadipat umsetzendes Enzym	nn	20	13

nn = nicht nachweisbar.

a) Enzym des modifizierten *ortho*-Weges b) Enzym des *ortho*-Weges.

Die Dienlacton-Hydrolase, ein Enzym des modifizierten *ortho*-Weges von Chloraromaten, wird beim Wachstum von *Pseudomonas* sp. B13 auf Acetat und Benzoat auf einem bestimmten „Grundlevel“ induziert. Die typischen Enzyme des *ortho*-Weges von Aromaten (3-Oxadipat-Enollacton-Hydrolase, 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase, 3-Oxadipyl-CoA-Thiolase) sind dem entgegen lediglich in Benzoat- und 3-Chlorbenzoat-gewachsenen Zellen hoch induziert. Dies gilt ebenso für ein CoA und ATP abhängiges 3-Oxadipat

umsetzendes Enzym. Ein ähnliches ATP-abhängiges Enzym wurde von POWLOWSKI & DAGLEY (1985) für die Umsetzung von 4-Methyl-3-oxoadipat durch *Trichosporon cutaneum* beschrieben.

Die spezifische Aktivität der Dienlacton-Hydrolase in 3-Chlorbenzoat-gewachsenen Zellen beträgt ca. das 50-fache des Wertes (bzw. des „Grundlevels“), der in Acetat- und Benzoat-gewachsenen Zellen gefunden wurde. Keinen signifikanten Unterschied gibt es für die Induktion der Enzyme des *ortho*-Weges von Aromaten (s.o.) beim Wachstum auf 3-Chlorbenzoat oder Benzoat. Alle untersuchten Enzyme sind bei Wachstum mit beiden Substraten auf vergleichbar hohem Niveau induziert. Diese Aussage trifft ebenso auf das ATP und CoA abhängige 3-Oxadipat umsetzende Enzym zu.

Ein Vergleich der Induktion des letztgenannten Enzyms mit der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase legt den Schluss nahe, dass die Transferase beim Abbau von 3-Oxadipat durch *Pseudomonas* sp. B13 deutlich stärker involviert ist. In dieser Arbeit wurde daher der Schwerpunkt auf die Reinigung und Spezifizierung der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase und der 3-OxadipylCoA-Thiolase gelegt.

3.4. Reinigung und Charakterisierung der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13

3.4.1. Reinigung der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase

Die Anreicherung des Enzyms erfolgte ausgehend von zellfreiem Rohextrakt (Darstellung siehe 2.6.) aus 3-Chlorbenzoat-gewachsenen *Pseudomonas* sp. B13-Zellen über die folgenden Stufen bis zur Homogenität:

1. Hitzefällung
2. Phenyl-Sepharose CL-4B Hydrophobe Interaktionschromatographie
3. Mono Q[®] Ionenaustauschchromatographie
4. Superose[®] 6 Gelfiltration

3.4.1.1. Hitzefällung

Die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 ist bei 59°C über 15 Minuten stabil. Daher konnten im zellfreien Rohextrakt durch die Hitzefällung ca. 80 % der Fremdproteine von der Transferase getrennt werden. Die Aktivität des Enzyms blieb hierbei zu 97 % erhalten.

3.4.1.2. Phenyl-Sepharose CL-4B Hydrophobe Interaktionschromatographie

Die Interaktionschromatographie beruht auf dem Verteilungsgleichgewicht hydrophober Teilchen zwischen flüssiger (Lösung = mobile Phase) und fester (Matrix = stationäre Phase) Phase. Die Trennung von Proteinen erfolgt aufgrund unterschiedlicher hydrophober Eigenschaften. Das Trennprinzip dieser Chromatographie beruht demnach auf der Interaktion hydrophober Regionen eines Proteins mit den ebenfalls hydrophoben funktionellen Gruppen des Säulenmaterials durch „van der Waals´sche“ Bindung. Dabei ist die Ionenkonzentration und der pH-Wert der Lösung, welche die zu trennenden Proteine enthält, von entscheidender Bedeutung. Sie können das Verteilungsgleichgewicht eines Proteins zwischen Lösung und Matrix verschieben. Eine hohe Ionenkonzentration bewirkt die Bindung auch von Proteinen

mit geringem hydrophoben Charakter, da diese bei hoher Salzkonzentration aus der liquiden wässrigen Phase verdrängt werden. Dem entgegen sind bei niedriger Ionenkonzentration nur Proteine mit ausgeprägten hydrophoben Eigenschaften in der Lage, fest an das Säulenmaterial zu binden. Hydrophil ausgeprägte Proteine bleiben bei geringer Salzkonzentration bevorzugt in Lösung.

Im Fall der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase erfolgte die Elution von der Säule erst bei einer relativ geringen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration von $< 0,1$ M. Das Enzym zeigt demnach eine starke Bindung zum hydrophoben Säulenmaterial und sollte entsprechend in seiner räumlichen Struktur nach Außen einen ausgeprägten hydrophoben Charakter besitzen.

Bei diesem Reinigungsschritt wurden ca. 60 % des auf die Säule aufgetragenen Proteins abgetrennt, während 98 % der eingesetzten Gesamtaktivität in den vereinigten 10 Fraktionen (20 mL) wiedergefunden wurde.

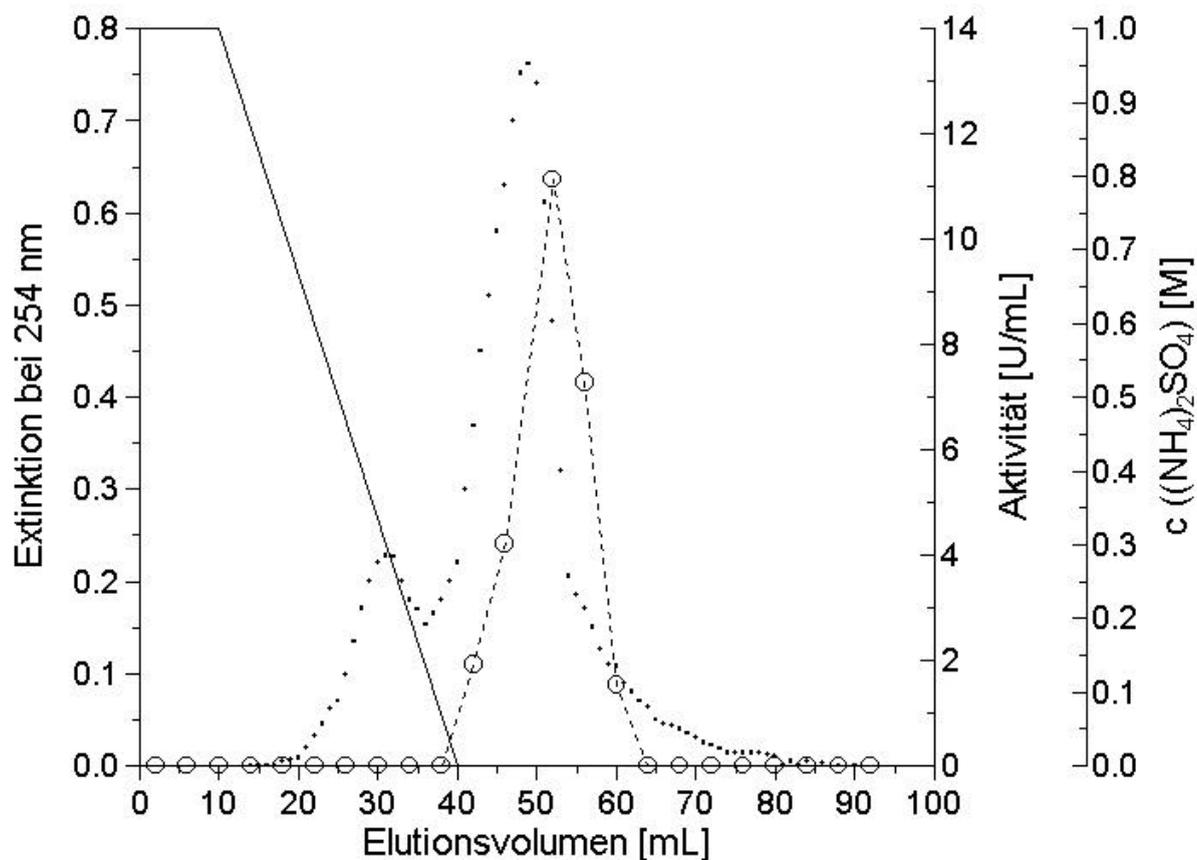


Abb. 20: Phenyl-Sepharose Hydrophobe Interaktionschromatographie der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13.

[(.....) = Proteinelution (Extinktion bei 254 nm), (ooo) = Aktivität, (—) = $c((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$]

3.4.1.3. Mono Q[®] Ionenaustauschchromatographie

Der Ionenaustausch beruht auf dem Verteilungsgleichgewicht ionogener Teilchen zwischen flüssiger (Lösung = mobile Phase) und fester (Matrix = stationäre Phase) Phase. Die Trennung von Proteinen erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungen. Die Bindefähigkeit eines Proteins an die Matrix ist abhängig vom pH-Wert der Lösung und der Ionenkonzentration (Salzkonzentration) der Lösung, da diese beiden Faktoren das Verteilungsgleichgewicht der (ionogenen) Proteine zwischen stationärer und mobiler Phase verschieben können.

Entsprechend der Ladung der Matrix wird zwischen Anionen- und Kationenaustauschern unterschieden. Bindet ein Protein auch bei hoher Salzkonzentration (z. B. 1 mol/L) noch an das Säulenmaterial, so muss das Protein eine entsprechend hohe positive (Kationenaustauscher) oder negative (Anionenaustauscher) Ladung aufweisen, um mit den Anionen bzw. Kationen des Salzes in der Lösung um die Bindung an das Säulenmaterial erfolgreich zu konkurrieren.

Das in diesem Versuch verwendete Säulenmaterial Mono Q[®] ist entsprechend seiner funktionellen Gruppen ein Anionen-Austauscher.

Die Elution der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase von der Säule erfolgte bei ca. 0,3 M NaCl. Die Gesamtproteinmenge wurde bei diesem Reinigungsschritt um rund 90 % verringert. Daher wurde trotz des Verlustes von ca. 34 % der eingesetzten Gesamtaktivität bei diesem Reinigungsschritt eine hohe Anreicherung erzielt.

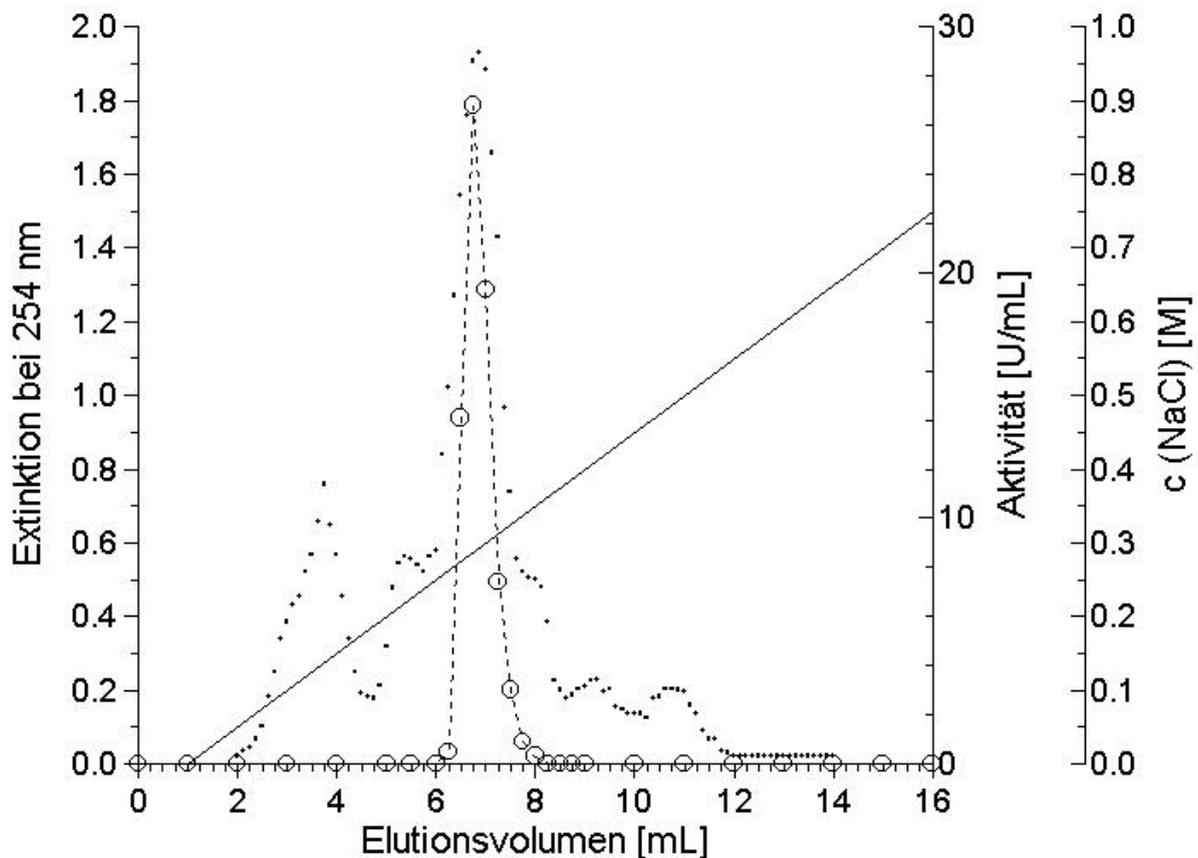


Abb. 21: Mono Q[®] Ionenaustauschchromatographie der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13.

[(.....) = Proteinelution (Extinktion bei 354 nm), (ooo) = Aktivität, (—) = c (NaCl)].

3.4.1.4. Superose[®] 6 Gelfiltration

Die Trennung von Proteinen durch Gelfiltration beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen durch ein Gel in Abhängigkeit von ihrer Größe und räumlichen Struktur. Große Proteine wandern hierbei schneller durch ein Gel als kleine Proteine, da es für sie nicht so viele „Mikro-Hohlräume“ gibt, in denen sie „hängen“ bleiben können und daher bei der Wanderung durch das Gel gebremst werden.

Durch die abschließende Superose[®] 6 Gelfiltration konnten die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase zur Homogenität gereinigt werden. Die Elution des Enzyms erfolgte in einem symmetrischen Proteinpeak in Übereinstimmung mit dem Aktivitätspeak des Enzyms.

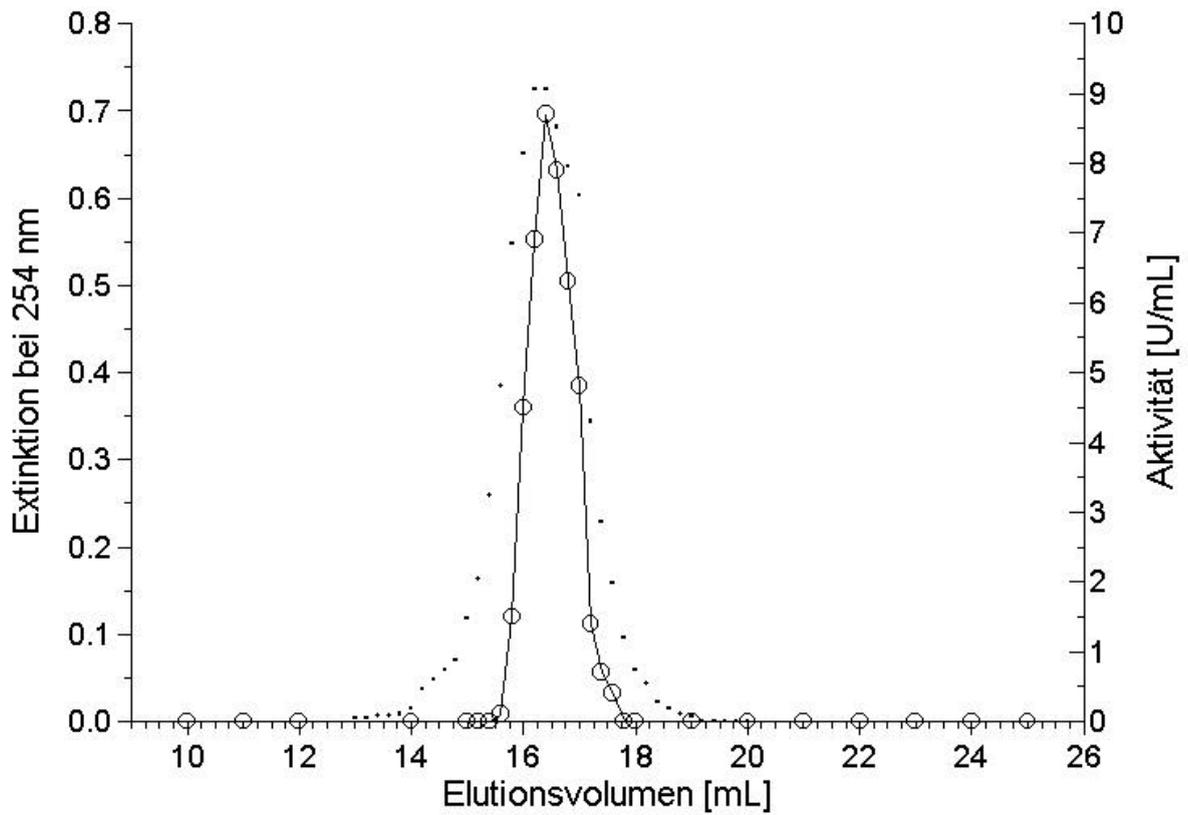


Abb. 22: Superose[®] 6 Gelfiltration der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13. [(.....) = Proteinelution (Extinktion bei 254 nm), (ooo) = Aktivität].

Daten wie Ausbeuten und Anreicherungsfaktoren sind für jeden Reinigungsschritt in **Tab. 6** zusammengefasst:

Tab. 6: Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten der Reinigung der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase

Reinigungsschritt <i>Methode</i> Material	Volumen [mL]	Gesamtprotein [mg]	Gesamt- aktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs- faktor
<i>Rohextrakt</i>	25	394	106	0,27	100	1
<i>Hitze</i> fällung	25	77,5	103	1,33	97	4,9
<i>Hydrophobe</i> <i>Interaktions-</i> <i>chromatographie</i> Phenyl-Sepharose CL-4B	20	30,8	101	3,28	95	12,1
<i>Ionenaustausch-</i> <i>chromatographie</i> Mono Q [®]	1	3,1	67	21,6	63	80
<i>Gelfiltration</i> Superose [®] 6	2	1,8	43	23,9	41	88,5

3.4.2. Charakterisierung der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase

3.4.2.1. Enzymgröße

Durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese konnte die Anreicherung der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase gezeigt werden.

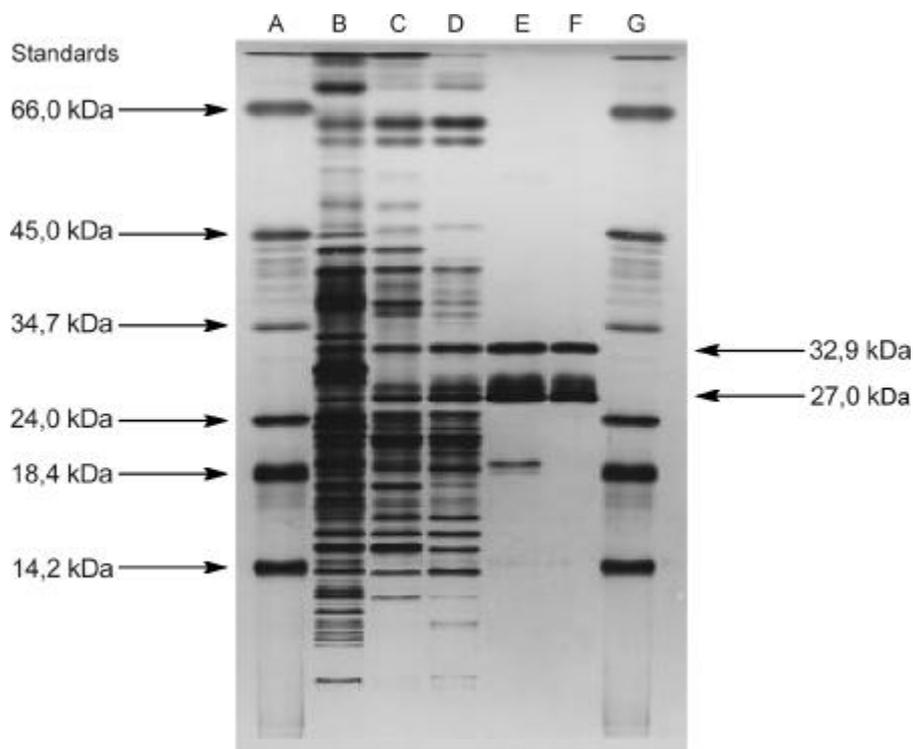


Abb. 23: SDS-PAGE einzelner Reinigungsstufen der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13.

Die Tröge des Elektrophoresegels enthielten folgende Proben: **A** und **G** Molekulargewichtsmarker (je 1 µg/Standard-Protein), **B** Rohextrakt aus *Pseudomonas* sp. B13 (15 µg Protein), **C** Rohextrakt nach Hitzefällung (10 µg Protein), **D** Phenyl-Sepharose-Eluat (7 µg Protein), **E** Mono Q[®]-Eluat (4 µg Protein), **F** Superose[®] 6-Eluat (3 µg Protein).

Die im letzten Reinigungsschritt erhaltene Enzymlösung zeigte nach Silverstain-Färbung zwei starke Banden im SDS-Gel. Entsprechend der Eichgeraden (siehe 2.10.1.2.) wurden die Größen der im folgenden als Untereinheit A und B bezeichneten Proteinfragmente bestimmt:

Untereinheit A: 32,9 kDa

Untereinheit B: 27 kDa

Durch analytische Gelfiltration über eine Superose[®] 12 Gel-Säule (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) wurde die Größe des gereinigten nativen Enzyms bestimmt. Entsprechend der Retentionszeiten von Eichproteinen wurde mittels einer Eichgeraden (siehe 2.11.) die native Proteingröße von 115 ± 5 kDa ermittelt.

Auf Grundlage dieser Resultate handelt es sich bei der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 um ein 119,8 kDa großes heterotetrameres Enzym des Typs A_2B_2 . Berechnet mittels der spezifische Aktivität des reinen Enzyms ($A_{\text{spez.}} = 23,9 \text{ U/mg}_{\text{Prot.}}$) folgt eine katalytische Konstante der B13-Transferase von $k_{\text{cat.}} = 1430 \text{ min}^{-1}$.

3.4.2.2. N-terminale Aminosäuresequenz der Enzym-Untereinheiten

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der Enzymuntereinheiten wurden die Proteinbanden eines SDS-Gels des gereinigten Enzyms durch Elektroblothing nach KHYSER-ANDERSEN (2.10.2.1.) auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Amidoschwarzlösung gefärbt (2.10.2.1.). Die gefärbten Proteinbanden, entsprechend den Untereinheiten A und B des Enzyms, wurden aus der Membran ausgeschnitten und der N-terminalen Sequenzierung mit folgendem Ergebnis zugeführt:

Untereinheit A: AELLTLREAVRFVNDGTVALEGFTHLIPT

Untereinheit B: SAYSTNEMMTVAAARRLKNGAVVFV

3.4.2.3. pH-Optimum

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde zunächst die Abhängigkeit der Extinktion des 3-OxoadipylCoA-Mg²⁺-Komplexes vom pH-Wert einer Lösungen bestimmt, um für jede

einzelne Aktivitätsmessung den entsprechenden pH-Wert-abhängigen molaren Extinktionskoeffizienten durch Faktorisierung berücksichtigen zu können. Hierzu wurden jeweils 100 μL einer 3-OxoadipylCoA-Präparation zu jeweils 900 μL Tris/HCl-Puffer (35 mM, 0,25 mM MgCl_2 , unterschiedlicher pH-Wert) hinzugefügt und die Extinktion gegen den jeweiligen Puffer gemessen. Die daraus ermittelten Faktoren beziehen sich auf die bei pH 8,0 ermittelte Extinktion (gesetzt auf 1) und sind in nachfolgender Grafik dargestellt:

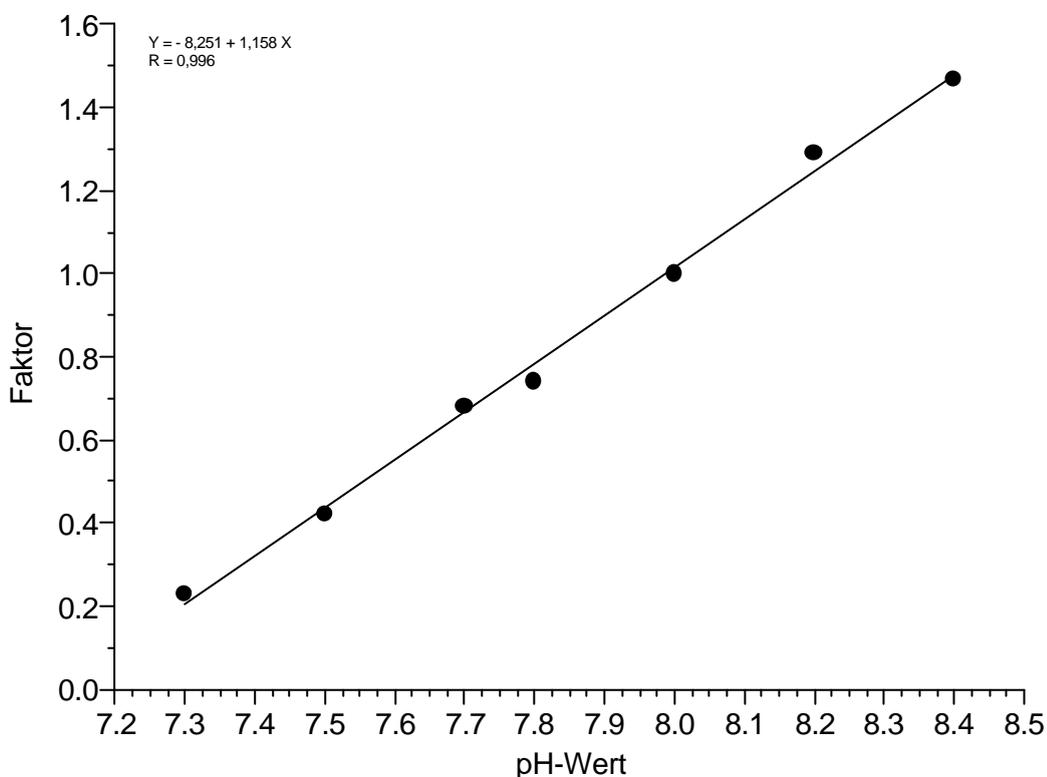


Abb. 24: Faktor zur Abhängigkeit der Extinktion des 3-OxoadipylCoA- Mg^{2+} -Komplexes bei 305 nm vom pH-Wert einer wässrigen Tris/HCl gepufferten Lösung in Relation zur Extinktion bei pH 8,0 (gesetzt auf 1.0).

Der optimale pH-Wert für den enzymatischen Umsatzes von 3-Oxoadipat durch das Enzym 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase wurde mit Hilfe des unter Punkt 2.8.4. aufgeführten Standardzymtests ermittelt:

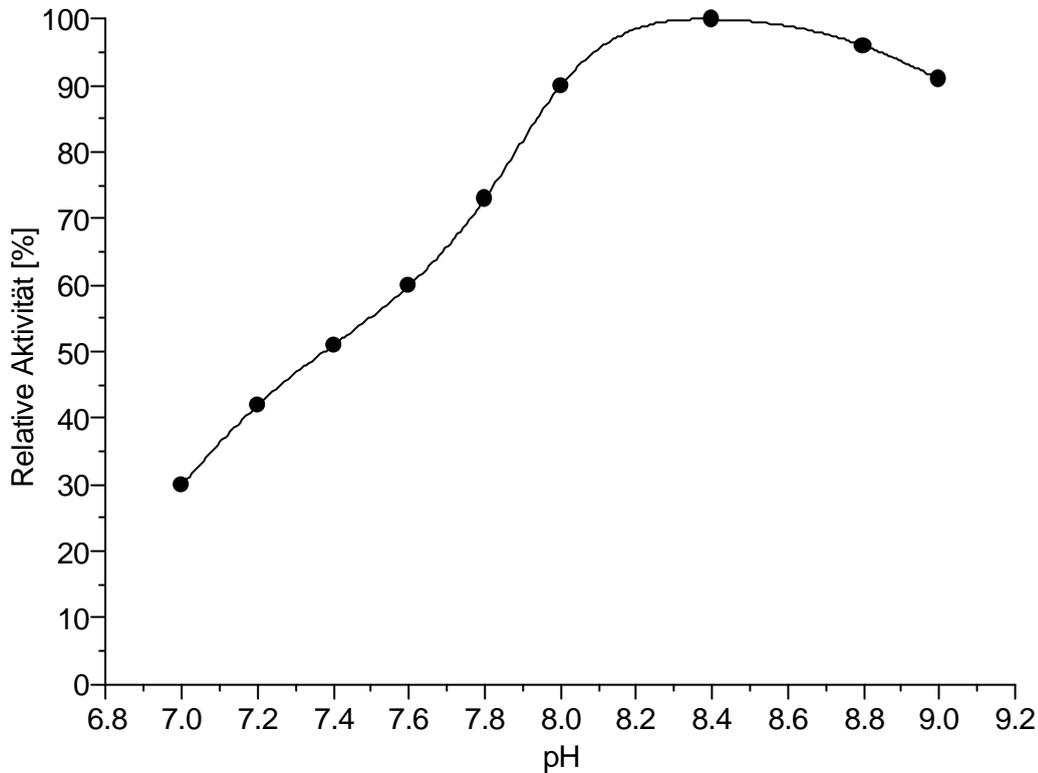


Abb. 25: Der Einfluss des pH-Wertes auf die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase-Aktivität.

Aufgrund der ermittelten Daten beträgt der optimale pH = 8,4 für die Umsetzung von 3-Oxoadipat durch die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13.

3.4.2.4. Kinetische Daten

Die K_M - und V_{max} -Werte der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase wurden unter Verwendung des Standardenzymtests (siehe Punkt 2.8.4.) für das Substrat 3-Oxoadipat und das Cosubstrat SuccinylCoA wie folgt ermittelt:

3-Oxoadipat:	$K_M = 0,41 \text{ mM}$	$V_{max} = 10,3 \text{ U/mg Protein}$
SuccinylCoA:	$K_M = 0,23 \text{ mM}$	$V_{max} = 24,2 \text{ U/mg Protein}$

Die Berechnung der Daten erfolgte durch graphische Auswertung der Michaelis-Menten-Gleichung in doppelt reziproker Form nach Lineweaver-Burk. Für jede Messung zu einem

Substrat bei unterschiedlicher Substratkonzentration wurde die Konzentration des Co-substrates zum Zeitpunkt der Enzymzugabe gleich gehalten. Sie wurde als feststehende Größe definiert, um den Enzym-Substrat-Komplex als Michaelis-Menten-Komplex zu abstrahieren.

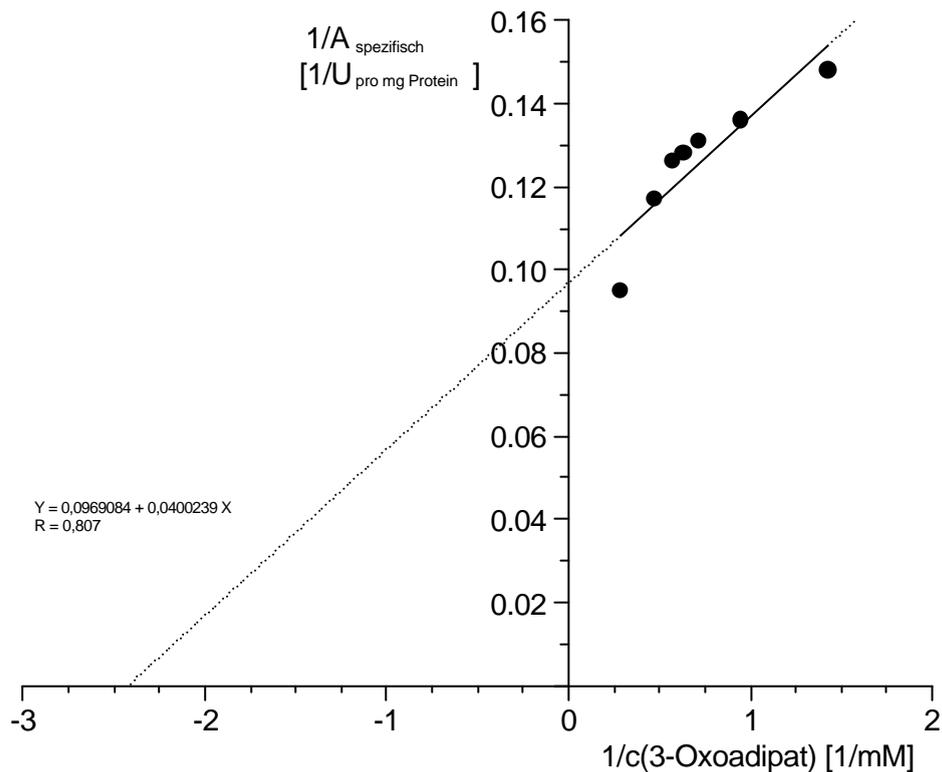


Abb. 26: Lineweaver-Burk-Diagramm der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 für das Substrat 3-Oxadipat bei fester SuccinylCoA-Anfangskonzentration [0,15 mM].

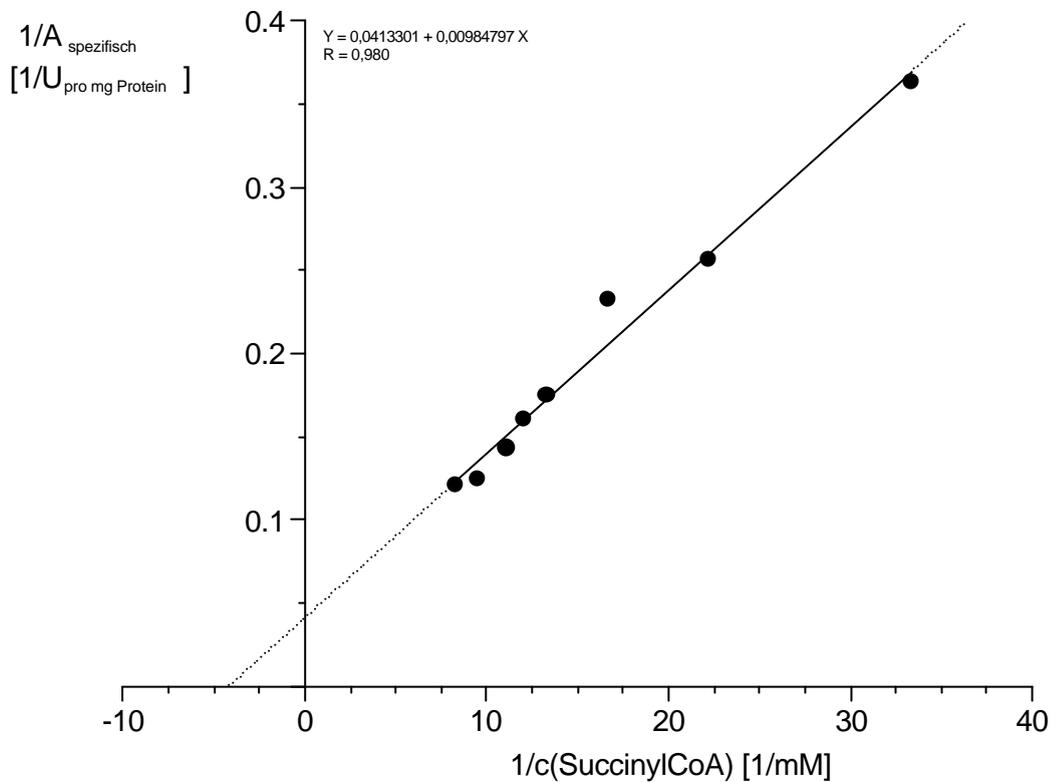


Abb. 27: Lineweaver-Burk-Diagramm der 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 für das Substrat SuccinylCoA bei fester 3-Oxadipat-Anfangskonzentration [3,5 mM].

3.4.2.4.1. Reversibilität

Die enzymkatalysierte Umsetzung von 3-Oxadipat und SuccinylCoA zu 3-OxadipylCoA durch die 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 ist reversibel, was sich durch die Zugabe von Succinat zeigen ließ. Die nachfolgende **Abbildung 28** zeigt die Bildung und Rückbildung von 3-OxadipylCoA während eines Enzymtests. Die Konzentration an 3-OxadipylCoA wurde photometrisch anhand der Extinktion des 3-OxadipylCoA-Mg²⁺-Komplexes bei $\lambda = 305$ nm und pH = 8,0 verfolgt.

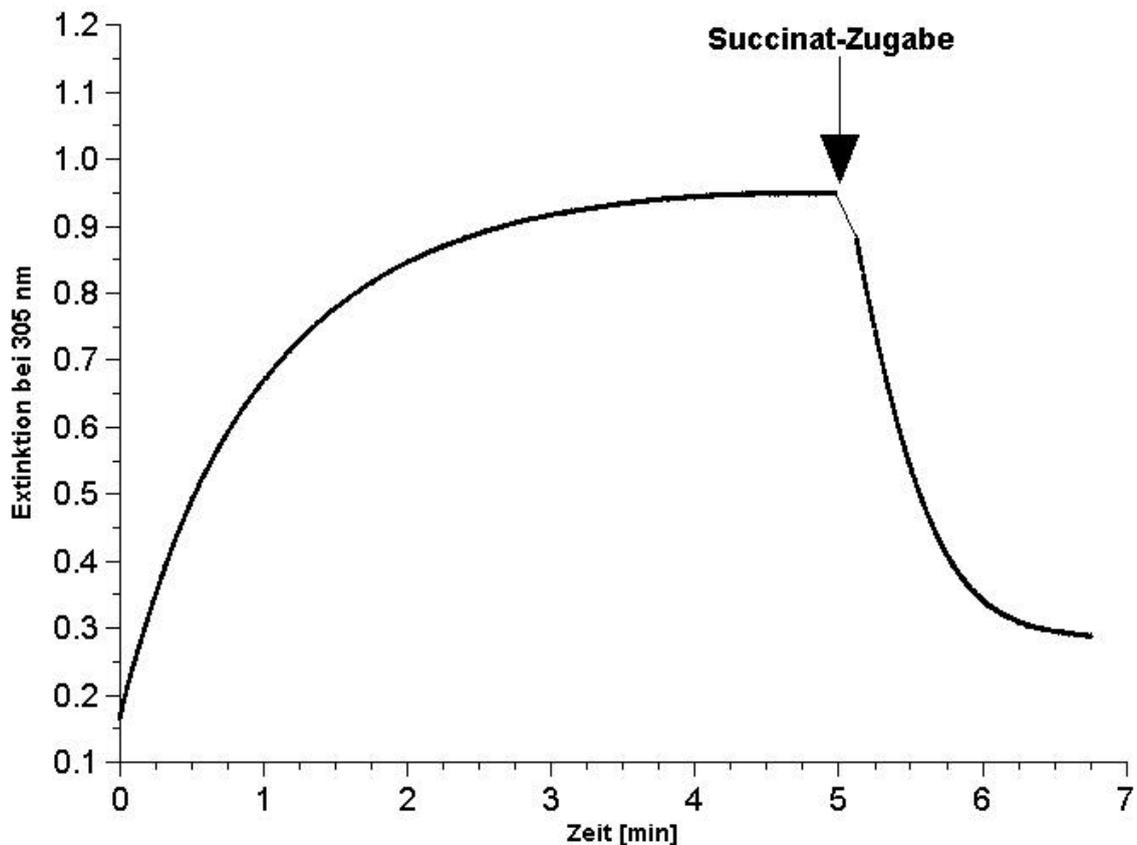


Abb. 28: Enzymkatalysierte Bildung von 3-OxoadipylCoA durch 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 und enzymkatalysierte Rückreaktion durch Zugabe von Succinat. Die Konzentrationen der Reaktanden in der Lösung betrug bei Enzymzugabe 3,5 mM 3-Oxoadipat und 0,15 mM SuccinylCoA. Es wurden 10 μ L einer 100 mM Succinat-Lösung zu 990 μ L Lösung zugegeben.

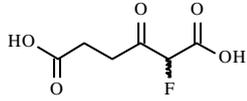
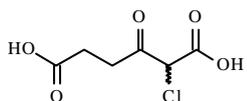
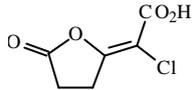
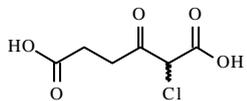
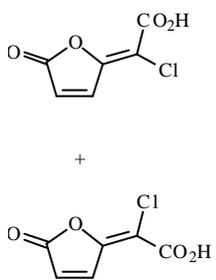
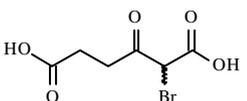
3.4.2.5. Substratspektrum

Verschiedene Substanzen wurden als potentielle Substrate für die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 untersucht.

Halogensubstituierte 3-Oxoadipate

Halogensubstituierte 3-Oxoadipate als mögliche Abbauprodukte halogensubstituierter Aromaten (siehe 3.2.3.) wurden anstelle des 3-Oxoadipats im Standardenzymtest (2.8.4.) für die Transferase eingesetzt. Die in nachfolgender **Tabelle 7** aufgeführten Verbindungen wurden als Substrate untersucht.

Tab. 7: Halogensubstituierte 3-Oxadipate: Darstellung und Aktivität der 3-Oxadipat:Succinyl-CoA-Transferase.

3-Oxadipat	Vorstufe	Darstellungsweise	Aktivität
2-Fluor-3-oxadipat 	Keine	nicht erforderlich	nn
2-Chlor-3-oxadipat 	5-Chlor- <i>trans</i> -enlacton 	alkalische Hydrolyse mittels NaHCO ₃	nn
2-Chlor-3-oxadipat 	5-Chlor- <i>cis/trans</i> -dienlacton 	alkalische Hydrolyse mittels NaHCO ₃ <u>und</u> enzymatischer Umsatz von 5-Chlormaleylactetat durch Maleylacetat- Reduktase, d.h. die Vorstufen sind Substrate für diese Enzyme	nn
		enzymatischer Umsatz durch Dienlacton- Hydrolase und Maleylacetat-Reduktase, d.h. die Vorstufen sind Substrate für diese Enzyme	nn
2-Brom-3-oxadipat 	keine	nicht erforderlich	nn

nn = nicht nachweisbar

Während die Verbindungen 2-Fluor-3-oxadipat und 2-Brom-3-oxadipat aus früheren Arbeiten stammend von Herrn Dr. S. R. Kaschabek freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, erfolgte die Darstellung von 2-Chlor-3-oxadipat aus den Verbindungen 5-Chlor-*trans*-enlacton und 5-Chlor-*cis/trans*-dienlacton. Durch alkalische Hydrolyse mittels

äquivalenter Mengen an NaHCO_3 wurde 5-Chlor-*trans*-enlacton unter milden Bedingungen zum 2-Chlor-3-oxoadipat umgesetzt (siehe auch 3.2.3.). Die Darstellung aus 5-Chlor-*cis/trans*-dienlacton erfolgte auf enzymatischem Weg mittels Dienlacton-Hydrolase und Maleylacetat-Reduktase bzw. alternativ durch alkalische Hydrolyse mittels aliquoter Mengen an NaHCO_3 und anschließendem enzymatischem Umsatz des hierdurch entstandenen 5-Chlormaleylacetats durch Maleylacetat-Reduktase. Entsprechend lagen durch Enzyme hergestellte Substanzen vor.

Die Dienlacton-Hydrolase stammte aus eigener früherer Arbeit (KUNN 1998). Die verwendete Maleylacetat-Reduktase wurde freundlicherweise von Herrn Dr. S.R. Kaschabek zur Verfügung gestellt.

Eine Aktivität der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase mit halogensubstituierten 3-Oxoadipaten ließ sich im optischen Enzymtest (siehe 2.8.4.) nicht nachweisen. Der Enzymtest beruht auf der Bildung des 3-OxoadipylCoA-Mg²⁺-Komplexes (3.1.). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass Halogensubstituenten in 2-Position des 3-Oxoadipats die Komplexbildung stören und somit der optische Enzymtest für diese Verbindungen versagt, wurde mittels HPLC (siehe 3.1.) nach Produkten gesucht, die bei einer Umsetzung der Substrate hätten entstehen müssen. Produkte der Transferase-Reaktion in Form halogensubstituierter 3-OxoadipylCoA-Verbindungen konnten nicht nachgewiesen werden. Ebenso wurden keine AcetylCoA-Verbindungen, die Produkte der nachfolgenden Thiolase-Reaktion, per HPLC nachgewiesen.

Die Möglichkeit der Enantioselektivität der Transferase-Reaktion und das Vorliegen der falschen oder einer störenden enantiomeren Form der substituierten 3-Oxoadipate, hervorgerufen durch deren chemische Darstellung (hierbei entstehen stets beide Enantiomere), wurde durch Versuche mit gekoppelten enzymatischen Tests ausgeschlossen. Bei diesen Tests wurde 2-Chlor-3-oxoadipat enzymatisch aus dem entsprechenden substituierten Dienlacton bzw. Maleylacetat dargestellt, was die biologisch relevante Form für die Weiterreaktion hervorbringen sollte.

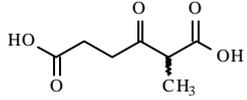
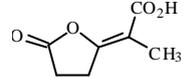
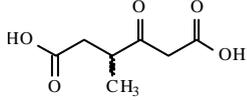
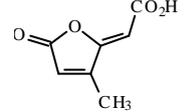
4-Chlor-3-oxoadipat erwies sich in allen Versuchen als derart instabil, dass hiermit keine Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Auch die enzymatische Darstellung mittels Maleylacetat-Reduktase zeigte anhand der HPLC eine rasche Zersetzung der Verbindung. Ebenso führte die direkte Kopplung der Maleylacetat-Reduktase und der Transferase, sowie

der Maleylacetat-Reduktase, der Transferase und der Thiolase in einem Enzymtest zu keinem auswertbaren Ergebnis für 4-Chlor-3-oxoadipat.

Methylsubstituierte 3-Oxoadipate

Als weitere Verbindungen wurden 2-Methyl- und 4-Methyl-3-oxoadipat als potentielle Substrate der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase untersucht.

Tab. 8: Methylsubstituierte 3-Oxoadipate: Darstellung und Aktivität der 3-Oxoadipat:Succinyl-CoA-Transferase.

3-Oxoadipat	Vorstufe	Darstellungsweise	Aktivität
2-Methyl-3-oxoadipat 	5-Methyl- <i>trans</i> -enlacton 	alkalische Hydrolyse mittels NaOH	nn
4-Methyl-3-oxoadipat 	3-Methyl- <i>trans</i> -dienlacton 	alkalische Hydrolyse mittels NaOH <u>und</u> enzymatischer Umsatz von 3-Methyl- maleylacetat durch Maleylacetat- Reduktase, d.h. die Vorstufen sind Substrate für diese Enzyme	Hinweis auf Aktivität. AcetylCoA durch HPLC nachgewiesen

nn = nicht nachweisbar

Die Darstellung von 2-Methyl-3-oxoadipat erfolgte durch alkalische Hydrolyse aus 5-Methyl-*trans*-enlacton mittels aliquoter Mengen an NaOH. 4-Methyl-3-oxoadipat wurde durch alkalischer Hydrolyse aus 3-Methyl-*trans*-dienlacton mittels NaOH und nachfolgendem enzymatischen Umsatz des als Zwischenprodukt entstandenen 3-Methylmaleylacetats durch Maleylacetat-Reduktase dargestellt (KASCHABEK 1995).

Der optische Enzymtest zeigte für beide Verbindungen keine Aktivität. Mittels HPLC konnte jedoch im Enzymtest mit Transferase und Thiolase für das Edukt 4-Methyl-3-oxoadipat

geringe Mengen AcetylCoA nachgewiesen werden. Die Konzentration lag 1h nach der Enzymzugabe knapp über der Nachweisgrenze. Der Nachweis von AcetylCoA zeigt neben einer Aktivität der Transferase auch eine Aktivität der Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 gegenüber 4Methyl-3-oxoadipylCoA. Ein direkter Nachweis dieses CoA-Ester per HPLC war jedoch aufgrund der geringen Konzentration nicht möglich.

Für die Verbindung 2-Methyl-3-oxoadipat konnte auch im HPLC kein Produkt der Transferase-Reaktion und somit auch keine Aktivität nachgewiesen werden.

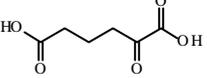
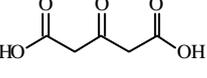
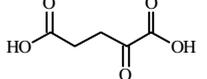
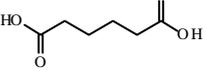
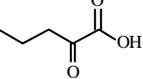
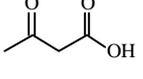
Strukturverwandte Verbindungen des 3-Oxadipats

Neben halogen- und methylsubstituierten 3-Oxadipaten wurden strukturverwandte Verbindungen untersucht, in denen die β -Ketogruppe verschoben oder/und die Kohlenstoffkette gegenüber den 6 Kohlenstoffatomen des Oxadipat-Gerüsts verkürzt ist. Des Weiteren wurden zwei Monocarbonsäuren untersucht, in denen ebenfalls die Kohlenstoffkette des Oxadipat-Gerüsts verkürzt ist, sowie Adipat, welches dem 3-Oxadipat strukturell ohne weitere Keto-Gruppe entspricht.

Wie in **Tabelle 9** aufgeführt wird 2-Oxadipat und 3-Oxoglutarat durch die 3-Oxadipat: SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 sehr langsam zu nicht näher identifizierten Produkten umgesetzt.

Die Anwesenheit der zweiten Carboxylgruppe sowie einer weiteren Keto-Funktion in 1- oder 2-Position zur einer der Carboxylgruppen scheint demnach essentiell für die Aktivität der Transferase zu sein. Bei allen untersuchten Verbindungen, die diese Voraussetzungen nicht erfüllten, konnte kein Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

Tab. 9: Strukturverwandte Verbindungen des 3-Oxadipats als Substrate der 3-Oxadipat-SuccinylCoA-Transferase

Substrat	Aktivität
 2-Oxadipat (= 2-Oxohexandisäure)	Die Entstehung eines Produktes wurde durch HPLC nachgewiesen. Die Retentionszeit des Produkts beträgt bei einer Flussrate von 1 mL/min relativ zur Retentionszeit von CoA (gesetzt auf 1): $R_{t,relativ} = 1,72$
 3-Oxoglutarat (= 3-Oxopentandisäure)	Die Entstehung eines Produktes wurde durch HPLC nachgewiesen. Die Retentionszeit des Produkts beträgt bei einer Flussrate von 1 mL/min relativ zur Retentionszeit von CoA (gesetzt auf 1): $R_{t,relativ} = 0,71$
 2-Oxoglutarat (= 2-Oxopentandisäure)	nn
 Adipat (= Hexandisäure)	nn
 2-Oxocapronat (= 2-Oxohexansäure)	nn
 Acetoacetat (= 3-Oxobuttersäure = 3-Oxobutansäure)	nn

nn = nicht nachweisbar

3.4.2.5.1. Abbau von 2-Chlor-3-oxoadipat durch Enzyme aus *Ralstonia* sp. PS 12

Ralstonia sp. PS12 ist ein Organismus, der in der Lage ist 1,2,4-Trichlor- und 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol als Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen. Der Abbau der Chlorbenzole erfolgt über 3,4,6-Trichlorbrenzkatechin. Durch weiteren Umsatz des Chlorbrenzkatechins über den modifizierten *ortho*-Abbauweg sollte 2-Chlor-3-oxoadipat als Metabolit involviert sein (SANDER et al. 1991).

Wachstum von *Ralstonia* sp. PS12

Der Stamm konnte beim Wachstum auf 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol nicht reproduzierbar in Flüssigkultur etabliert werden. Daher erfolgte die Gewinnung von Zellmasse durch Abspülen von über die Gasphase mit 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol versorgten und im Wachstum befindlichen Zellkulturen von Mineralmedium-Agarplatten (siehe 2.4.).

Die Aktivität des benutzten PS12-Rohextraktes gegenüber 3-Oxoadipat wurde durch HPLC untersucht. AcetylCoA konnte als Produkt einer Umsetzung von 3-Oxoadipat identifiziert werden. Der optische Enzymtest für die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase (2.8.4.) ergab eine spezifische Aktivität von 0,07 U/mg_{Protein}.

Enzymaktivität gegenüber 2-Chlor-3-oxoadipat

Der Rohextrakt aus *Ralstonia* sp. PS12 wurde auf Enzymaktivität gegenüber 2-Chlor-3-oxoadipat getestet. Sowohl der optische Enzymtest (2.4.8.) wie auch die Untersuchungen durch HPLC ergaben keine Hinweise auf eine Aktivität des Rohextraktes. Weder die Entstehung eines CoA-Esters (z.B. 2-Chlor-3-oxoadipylCoA) als Produkt der Transferase-Reaktion noch ChloracetylCoA als potentielles Produkt der anschließenden Thiolase-Reaktion oder ein anderes Produkt einer Umsetzung wurden gefunden.

3.4.2.6. Hemmung

Verschiedene Substanzen wurden auf ihre Eigenschaft hin untersucht, die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 in ihrer Aktivität zu hemmen.

Komplexbildner

Komplexbildende Verbindungen wie EDTA oder *o*-Phenanthrolin hatten bei einer Konzentration von 1 mM im Standardenzymtest (2.8.4.) keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Ebenso konnte kein Aktivitätsverlust durch 1 mM Cyanidionen (NaCN) festgestellt werden. Eine Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms von der Anwesenheit zweiwertiger komplexierbarer Metallionen besteht demnach nicht.

Schwermetallionen

Da die Zugabe von HgCl_2 oder *p*-Chlormercuribenzoat zu einer Lösung von 3-OxoadipylCoA die sofortige Zerstörung des Thioesters bewirkt, waren Untersuchungen zur Hemmung durch diese Quecksilberverbindungen sinnlos (**Abb. 29**). Eine Beobachtung, die bereits zuvor in ähnlicher Form bei Untersuchungen mit reduziertem Glutathion und CoA gemacht worden war (ALLRED 1965; POWLOWSKI & DAGLEY 1985).

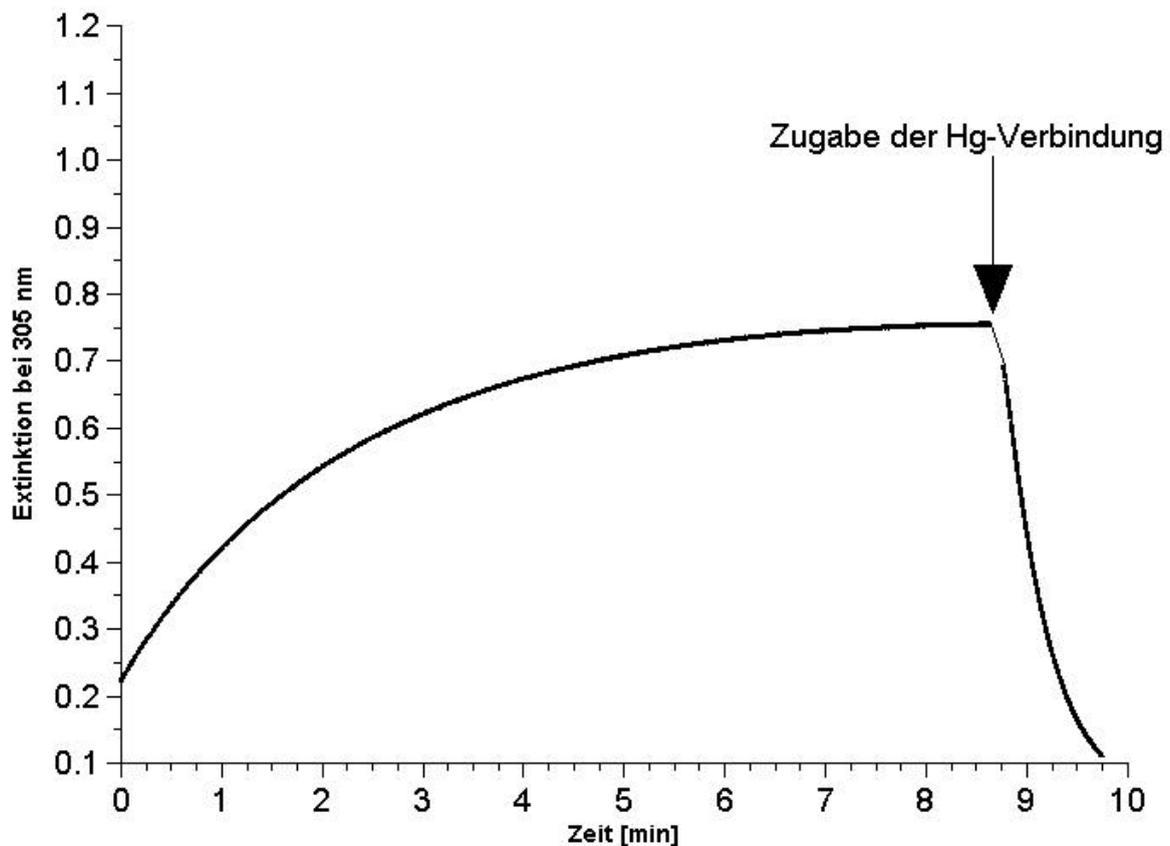


Abb. 29: Enzymkatalysierte Bildung von 3-OxoadipylCoA durch 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 und Zerstörung des CoA-Esters durch Zugabe von *p*-Chlormercuribenzoat. Die Konzentrationen der Reaktanden in der Lösung betrug bei Enzymzugabe 3,5 mM 3Oxadipat und 0,15 mM SuccinylCoA. Zu 990 μL Lösung wurden 10 μL 10 mM *p*-Chlormercuribenzoat-Lösung zugegeben.

Die Zugabe von Cu^{2+} - und Zn^{2+} -Verbindungen (jeweils 1mM) zu einer 3-OxoadipylCoA-Lösung führt zu einer Trübung der Lösung. Die verbliebene Aktivität wurde hierdurch mit entsprechender Ungenauigkeit zu 80-95% der Ausgangsaktivität ermittelt. Ein signifikanter Aktivitätsverlust wird jedoch offenbar von der Anwesenheit dieser Schwermetallionen nicht bewirkt.

NADH

Die enzymatische Darstellung von 2-Chlor-3-oxoadipat durch Maleylacetat-Reduktase aus *Pseudomonas* sp. B13 erfolgt unter Beteiligung von NADH. Um zu klären, ob die Aktivität der Transferase bei mittels Maleylacetat-Reduktase gebildeten Substraten aufgrund einer NADH-Hemmung verhindert wird, wurde NADH als Hemmstoff getestet.

Die Anwesenheit von NADH im Enzymtest für die Transferase führte bei höheren Konzentrationen zu einem relevanten Aktivitätsverlust. Während eine Konzentration von 0,4 mM NADH noch keine signifikante Reduzierung der Aktivität verursachte, bewirkte eine Konzentration von 0,8 mM im Enzymtest einen Rückgang der Aktivität auf 70 % der Ausgangsaktivität.

Die Ausgangskonzentration an NADH bei der enzymatischen Darstellung von Substraten für die Transferase-Reaktion betrug lediglich 0,4 mM und nahm durch die Reaktion ab. Daher sollte die verbleibende Konzentration an NADH in Versuchen mit mittels Maleylacetat-Reduktase gebildeten Substraten keinen Einfluss auf die Transferase-Aktivität haben. Eine NADH-Hemmung als Erklärung für das Fehlen von Aktivität mit den verschiedenen Substraten kann dem entsprechend vernachlässigt werden.

2-Chlor-3-oxoadipat und Derivate

Die Verbindung 2-Chlor-3-oxoadipat wurde als potentielles Substrat für die Transferase untersucht. Eine Aktivität gegenüber dieser Verbindung konnte jedoch wie oben gezeigt nicht nachgewiesen werden (siehe 3.4.2.5.). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum 3-Oxoadipat wurde die Möglichkeit der kompetitiven und unkompetitiven Hemmung untersucht. Hierzu wurden Lineweaver-Burk-Diagramme der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase bei Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von 2-Chlor-3-oxoadipat erstellt. Anhand der gefundenen Geraden zeigte sich die grundsätzliche Fähigkeit der Substanz, die Aktivität der Transferase gegenüber dem Substrat 3-Oxoadipat zu hemmen.

Die verschiedenen Geraden der Lineweaver-Burk-Diagramme führen bezüglich der Art und Weise der Hemmung zu keinem eindeutigen Ergebnis. Sie sind weder parallel, noch besitzen sie einen gemeinsamen Schnittpunkt. Demnach ist die Verbindung nicht in der Lage im aktiven Zentrum des Enzyms zu binden, was einer kompetitiven Hemmung entsprechen würde. Auch Hinweise auf eine reine Bindung der Substanz an den Enzym-Substrat-Komplex ohne im Aktiven Zentrum zu binden, entsprechend einer unkompetitiven Hemmung, liegen nicht vor.

Zum gleichen Ergebnis führte die Untersuchung von 2-Hydroxy-3-oxoadipat als Hemmstoff für die Transferase beim Umsatz von 3-Oxoadipat. Die Verbindung entsteht in geringen Anteilen bei der alkalischen Hydrolyse von 5-Chlorenlacton zum 2-Chlor-3-oxoadipat mittels NaOH bei pH-Werten $>$ pH 8,0. Die durch nucleophile Substitution des Chlors durch OH gebildete Substanz könnte demnach durch ihr Hemmvermögen mitverantwortlich dafür sein, dass die Transferase 2-Chlor-3-oxoadipat nicht umsetzt.

Als weiteres in 2-Position substituiertes 3-Oxoadipat wurde 2-Methyl-3-oxoadipat auf seine Eigenschaft hin untersucht, die Transferase beim Umsatz von 3-Oxoadipat zu hemmen. Eine Aktivität der Transferase gegenüber der Verbindung konnte in vorausgehenden Versuchen nicht nachgewiesen werden (siehe 3.4.2.5.). Die Auftragung der Messwerte nach Lineweaver-Burk in doppelt reziproker Form zeigte eine Hemmung der Transferase durch diese Substanz. Eine Zuordnung der Art der Hemmung (kompetitiv oder unkompetitiv) ist auch bei dieser Substanz wie bei den o.g. Verbindungen ebenso wenig möglich.

Gegenüber 2-Oxoadipat konnte im Versuch eine Aktivität der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 nachgewiesen werden (siehe 3.4.2.5.). Entsprechend diesem Ergebnis zeigt die Lineweaver-Burk-Auftragung mit dieser Substanz (**Abb. 30**) eine gemischt-kompetitive Hemmung. Die erhaltenen Geraden der Lineweaver-Burk-Auftragung haben einen gemeinsamen Schnittpunkt, der jedoch nicht wie bei einer reinen kompetitiven Hemmung auf der Abszisse des Graphen liegt. Demnach bindet 2-Oxoadipat sowohl im aktiven Zentrum der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase, wie auch an den durch 3-Oxoadipat, SuccinylCoA und der Transferase gebildeten Enzym-Substrat-Komplex.

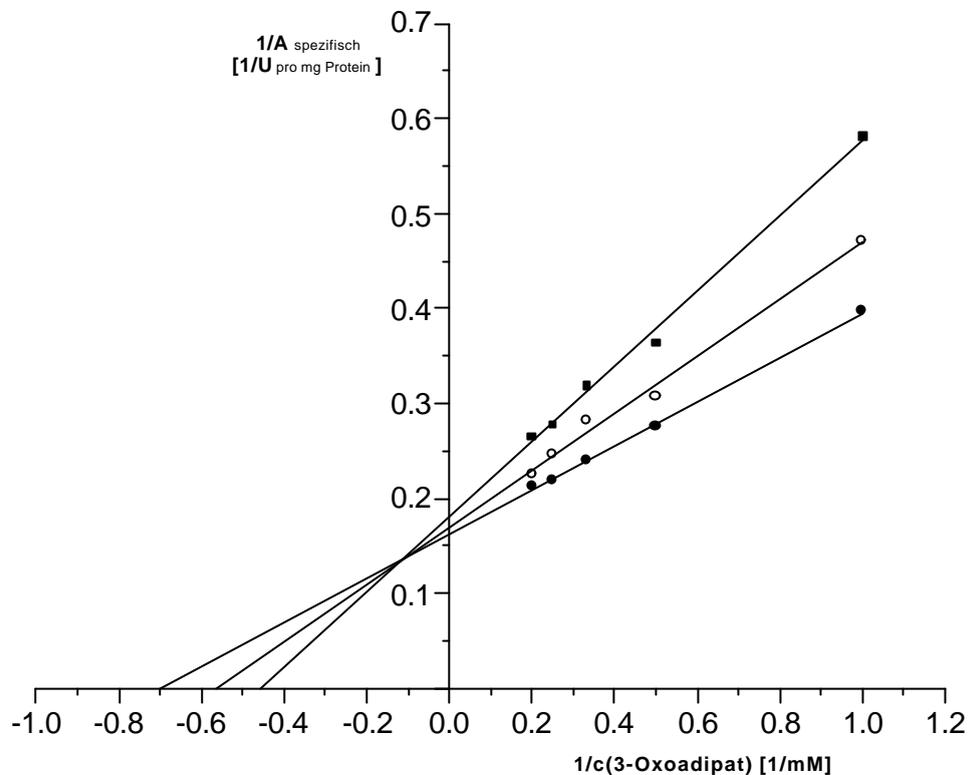


Abb. 30: Hemmung der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase-Aktivität durch 2-Oxoadipat. Lineweaver-Burk-Diagramme von Aktivitätsmessungen der 3Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase mit unterschiedlichen 3Oxoadipat-Konzentrationen im Standardenzymtest (siehe 2.8.4.). Jede Gerade repräsentiert die Anwesenheit einer festen 2-Oxoadipat-Konzentration während des Enzymtests:

- 0 mM 2-Oxoadipat; o 2,5 mM 2-Oxoadipat; ■ 5,0 mM 2-Oxoadipat

Die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 ist aufgrund der gefundenen Daten ein spezifisches Enzym für 3-Oxoadipat. Sie setzt nur wenige andere Substrate mit sehr geringer Aktivität um. Von 12 untersuchten Verbindungen waren nur 2-Oxoadipat, 3-Oxoglutarat und 4-Methyl-3-oxoadipat Substrate der B13-Transferase. Substituenten in 2-Position bewirkten stets eine Inaktivität des Enzyms.

3.5. Reinigung und Charakterisierung der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13

Im Gegensatz zur 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 erwies sich die Thiolase als hitzelabil. Die verbleibende Aktivität betrug bei 60°C über 10 Minuten weniger als 50% der Ausgangsaktivität. In Ergänzung zur Hitzelabilität ist die Thiolase hoch sensibel gegenüber höheren Ammoniumsulfat-Konzentrationen. Bei einer 75%igen Sättigung eines verdünnten Rohextraktes ist im Überstand keine Thiolase-Aktivität mehr nachweisbar. Das in 25 mM Tris/HCl, pH 7,0 resuspendierte Proteinpellet weist weniger als 60% der Thiolase-Aktivität des verdünnten Rohextraktes auf. Sowohl die Hitzefällung wie auch die Ammoniumsulfatfällung sind daher als Methoden zur Reinigung der Thiolase nicht geeignet. Eine für die Affinitätschromatographie (siehe 3.5.1.2.) als Säulenmaterial getestete CoA dotierte Agarose („CoA insolubilized on cross-link 4% beaded agarose“, Fa. Sigma, Deisenhofen) erwies sich in Versuchen zur Binfähigkeit gegenüber der Thiolase für die Reinigung des Enzyms als ungeeignet. Obwohl CoA beim Umsatz von 3-OxoadipylCoA durch die Thiolase als Coenzym fungiert, konnte keine effektive Bindung des Enzyms an das Säulenmaterial erzielt werden.

3.5.1. Reinigung der 3-OxoadipylCoA-Thiolase

Die Reinigung der Thiolase erfolgte ausgehend von Rohextrakt (Darstellung siehe 2.6.) aus 3-Chlorbenzoat-gewachsenen *Pseudomonas* sp. B13-Zellen über die folgenden Stufen:

1. DEAE-Sepharose CL-6B Ionenaustauschchromatographie
2. Cibacron Blue 3G-A Agarose Affinitätschromatographie
3. Reactive Brown 10 Agarose Affinitätschromatographie

3.5.1.1. DEAE Sepharose CL-6B Ionenaustauschchromatographie

Die Elution der 3-OxoadipylCoA-Thiolase erfolgte bei ca. 0,25 M KCl. Bei der Ionenaustauschchromatographie konnten 84 % der aufgetragenen Proteinmenge vom aktiven Enzym getrennt werden. Der Verlust an Gesamtaktivität bei der Ionenaustauschchromatographie betrug ca. 45 %. Es konnte eine erhebliche Menge an Protein abgetrennt werden, jedoch resultierte eine relative geringe Anreicherung.

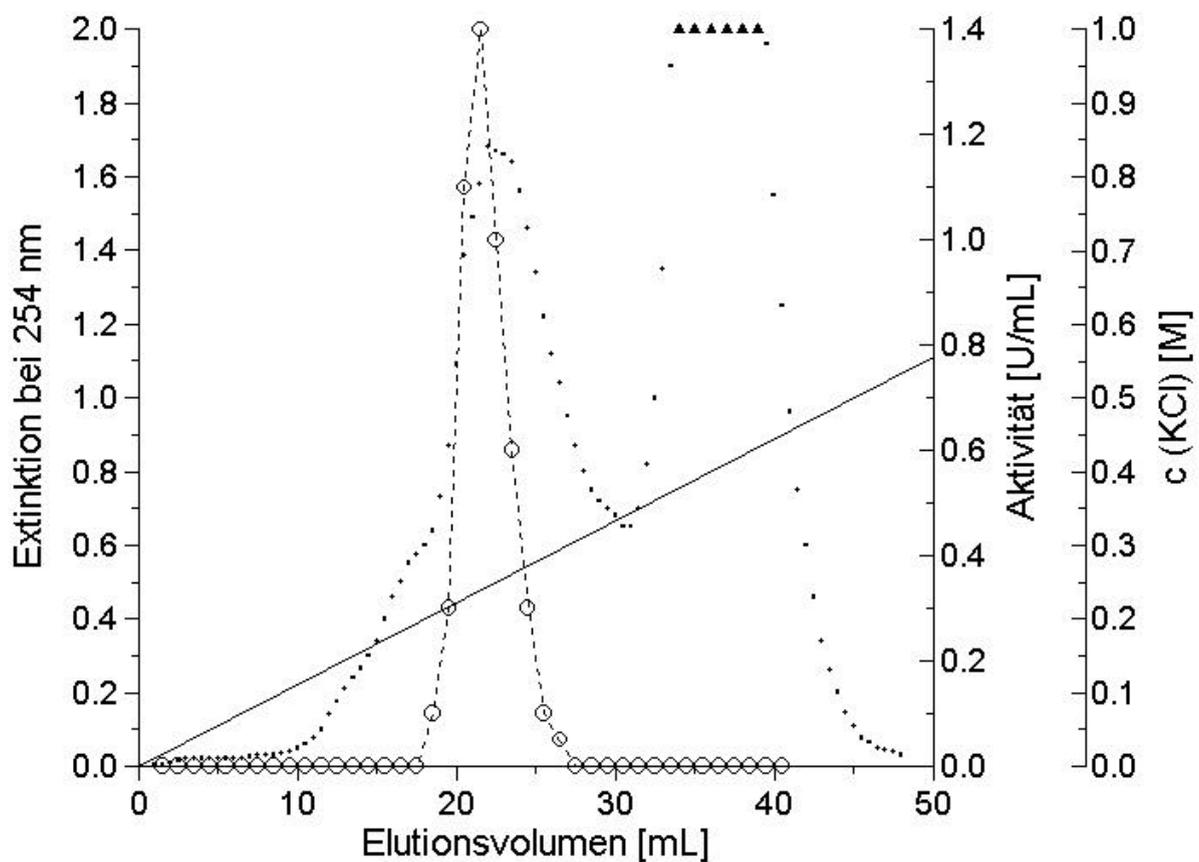


Abb. 31: DEAE Ionenaustauschchromatographie der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13.

[(....) = Proteinelution (Extinktion bei 254 nm), (ooo) = Aktivität, (—) = c (KCl)]

3.5.1.2. Cibacron Blue 3G-A Agarose Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie beruht auf dem Verteilungsgleichgewicht gelöster Proteine zwischen flüssiger (Lösung = mobile Phase) und fester (Matrix = stationäre Phase) Phase. Die Trennung erfolgt aufgrund unterschiedlicher Affinitäten der Proteine zu den funktionellen Gruppen der Matrix. Die Affinität kann z.B. auf der Ähnlichkeit der funktionellen Gruppen einer Matrix mit Substraten, Inhibitoren oder Antikörpern eines Proteins beruhen. Das Verteilungsgleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase hängt im wesentlichen von der Ionenkonzentration und dem pH-Wert der Lösung ab, da diese Faktoren in der Lage sind das Gleichgewicht zu verschieben.

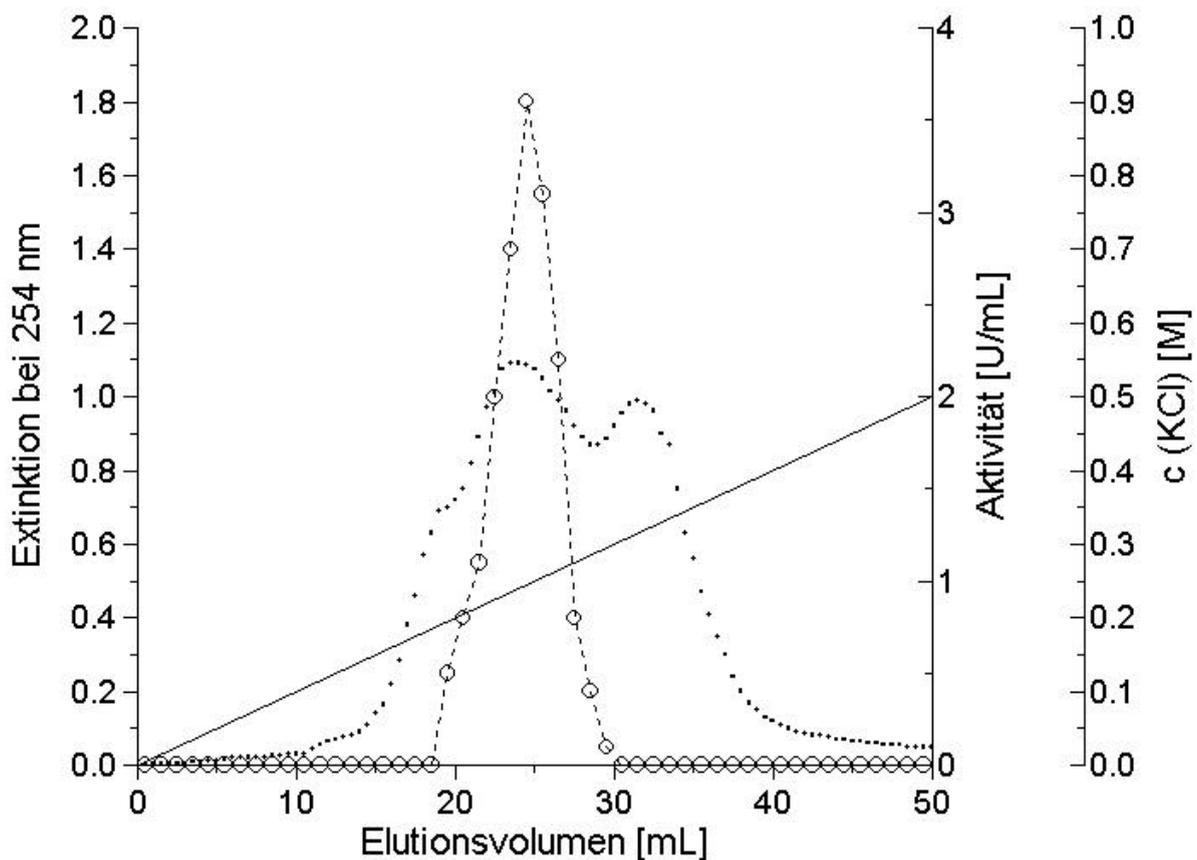


Abb. 32: Reactive Blue Affinitätschromatographie der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13.

[(...) = Proteinelution (Extinktion bei 254 nm), (ooo) = Aktivität, (—) = c (KCl)]

Bei diesem Anreicherungsschritt erfolgte die Elution der Thiolase bei ca. 0,25 M KCl. Von der aufgetragenen Proteinmenge wurden ca. 54 % vom aktiven Enzym abgetrennt. Trotz des gleichfalls erheblichen Verlustes an Gesamtaktivität von ca. 45% konnte bei dieser Chromatographie eine geringe Anreicherung erzielt werden.

3.5.1.3. Reactive Brown 10 Agarose Affinitätschromatographie

Im letzten durchgeführten Anreicherungsschritt erfolgte die Elution des aktiven Enzyms bereits bei 0,18 M KCl. Da bei dieser Chromatographie ca. 96 % der aufgetragenen Proteinmenge vom aktiven Enzym abgetrennt werden konnten, wurde trotz des großen Verlustes an Gesamtaktivität (ca. 75 %) eine gute Aufreinigung erzielt.

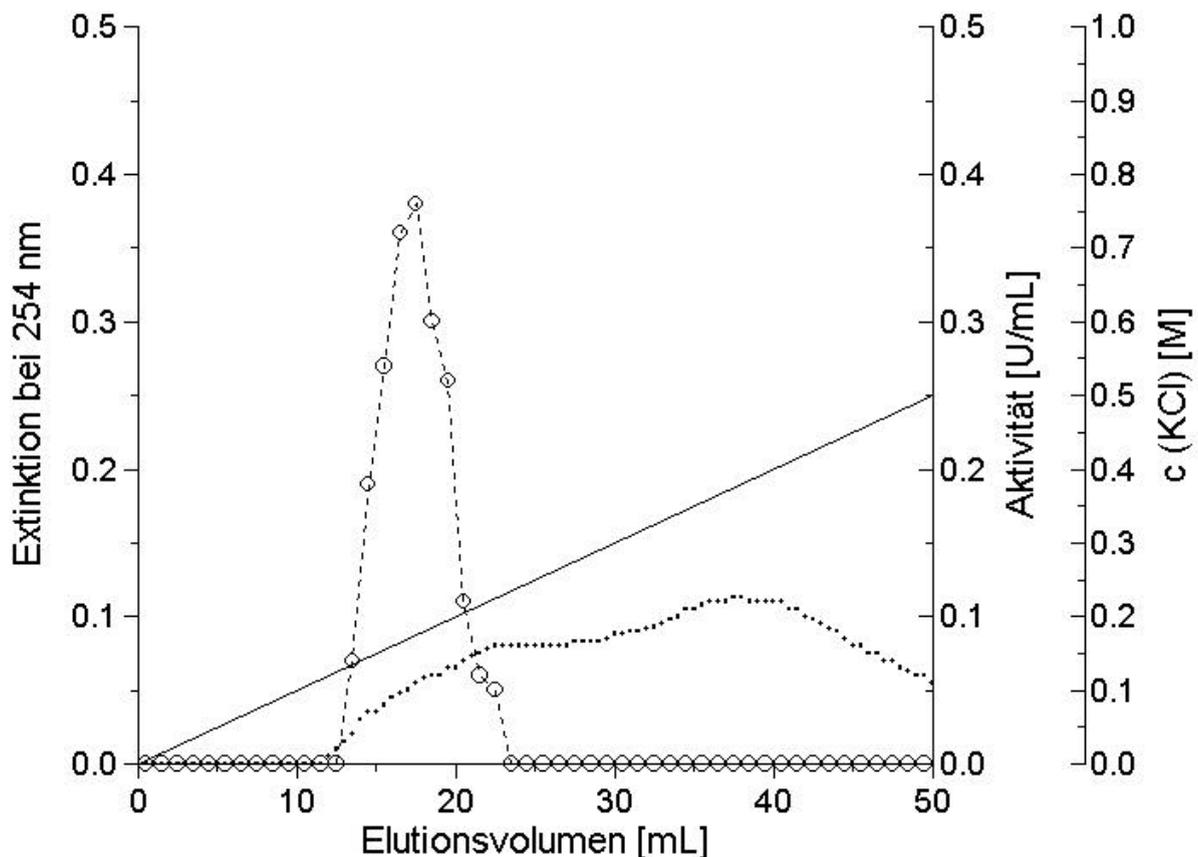


Abb. 33: Reactive Brown Affinitätschromatographie der 3-Oxoadipyl-CoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13.

[(...) = Proteinelution (Extinktion bei 254 nm), (ooo) = Aktivität, (—) = c (KCl)]

Der Reinheitsgrad des Enzyms an dieser Stelle war ausreichend, um in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eine saubere Proteinbande für das Enzym isolieren zu können (siehe 3.5.2.1.).

Daten wie Ausbeuten und Anreicherungsfaktoren sind für jeden Reinigungsschritt in nachfolgender **Tabelle 10** zusammengefasst:

Tab. 10: Anreicherungsfaktoren und Ausbeuten der Reinigung der 3-OxoadipylCoA-Thiolase.

Reinigungsschritt <i>Methode</i> Material	Volumen [mL]	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [U]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungsfaktor
<i>Rohextrakt</i>	5	126	49	0,39	100	1
<i>Ionenaustauschchromatographie</i> DEAE Sepharose CL-6B	3,1	20,7	27	1,3	54	3,3
<i>Affinitätschromatographie</i> Cibacron Blue 3G-A Agarose	1,35	9,5	15	1,58	30	4,1
<i>Affinitätschromatographie</i> Reactive Brown 10 Agarose	0,12	0,36	4	11,1	8	28,5

3.5.2. Charakterisierung der 3-OxoadipylCoA-Thiolase

3.5.2.1. Enzymgröße

Die Anreicherung des Enzyms konnte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese gezeigt werden.

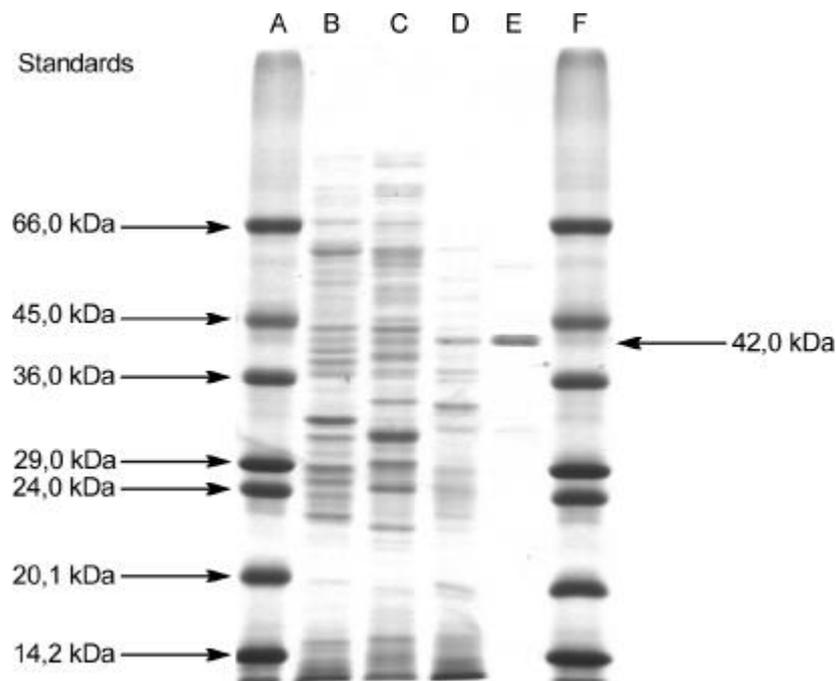


Abb. 34: SDS-PAGE von Proben der Anreicherung der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13.

Die Tröge des Elektrophoresegels enthielten folgende Proben: **A** und **F** Molekulargewichtsmarker (10 µg Protein), **B** Rohextrakt aus *Pseudomonas* sp. B13 (15 µg Protein), **C** DEAE-Eluat (15 µg Protein), **D** Blue 3G-A-Eluat (6 µg Protein), **E** Reactive Brown-Eluat (4 µg Protein)

Die im letzten Anreicherungsschritt erhaltene Enzymlösung zeigte nach Coomassie-Färbung ein starke und zwei sehr schwache Banden im SDS-Gel. Entsprechend der Eichgeraden (siehe 2.10.1.2.) entspricht die Größe der starken Proteinbande 42 kDa.

Die Größe des nativen Enzyms wurde durch analytische Gelfiltration über eine Superose[®] 6 Gel-Säule (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden) bestimmt. Entsprechend einer Eichgeraden (siehe 2.11.) wurde für die Thiolase eine Proteingröße von 162 ± 13 kDa ermittelt.

Auf Grundlage dieser Resultate handelt es sich bei der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 um ein homotetrameres 168 kDa großes Enzym des Typs A₄, bestehend aus 4 gleichen 42 kDa großen Enzym-Untereinheiten. Berechnet mittels der spezifische Aktivität des nahezu reinen Enzyms ($A_{\text{spez.}} = 11,1 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$) folgt eine katalytische Konstante der B13-Thiolase von $k_{\text{cat.}} \cong 470 \text{ min}^{-1}$.

3.5.2.2 N-terminale Aminosäuresequenz

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des Enzyms wurden die Proteinbanden eines SDS-Gels der finalen Enzympräparation aus 3.5.1. durch Elektroblootting nach KHYSER-ANDERSEN (2.10.2.1.) auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Amidoschwarzlösung gefärbt (2.10.2.1.). Die dem Enzym entsprechende gefärbte Proteinbande wurde aus der Membran ausgeschnitten und der N-terminalen Sequenzierung zugeführt. Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz erfolgte am Institut für Enzymtechnologie der Universität Düsseldorf, Außenstelle Jülich, durch Herrn Dr. Elling mit nachfolgendem Ergebnis (? = unbestimmte Aminosäure):

Untereinheit A: SREVYI?DAVRTPIGRFG

3.5.2.3. pH-Optimum

Der optimale pH-Wert für den enzymatischen Umsatzes von 3-OxoadipylCoA durch das Enzym 3-OxoadipylCoA-Thiolase wurde mit Hilfe des unter Punkt 2.8.5. aufgeführten Standardenzymtests ermittelt. Folgende relative Aktivitäten wurden gemessen.

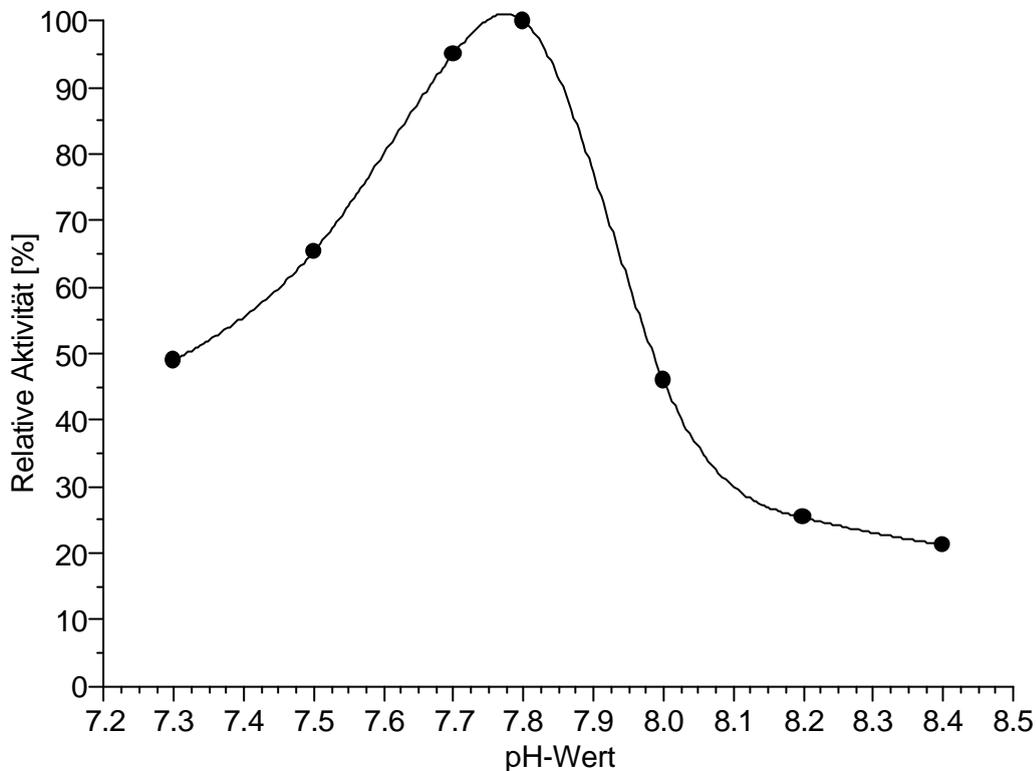


Abb. 35: Der Effekt des pH-Wertes auf die 3-OxoadipylCoA-Thiolase-Aktivität.

Aufgrund der ermittelten Daten beträgt der optimale pH = 7,8 für die Umsetzung von 3-OxoadipylCoA durch die 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13.

3.5.2.4. Kinetische Daten

Unter Verwendung des Standardenzymtests (siehe Punkt 2.8.5.) wurden folgende K_M - und V_{max} -Werte der Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 für das Substrat 3-OxoadipylCoA und das Cosubstrat Coenzym A ermittelt:

3-OxoadipylCoA:	$K_M = 0,15 \text{ mM}$	$V_{max} = 1,5 \text{ U/mg Protein}$
Coenzym A:	$K_M = 0,01 \text{ mM}$	$V_{max} = 0,9 \text{ U/mg Protein}$

Für die Messung der 3-OxoadipylCoA-abhängigen Daten waren Enzympräparationen mit unterschiedlicher Endkonzentration von 3-OxoadipylCoA erforderlich. Die Darstellung

entsprechender 3-OxadipylCoA-Lösungen erfolgte durch Variation der eingesetzten Menge an SuccinylCoA je Präparation. Die Präparationen erfolgten mittels gereinigter Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13. Je Messwert wurden 980 μL 3-OxadipylCoA-Lösung hergestellt und 10 μL Enzympräparation aus *Pseudomonas* sp. B13 hinzugefügt. Jede Messung wurde durch Zugabe von 0,2 μmol Coenzym A in 10 μL H_2O gestartet. Die Bestimmung der Konzentration an 3-OxadipylCoA erfolgte bei jeder Messung zum Startzeitpunkt der Reaktion aus der Extinktion der Lösung mittels des molaren Extinktionskoeffizienten ($16.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Zur Bestimmung der Coenzym A-abhängigen Daten wurde zunächst eine Stammlösung von 3-OxadipylCoA enzymatisch mit gereinigter Transferase hergestellt. Für die Präparation der Lösung wurden bezogen auf 10 mL folgende Substanzmengen eingesetzt und nach der Zugabe des Enzyms 15 Minuten inkubiert:

350	μmol	Tris/HCl-Puffer pH 8,0
250	μmol	MgCl_2
1,5	μmol	SuccinylCoA
35	μmol	3-Oxadipat
30	μL	Transferase-Enzympräparation

Die Messung der einzelnen Punkte für die Lineweaver-Burk-Auftragung erfolgte zügig, um eine Schwankungen der 3-OxadipylCoA-Konzentration der Stammlösung durch thermischen Zerfall des Thioesters zu vermeiden. Eine Kühlung der Stammlösung schien in diesem Fall nicht angebracht, um Temperaturschwankungen zwischen den Einzelmessungen zu vermeiden. Je Messwert wurden 940 μL 3-OxadipylCoA-Stammlösung und 10 μL Enzympräparation aus *Pseudomonas* sp. B13 eingesetzt. Jede Messung wurde durch Zugabe von Coenzym A in Konzentrationen von 0,025 - 0,3 μmol in 50 μL H_2O gestartet.

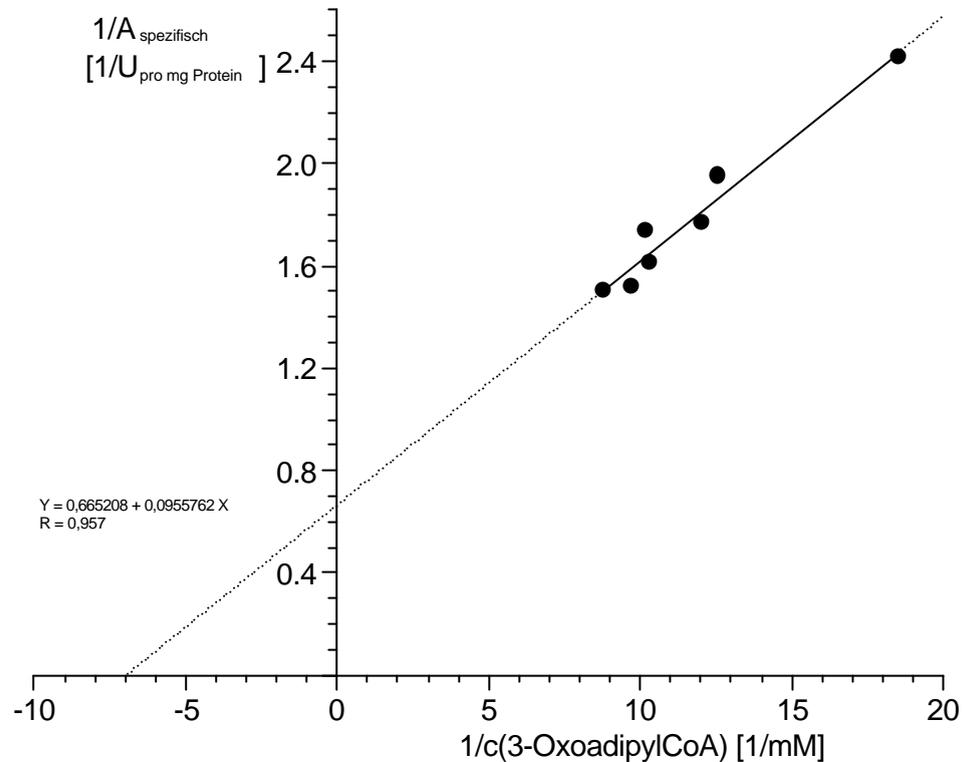


Abb. 36: Lineweaver-Burk-Diagramm der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 für das Substrat 3-OxoadipylCoA bei fester CoA-Anfangs-Konzentration [0,2 mM].

Die Berechnung der K_M - und V_{max} -Werte erfolgte durch graphische Auswertung der Michaelis-Menten-Gleichung in doppelt-reziproker Form nach Lineweaver-Burk. Für jede Messung wurde die Konzentration des Cosubstrates zum Zeitpunkt der Enzymzugabe gleich gehalten. Sie wurde als feststehende Größe definiert, um den Enzym-Substrat-Komplex als Michaelis-Menten-Komplex zu abstrahieren.

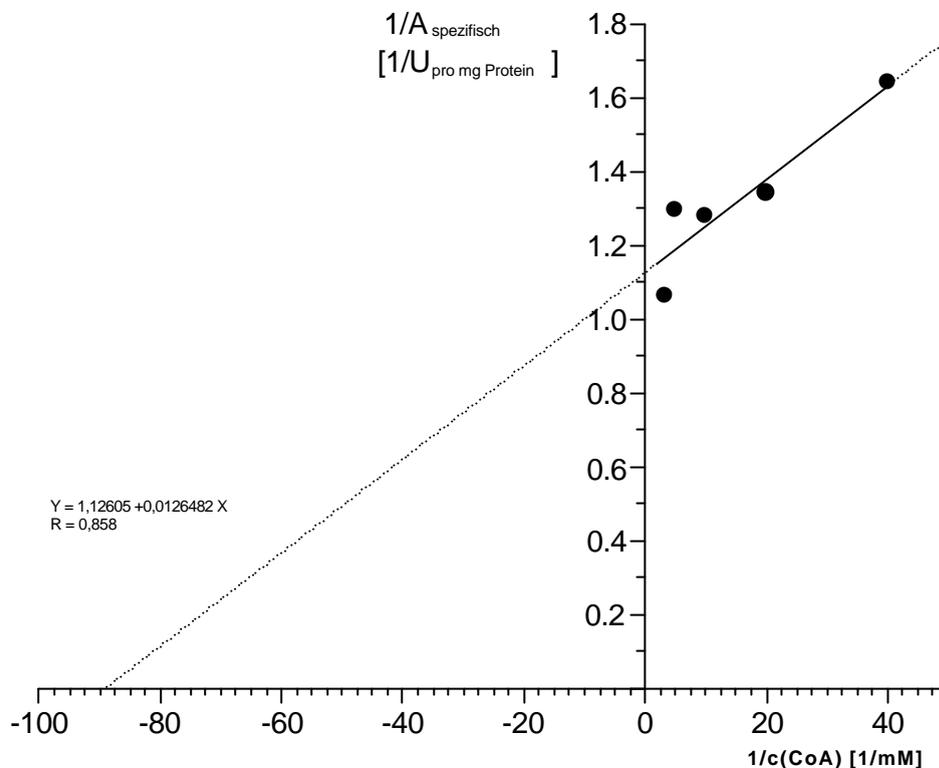


Abb. 37: Lineweaver-Burk-Diagramm der 3-Oxoacetyl-CoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 für das Substrat CoA bei fester 3-Oxoacetyl-CoA-Anfangs-Konzentration [0,08 mM].

3.5.2.5. Substratspektrum

Halogen- und methylsubstituierte 3-Oxoacetyl-CoA-Ester

Da auf enzymatischem Weg eine Präparation von halogensubstituierten 3-Oxoacetyl-CoA-Ester nicht möglich war, konnte ein Substratspektrum der 3-Oxoacetyl-CoA-Thiolase für diese Verbindungen nicht erfasst werden (siehe 3.4.2.5.).

Methylsubstituierte 3-Oxoacetyl-CoA-Ester konnten ebenso nicht enzymatisch in nachweisbarer Menge präpariert werden. Eine Aktivität der Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 in Kombination mit der Thiolase gegenüber 4-Methyl-3-oxoacetyl-CoA wurde durch HPLC gezeigt (siehe 3.4.2.5.). Demnach sollte das Zwischenprodukt dieser gekoppelten Enzymreaktion, 4-Methyl-3-oxoacetyl-CoA, Substrat der Thiolase sein. 2-Methyl-3-oxoacetyl-CoA wurde von der Transferase und Thiolase in Kombination nicht umgesetzt.

3.5.2.6. Hemmung

Durch die Zugabe verschiedener Substanzen wie Komplexbildner und Schwermetalle zum Standardzymtest für die Thiolase (2.8.5.) wurde der Effekt solcher Stoffe auf die Enzymaktivität getestet.

Komplexbildner

Komplexbildende Substanzen wie EDTA und o-Phenanthrolin verursachten bei einer Konzentration von 1 mM keine Änderung der Enzymaktivität. 1 mM Cyanidionen (NaCN) verursachten ebenfalls keinen signifikanten Aktivitätsverlust. Die Aktivität des Enzyms scheint demnach unabhängig von der Anwesenheit zweiwertiger Metallionen zu sein.

Schwermetallionen

Die Anwesenheit von Cu^{2+} (1 mM) im Enzymtest führt zu einer starken Reduzierung der Enzymaktivität um 90%. Ebenso führte die Gegenwart von Zn^{2+} (1mM) zu einem Rückgang der Enzymaktivität um 54%.

Die Auswirkung von HgCl_2 oder *p*-Chlormercuribenzoat auf die Enzymaktivität konnte nicht gemessen werden, da diese Quecksilberverbindungen den Thioester 3-OxoadipylCoA nach der Zugabe zur Reaktionslösung spontan zerstören (siehe hierzu auch 3.4.2.6.).

NADH

Die Gegenwart von NADH führte zu einem signifikantem Aktivitätsverlust des Enzyms. Die Anwesenheit von 0,2 mM NADH im Enzymtest zeigt noch keine Auswirkung auf die Aktivität, doch bereits eine Konzentration von 0,4 mM bewirkt einen Rückgang der Aktivität um 10%. Bei einer Konzentration von 0,8 mM ist ein Rückgang der Aktivität um 42% feststellbar.

4. Diskussion

Die 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase und die 3-OxoadiypylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13, zwei Enzyme des aeroben mikrobiellen Aromatenabbaus, wurden gereinigt und untersucht. Sie bilden die beiden letzten Stufen des *ortho*-Weges, einer Abbausequenz, die in den Tricarbonsäure-Cyclus mündet. Die Substratspezifität beider Enzyme stand im Mittelpunkt des Interesses, mit besonderem Augenmerk auf chloresubstituierte Substrate, welche potentiell während des mikrobiellen Abbaus von chlorierten Brenzkatechinen entstehen können.

Für die Untersuchung der Substratspezifität wurde eine HPLC-Analytik von CoA - Estern etabliert, welche als Cosubstrate sowie als Zwischen- bzw. Endprodukte an der Substratumwandlung durch die Transferase und Thiolase beteiligt sind.

4.1. 3-Oxadipat:SuccinylCoA-Transferase

Coenzym A - Transferasen bilden eine heterogene Gruppe von Enzymen, die einen reversiblen Transfer von Coenzym A von einer Carbonsäure zu einer anderen Carbonsäure katalysieren. Mechanistisch handelt es sich hierbei um einen „ping-pong-Mechanismus“, wobei Coenzym A übergangsweise kovalent in Form eines Thioesters im aktiven Zentrum der Transferase gebunden wird (JENCKS 1973). An dieser Bindung ist Glutamat beteiligt (ROCHET & BRIDGER 1994), dessen Vorhandensein im aktiven Zentrum auch für die Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 nachgewiesen wurde (GÖBEL et al. 2002). Der katalytischer Cyclus umfasst 4 Stufen, in denen jeweils eine nucleophile Substitution unter Beteiligung der Carbonylgruppe des Glutamats stattfindet (**Abb. 38**). Als Nucleophil agieren hierbei wechselweise das Carboxylat-Anion des Glutamats, das Thiolat-Anion des Coenzym A und das Carboxylat-Anion der umzusetzenden Carbonsäure. In Bezug auf die B13-Transferase handelt es sich hierbei um 3-Oxadipat.

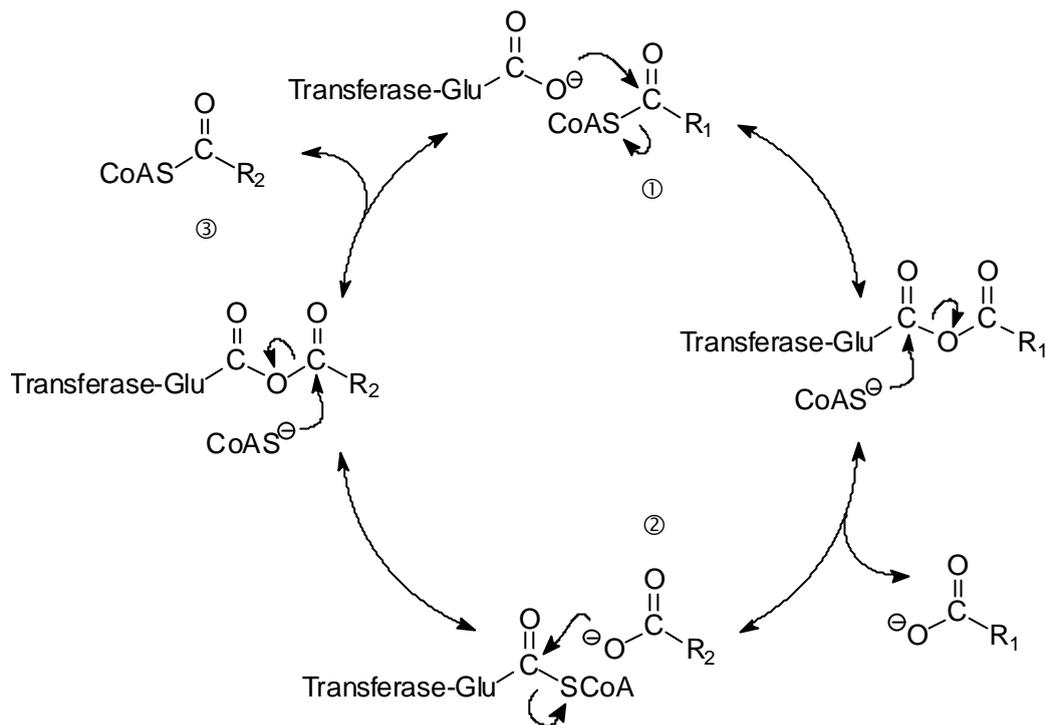


Abb. 38: Mechanistisches Modell der Transferase-Reaktion. ① SuccinylCoA, ② 3-Oxoadipat, ③ 3-OxoadipylCoA, $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_2 = \text{CH}_2(\text{CO})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$.

Coenzym A - Transferasen wurden in zahlreichen prokaryotischen Zellen, wie anaeroben und aeroben Bakterien sowie in mitochondrialem menschlichen Gewebe nachgewiesen. Es sind sehr konservative Enzyme bezüglich des Katalysemechanismus und ihrer Funktionalität des reversiblen Transfers von CoA von einer Carbonsäure auf eine andere. Das Substratspektrum verschiedener CoA-Transferasen hingegen und ihre Aufgaben im Metabolismus scheint dem entgegen sehr unterschiedlich:

- SuccinylCoA:3-Oxocarbonsäure CoA-Transferase [EC 2.8.3.5], die für die Bildung von AcetoacetylCoA verantwortlich ist. Sie katalysiert den Transfer von CoA aus SuccinylCoA auf eine 3-Oxocarbonsäure, üblicherweise Acetoacetat.
- Bakterielle 3-Oxoadipat:CoA-Transferase [EC 2.8.3.6], welche im *ortho*-Weg die vorletzte Stufe des Abbaus von Benzoat und 4-Hydroxybenzoat hin zum Tricarbonsäure-Cyclus katalysiert.
- Bakterielle AcetylCoA:Acetoacetat CoA-Transferase [EC 2.8.3.8], die am Fumarat-Abbau durch *Treponema phagedenis* (GEORGE & SMIBERT 1982) und am Fettsäure-Abbau durch *Escherichia coli* (VANDERWINKEL et al. 1968) beteiligt ist.

- Butyryl-CoA:Acetoacetat CoA-Transferase [EC 2.8.3.9], die am Lysin-Abbau durch ein *Clostridium* sp. beteiligt ist (BARKER et al. 1978).
- Glutaconat CoA-Transferase [EC 2.8.3.12], die am Glutamat-Abbau durch den strikt anaeroben Organismus *Acidaminococcus fermentans* beteiligt ist.

In bezug auf ihre Funktion kann die Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 als eine 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase definiert werden. Dies gilt insbesondere unter dem Aspekt, dass weder Acetoacetat als CoA-Akzeptor noch AcetylCoA als CoA-Quelle von der Transferase genutzt werden.

CoA-Transferasen können aus unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut sein. Eukaryotische CoA-Transferasen sind zumeist monomere Enzyme. Der Aufbau der Untereinheiten bakterieller Transferasen hingegen schwankt zwischen Monomeren des Typs A (BAETZ & ALLISON 1990) bis hin zu Heterooktameren des Typs (AB)₄ (BUCKEL et al. 1981). Die meisten CoA-Transferasen sind Heterodimere aus zwei Untereinheiten (A und B) mit einer jeweiligen Größe von ca. 25 kDa.

PARALES & HARWOOD (1992) isolierten eine Transferase aus *Pseudomonas putida*, deren Untereinheiten A und B kolinear der monomeren Protein-Untereinheit der SuccinylCoA:3-Oxocarbonsäure-Transferase aus Schweineherz ist. Bakterielle Transferase von homodimerem Aufbau und kolinearer Sequenz zur monomeren Transferase-Untereinheit aus Schweineherz wurde aus *Peptostreptococcus elsdenii* (TUNG & WOOD 1975) und *Clostridium aminobutyricum* (SCHERF & BUCKEL 1991) isoliert.

Die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 ist ein heterotetrameres Enzym des Typs A₂B₂ mit einer Gesamtgröße von 120 kDa. Die Größe der Untereinheiten A und B betragen 32,9 bzw. 27 kDa. Die in dieser Arbeit bestimmten N-terminalen Aminosäuresequenzen der Untereinheiten A und B (3.4.2.2.) entsprechen der durch GOEBEL et al. (2002) bestimmten DNA-Sequenz (*catI* und *catJ*) für die Transferase aus B13.

Der Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen der B13-Transferase-Untereinheiten mit denen anderer bekannter Transferasen, gefolgert aus deren Gensequenzen, ergab nur eine geringe Übereinstimmung.

Die N-terminale Proteinsequenz der Untereinheit A der B13-Transferase weist eine 33%ige Identität mit der Transferase des anaeroben Organismus *Acidaminococcus fermentans* auf (MACK et al. 1994). Die 3-Oxoacetyl-CoA-Succinyl-CoA-Transferasen aus *Acinetobacter calcoaceticus* (CatI) und *Pseudomonas putida* (PcaI) sind zu 23% bzw. 27% homolog (HARTNETT et al. 1990, PARALES & HARWOOD 1992) zu der Untereinheit A der B13-Transferase (CatI).

-AE--LLTLREAVRFVNDGT-VALEGFTHLIPT-----	SubA (B13)
MSK--VMTLKDAIAKYVHSGDHIALGGFTTDRKPYAAVFEILR	SubA (<i>A. fermentans</i>)
** * * * ** **	33% Ident.
-AE--LLTLREAVRFVNDGT-VALEGFTHLIPT-----	SubA (B13)
MINKTYESIASAVEG-ITDGSTIMVGGFGTAGMPSELIDGLIA	PcaI (<i>A. calcoaceticus</i>)
*** ** **	23% Ident.
-AE--LLTLREAVRFVNDGT-VALEGFTHLIPT-----	SubA (B13)
MIDKSAATLTEALSQ-IHDGATILIGGFGTAGQPAELIDGLIE	CatI (<i>P. putida</i>)
** ** ** **	27% Ident.

Abb. 39: Homologie der N-terminalen Aminosäuresequenz der Untereinheit A der 3-Oxoacetyl-CoA-Succinyl-CoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 zur Untereinheit A von Transferasen anderer Mikroorganismen.

Die N-terminale Proteinsequenz der Untereinheit B der B13-Transferase ist zu 44% homolog der Untereinheit B der Glutaconat CoA-Transferase aus *Acidaminococcus fermentans*, jedoch nur zu 20% bzw. 16% der Transferasen aus *Pseudomonas putida* (PcaJ) und *Acinetobacter calcoaceticus* (CatJ). Die Acetoacetyl-CoA:Acetat/Butyrat:CoA-Transferase aus *Clostridium acetobutylicum* (ClosTr) ist hingegen zu 32 % identisch (PETERSEN et al. 1993).

<pre> -----SAYSTNEMMTVAAARRLKNGAVVFV----- MADYTNYTNKEMQAVTIAKQIKNGQVVTGTLPLIGASVAKR * ** * * *** ** * </pre>	<p>SubB (B13) SubB (<i>A. fermentans</i>) 44% Ident.</p>
<pre> -----SAYSTNEMMTVAAARRLKNGAVVFV----- MT-ITKKLRSRTEMAQRVAADIQEGAYVNLGIGAPTLVAN---- * * ** * </pre>	<p>SubB (B13) PcaJ (<i>P. putida</i>) 20% Ident.</p>
<pre> -----SAYSTNEMMTVAAARRLKNGAVVFV----- MS-Y-HKLTRDQIAQRVAQDIPEGSYVNLGIGLPTKIAS----- * * * * </pre>	<p>SubB (B13) CatJ (<i>A. calcoaceticus</i>) 16% Ident.</p>
<pre> -----SAYSTNEMMTVAAARRLKNGAVVFV----- MI-NDKNLAKEIIIAKRVAARELKNQQLVNLGVGLPTMVAD---- * ** ***** * </pre>	<p>SubB (B13) ClosTr (<i>C. acetobutylicum</i>) 32% Ident.</p>

Abb. 40: Homologie der N-terminalen Aminosäuresequenz der Untereinheit B der 3-Oxo-adipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 zur Untereinheit B von Transferasen anderer Mikroorganismen.

Die durch YEH & ORNSTON (1981) veröffentlichten N-terminalen 3-Oxo-adipat:Succinyl-CoA-Transferase -Aminosäuresequenzen aus *Acinetobacter calcoaceticus* und *Pseudomonas putida*, die später durch PARALES & HARWOOD (1992) zumindest für *P. putida* den Untereinheiten A: MINKTY bzw. B: MTITKKL zugeordnet wurden, weisen keinerlei Identität mit der in dieser Arbeit gefundenen 30 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Sequenz der Untereinheit A noch mit der 25 Aminosäure umfassenden Sequenz der Untereinheit B der B13-Transferase auf.

Hemmung

Komplexbildner wie EDTA oder *o*-Phenanthrolin haben bei Konzentrationen von 1 mM keine Auswirkung auf die Transferase-Aktivität. Demnach sind keine zweiwertigen Metallionen, wie beispielsweise Fe^{2+} , am Aufbau des aktiven Zentrums der Transferase beteiligt.

Eine Hemmung der Transferase-Aktivität im „klassischen Sinne“ durch HgCl_2 oder *p*-Chloromercuribenzoat konnte nicht festgestellt werden, da diese Quecksilberverbindungen das Produkt der Reaktion, den Thioester 3-Oxo-adipylCoA, spontan zerstören. Eine Beobachtung, die in ähnlicher Form bereits zuvor bei Untersuchungen mit reduziertem Glutathion und CoA gemacht wurde (ALLRED 1965; POWLOWSKI & DAGLEY 1985).

4.1.1. Substratspezifität der 3-Oxo adipat:SuccinylCoA-Transferase

Die 3-Oxo adipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 wurde in Bezug auf Ihre Aktivität gegenüber substituierten 3-Oxo adipaten neben 3-Oxo adipat als „Grundsubstrat“ untersucht. Denkbar ist die Entstehung substituierten Oxoadipate beispielsweise beim Abbau von 3,4,6-Trichlorbrenzkatechin. Die während des Abbaus durch die Chlormuconat-Cycloisomerase bewirkte 3- oder 4-Lactonisierung von 2,3,5-Trichlormuconat führt theoretisch zu in 2 oder 4-Position chlorierten 3-Oxo adipaten.

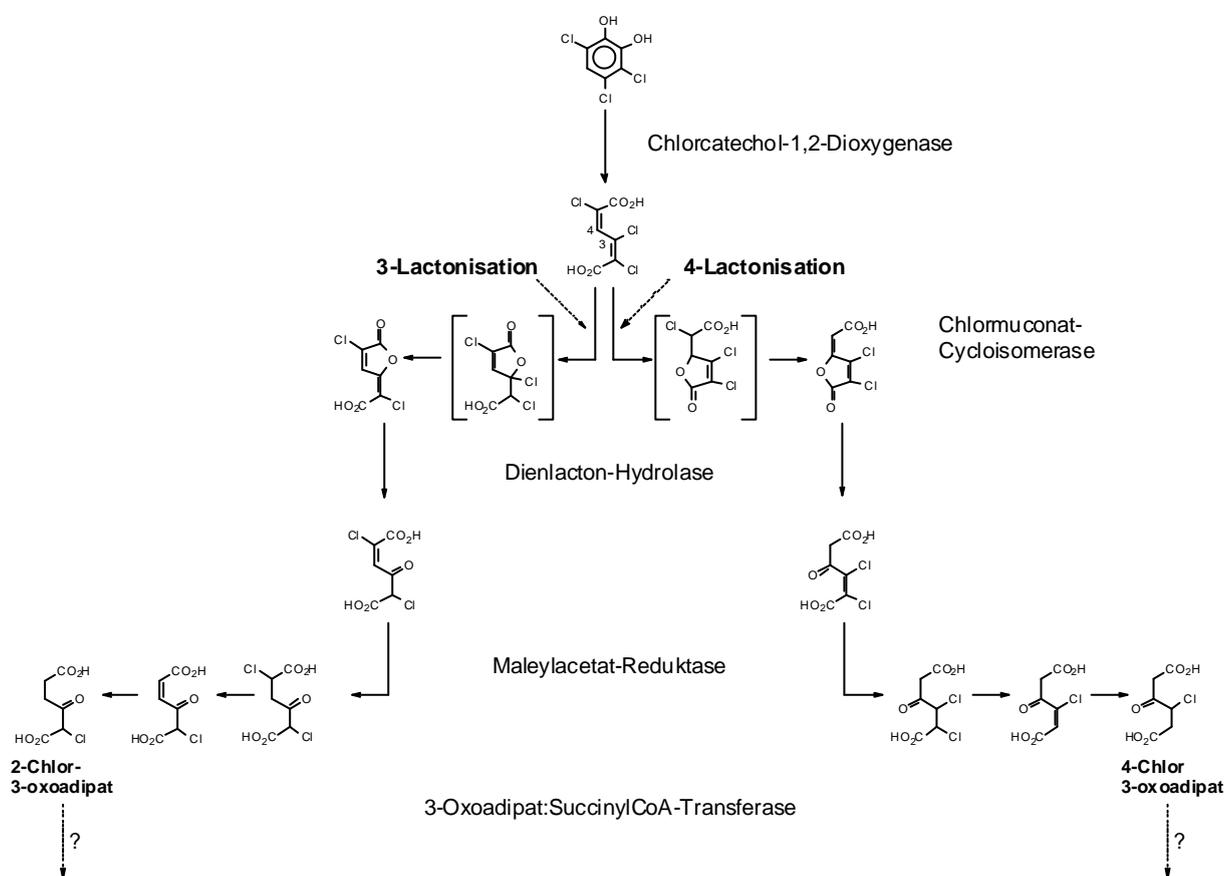


Abb. 41: Modell der Entstehung verschiedener chlorierter 3-Oxo adipate beim mikrobiellen Abbau von 3,4,6-Trichlorbrenzkatechin.

Die B13-Transferase weist eine hohe Substratspezifität auf. Alle getesteten in der 2-Position halogen- oder methylsubstituierten 3-Oxo adipate wurden nicht umgesetzt. Auch in der 4-Position substituierte Halogen-3-oxo adipate zeigten keinen Umsatz durch die Transferase.

Da die Positionen 2 und 4 im 3-Oxadipat ein prochirales Kohlenstoffatom aufweisen, könnten die bei der chemischen Darstellung entstehenden substituierten Substrate in einer für die Transferase „falschen“ Konfiguration gebildet werden.

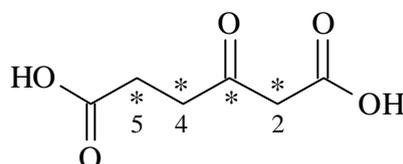


Abb. 42: Prochirale Zentren des 3-Oxadipats

Diese These kann jedoch ausgeschlossen werden, da auch die auf enzymatischem Weg durch die der Transferase vorausgehenden Enzyme (Dienlacton-Hydrolase und Maleylacetat-Reduktase) gebildeten substituierten Substrate nicht umgesetzt wurden, obwohl diese in der „richtigen“, biologisch relevanten enantiomeren Form vorliegen sollten.

Eine sehr geringe Aktivität der Transferase gegenüber 4-Methyl-3-oxoadipat und den strukturverwandten Verbindungen des 3-Oxadipates 2-Oxadipat und 3-Oxoglutarat wurde anhand von Produktbildung gezeigt.

Nicht umgesetzt wurden die dem 3-Oxadipat strukturähnlichen Verbindungen 2-Oxoglutarat, Adipat, 2-Oxocapronat und Acetoacetat. Fazit ist, die Transferase toleriert bei einer Hexandisäure eine Verschiebung der Keto-Gruppe von der Position 3 zur Position 2. Sie toleriert ebenfalls bei vorhandener Ketogruppe in 3-Position eine Verkürzung der Kohlenstoffkette von C6 auf C5. Beides gleichzeitig toleriert die Transferase jedoch nicht (keinen Umsatz von 2-Oxoglutarat).

Das Fehlen einer Ketogruppe, wie durch Tests mit Adipat gezeigt, sowie das Fehlen einer zweiten endständigen Carboxylfunktion, wie durch Tests mit 2-Oxocapronat und Acetoacetat gezeigt, führt dazu, dass die Substanzen keine Substrate der B13-Transferase sind. Durch das Fehlen einer Keto- oder endständigen Carboxylgruppe dürfte die Bindung im Aktiven Zentrum der Transferase geschwächt sein und dieses eine Inaktivität bewirken.

2-Chlor- und 2-Hydroxy-3-oxoadipat sowie 2-Methyl-3-oxoadipat, welche nicht durch die Transferase umgesetzt werden, sind jedoch in der Lage die Transferasereaktion mit 3-Oxoadipat zu hemmen. Eine Gesetzmäßigkeit in der Art der Hemmung (kompetitive oder unkompetitive) ist anhand der gefundenen Daten nicht zu erkennen. Eine gemischt kompetitive Hemmung bewirkt hingegen 2-Oxoadipat, was die Fähigkeit der Transferase, dieses Substrat umzusetzen, bestätigt. Bei der gemischt kompetitiven Hemmung bindet ein Stoff an den Enzym-Substrat-Komplex und auch im aktiven Zentrum. Letzteres ist für die Aktivität eines Enzyms unerlässlich.

4.2. 3-OxoacylCoA-Thiolase

Sowohl Eukaryonten wie auch Prokaryonten sind in der Lage zwei unterscheidbare Thiolase-Arten zu bilden (IGUAL et al. 1992; PEOPLES & SINSKEY 1989; YANG et al. 1990). Diese werden als Thiolase I oder 3-OxoacylCoA-Thiolase (β -Ketothiolase; EC 2.3.1.16) und als Thiolase II oder AcetoacetylCoA-Thiolase (EC 2.3.1.9) bezeichnet.

Thiolase I besitzt ein breit gefächertes Substratspektrum und ist in Abbausequenzen wie der β -Fettsäure-Oxidation integriert. Thiolase II ist spezifisch an die Umsetzung von AcetoacetylCoA gebunden und in verschiedenen Biosynthesen wie z.B. der Steroide-Biosynthese und der Poly- β -hydroxybutyrat-Synthese involviert.

In Bezug auf ihre Funktion innerhalb einer Abbausequenz ist die in dieser Arbeit betrachtete Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 die einzig bislang gereinigte Thiolase, die einen Dicarbonsäure-Thioester umsetzt.

In Abhängigkeit von ihrer Funktion im Metabolismus weisen Thiolasen einen unterschiedlichen Aufbau ihrer Untereinheiten auf.

Thiolasen I sind Bestandteile von Multienzym-Komplexen und zusammengesetzt aus zwei Untereinheiten. Der als α -Untereinheit bezeichnete Teil der Enzyme weist 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase- und 2-EnoylCoA-Hydratase-Aktivität auf, während die β -Untereinheiten die 3-OxoacylCoA-Thiolase-Aktivität beinhalten. Verschiedene Multienzymkomplexe wurden bereits gereinigt und auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Ein dimerer Aufbau wurde für die Thiolase I aus *Candida tropicalis* (je 40 kDa; KURIHARA et al. 1989), die peroxisomale Thiolase I der Ratte (je 40 kDa; MIYAZAWA et al. 1981) und die mitochondriale Thiolase I der Ratte (je 41 kDa; MIYAZAWA et al. 1981) gefunden. Tetramere wurden für die Thiolase I aus Schwein sowie aus *Alcaligenes eutrophus* (je 46 kDa; HAYWOOD et al. 1988, STAAK et al. 1978), *Pseudomonas fragi* (je zwei Untereinheiten von 73 kDa und 42 kDa; IMAMURA et al. 1990) und *Escherichia coli* (je zwei Untereinheiten von 78 kDa und 42 kDa; PAWAR & SCHULZ 1981) nachgewiesen.

Thiolasen II hingegen sind homotetramere Enzyme, deren Untereinheiten in *Escherichia coli* (DUNCOMBE & FRERMAN 1976), *Clostridium acetobutyricum* (WIESENBORN et al. 1988), *Clostridium kluyveri* (SLIWKOWSKI & HATRMANIS 1984), *Zoogloea ramigera* (PARALES & HARWOOD 1992), *Bradyrhizobium japonicum* (SUZUKI et al. 1987) und *Alcaligenes eutrophus* (PEOPLES & SINSKEY 1989) Größen zwischen 38 und 44 kDa aufweisen.

Modifiziert nach LOUISE et al. (1991), die den Reaktionsmechanismus einer Thiolase der Thiolase I-Familie (AcylCoA:AcetylCoA-C-AcylCoA-Transferase EC. 2.3.1.16) beschrieben, zeigt die **Abb. 43** ein mögliches mechanistisches Modell der 3-OxadipylCoA-Thiolase-Reaktion. Die Reaktion wird eingeleitet durch den nucleophilen Angriff einer Cystein-Thiol-Gruppe der Thiolase auf die β -Ketogruppe des 3-Oxadipyl-CoA unter Freisetzung von AcetylCoA. In einer zweiten nucleophilen Substitution durch CoAS^- erfolgt die Freisetzung von SuccinylCoA und die Rückbildung des freien Enzyms.

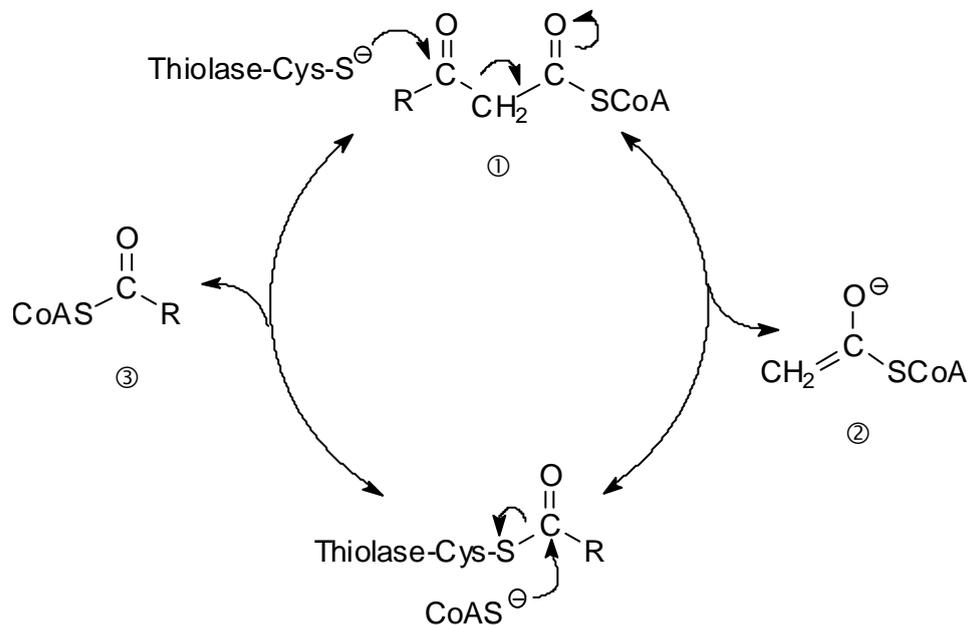


Abb. 43: Mögliches mechanistisches Modell der Thiolase-Reaktion.

① 3-OxadipylCoA, ② AcetylCoA (Enolform), ③ SuccinylCoA, R = CH₂CH₂CO₂H.

Die 3-OxadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 ist ein homotetrameres Enzym des Typs A₄. Die 4 Untereinheiten von je 42 kDa bilden ein Enzym mit der Gesamtgröße von 168 kDa. Entsprechend ihrer Zusammensetzung aus 4 gleichen Untereinheiten sollte die 3-OxadipylCoA-Thiolase zur Thiolase II-Familie zählen.

Diese These wird untermauert durch den Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz der Untereinheit der B13 Thiolase mit den Proteinsequenzen anderer Thiolasen II, die aus vorhandenen Daten von Gensequenzen entsprechender Thiolasen „übersetzt“ wurden. 3-Oxo-adipylCoA-Thiolasen von *Pseudomonas putida* (PcaF) (HARWOOD et al. 1994), *Rhodococcus opacus* (PcaF) (EULBERG et al. 1998) und einer *Streptomyces* sp. 2065 (IWAGAMI et al. 2000), sowie AcetoacetylCoA-Thiolase von *Escherichia coli* (ThrA) (AIBA et al. 1996) und *Schizosaccharomyces pombe* (YOSHIOKA et al. 1997) weisen eine hohe Übereinstimmung mit der 3-Oxo-adipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 (CatF) auf.

```

----SREVYI-DAVRTPIGRFG-----          SubA (B13)
----MRDVFICDAIRTPIGRFGGALAGVRADDLAAVPLKA    PcaF (P. putida)
      * * * * *                76% Ident.

----S-REVYI-DAVRTPIGRFG-----          SubA (B13)
MKGLSMRDVVICEPLRTPVGRFGGVFKDITPQSLAATVIT    PcaF (R. opacus)
      * * * * *                65% Ident.

----SREVYI-DAVRTPIGRFG-----          SubA (B13)
----MNPVYIVDAVRTPIGRYSGGLASVRPDDLAHALRE    PcaF (Streptomyces sp. 2065)
      *** *                71% Ident.

----SREVYI-DAVRTPIGRFG-----          SubA (B13)
----MREAFICDGIRTPIGRYGGALSSVRADDLAAIPLRE    ThrA (E. coli)
      ** * * *                65% Ident.

----SREVYI-DAVRTPIGRFG-----          SubA (B13)
--MVNTEVYIVSAVRTPMGSFSGSFASLPATKLGSIKIG    (S. pombe)
      **** * * *                71% Ident.

```

Abb. 44: Homologie der N-terminalen Aminosäuresequenz der 3-Oxo-adipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 zu Thiolasen anderer Mikroorganismen.

Die in dieser Arbeit bestimmte N-terminale Aminosäuresequenz der B13-Thiolase-Untereinheit entspricht der durch GÖBEL et al. (2002) bestimmten DNA-Sequenzen (*catF*).

Hemmung

Komplexbildner wie EDTA oder *o*-Phenanthrolin sowie Cyanid (in Form von NaCN) bewirken bei einer Konzentration von 1 mM keinen signifikanten Aktivitätsverlust der Thiolase-Reaktion. Demnach ist diese unabhängig von der Anwesenheit zweiwertiger Metallionen, wie beispielsweise Fe²⁺. Die Anwesenheit zweiwertiger Schwermetallionen

hingegen hat starken Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Eine Konzentration von 1 mM Cu^{2+} führt zu einem Rückgang der Thiolase-Aktivität um 90%. Auch Zn^{2+} in gleicher Konzentration bewirkt einen Aktivitätsverlust von 54%. Cu^{2+} und Zn^{2+} weisen eine hohe Affinität zu RS^- auf und blockieren daher möglicherweise Cystein-ThioI-Gruppen im aktiven Zentrum der Thiolase. Eine Aussage, die das oben gezeigte mechanistische Modell der Thiolase-Reaktion (**Abb. 43**) stützen würde.

4.2.1. Substratspezifität der 3-OxoadipylCoA-Thiolase

Die Substratspezifität der Thiolase aus B13 konnte in Bezug auf potentielle Substrate nicht eingehender untersucht werden, da die in Frage kommenden CoA-Ester, wie 2-Chlor-3-oxoadipylCoA oder andere 2-Halogen-3-oxoadipylCoA-Ester weder kommerziell erhältlich waren, noch eine enzymatische Darstellung erfolgreich war (keine Transferease-Aktivität). Auch die chemische Darstellung war in Ermangelung an entsprechenden Edukten und der zu erwartenden Instabilität der Produkte nicht angezeigt.

Als Produkt einer nachgewiesene Aktivität der Transferase in einer gekoppelten Reaktion mit Transferase und Thiolase gegenüber 4-Methyl-3-oxoadipat sollte als Zwischenprodukt 4-Methyl-3-oxoadipylCoA entstanden sein. Das als Endprodukt durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nachgewiesene AcetylCoA stellt hierbei einen Indikator für eine Thiolase-Aktivität gegenüber 4-Methyl-3-oxoadipylCoA dar.

4.3 Fazit und Ausblicke

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Enzyme 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase und 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 gereinigt und bezüglich ihrer enzymkinetischen Eigenschaften charakterisiert. Die Genetik beider Enzyme wurde parallel zu dieser Arbeit durch Herrn M. Goebel untersucht [GOEBEL et al. 2002].

Untersuchungen zum Substratspektrum der Transferase belegten, dass diese keine Aktivität gegenüber 2-Chlor- und 4-Chlor-3-oxoadipate besitzt. Zukünftige Untersuchungen zur Abbaufähigkeit substituierter Chloraromaten könnten daher darauf zielen, ob andere Enzyme aus *Pseudomonas* sp. B13 in der Lage sind, diese Substrate abzubauen bzw. in Substrate des *ortho*-Weges umzuwandeln. In Frage kommt hierfür insbesondere ein bislang wenig untersuchtes ATP und CoA-abhängiges 3-Oxoadipat umsetzendes Enzym, dessen Aktivität im Rohextrakt gegenüber 3-Oxoadipat nachgewiesen wurde [siehe 3.3].

Der Organismus *Ralstonia* sp. Stamm PS 12 ist in der Lage u.a. 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol als Wachstumssubstrat zu nutzen. Wird hierbei der modifizierte *ortho*-Weg als Grundlage des Substratabbaus vorausgesetzt, wäre 2-Chlor-3-oxoadipat ein Zwischenprodukt (SANDER et al. 1991). Eine Aktivität von PS12-Rohextrakt mit diesem Metaboliten konnte aber auch hier, wie bei der B13-Transferase, nicht nachgewiesen werden. Interessant wäre für zukünftige Arbeiten die Untersuchung des Abbauweges von 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol durch PS12 und in Folge ein Vergleich der Enzyme aus PS12 und aus *Pseudomonas* sp. B13.

5. Zusammenfassung

1. Eine Methode zum Nachweis verschiedener CoA-Ester durch HPLC wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Neben den „klassischen“ UV-VIS-Chromatographischen Enzymaktivitäts-Messungen steht somit eine alternative Methode zur Aktivitätsmessung der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase und der 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13, zwei Enzyme des mikrobiellen Aromatenabbaus, zur Verfügung.
2. Die 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase und die 3-OxoadipylCoA-Thiolase aus *Pseudomonas* sp. B13 wurden gereinigt. Dies erfolgte bei der Transferase durch Hitzefällung und FPLC über Phenyl-Sepharose, Mono-Q[®] und Superose[®] 6-Gele. Die Thiolase-Reinigung erfolgte durch FPLC über DEAE-Sepharose, Blue 3G-A und Reactive-Brown.
3. Die native Molekularmasse der 3-Oxoadipat:SuccinylCoA-Transferase aus *Pseudomonas* sp. B13 beträgt 115 ± 5 kDa. Die Bestimmung erfolgte über eine Superose[®] 12-Gel-Säule. Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die zwei Enzymuntereinheiten A und B mit Größen von 32,9 und 27,0 kDa nachgewiesen. Diesen Daten entsprechend handelt es sich bei der B13-Transferase um ein heterotetrameres Enzym des Typs A₂B₂ mit einer Molekularmasse von 119,8 kDa.
4. Die N-terminale Aminosäuresequenz der Enzymuntereinheiten der B13-Transferase wurden wie folgt bestimmt:

Untereinheit A: **AELLTLREAVRFVNDGTVALEGFTHLIPT**

Untereinheit B: **SAYSTNEMMTVAAARRLKNQAVVFV**

Ein Vergleich dieser Sequenzen mit Transferasen aus anderen Aromaten-abbauenden Organismen belegt eine geringe Identität von 16-32 %. Eine etwas höhere Übereinstimmung der Sequenzen, im Bereich von 33-44 % Identität, besteht zu einer GlutaconatCoA-Transferase des anaeroben Organismus *Acidaminococcus fermentans*.

5. Die Bestimmung enzymkinetischer Daten der B13-Transferase erfolgte unter Abstraktion des Transferase-Substrat-Cosubstrat-Komplexes als Michaelis-Menten-Komplex, indem die Konzentration des jeweiligen Cosubstrates als feststehende Größe angesehen wurden. Die K_M - und V_{max} -Werte der Transferase betragen 0,4 mM bzw. 10,3 U/mg_{Protein} für 3-Oxoadipat und 0,2 mM bzw. 24,2 U/mg_{Protein} für Succinyl-CoA. Die katalytische Konstante beträgt 1430 min⁻¹. Der optimale pH-Wert der Transferase-Reaktion liegt bei pH 8,4. Die Enzymreaktion ist reversibel.
6. Die B13-Transferase setzt keine in 2- und 4-Position halogenierten 3-Oxoadipate um. Auch 2-Methyl-3-oxoadipat ist kein Substrat der Transferase. Eine sehr geringe Transferase-Aktivität konnte gegenüber 4-Methyl-3-oxoadipat, sowie für 2-Oxoadipat und 3-Oxoglutarat gezeigt werden.
7. Die native Molekularmasse der 3-OxoadipylCoA-Thiolase wurde über eine Superose[®] 6-Gel-Säule auf 162 ± 13 kDa bestimmt. Durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde eine Größe von 42 kDa für die Enzymuntereinheit der B13-Thiolase ermittelt. Entsprechend der gefundenen Daten ist die B13-Thiolase ein homotetrameres Enzym des Typs A₄ mit einer Molekularmasse von 168 kDa.
8. Die N-terminale Aminosäuresequenz der Enzymuntereinheit der B13-Thiolase wurde wie folgt bestimmt:
Untereinheit: **SREVYI?DAVRTPIGRFG** (? = unbestimmte Aminosäure)
Ein Sequenzvergleich zu Thiolasen anderer Organismen mit ganz unterschiedlichem Substratspektrum zeigt einen hohen Grad an Übereinstimmung im Bereich von 65-76% Identität.
9. Die Bestimmung enzymkinetischer Daten der B13-Thiolase erfolgte unter Abstraktion des Thiolase-Substrat-Cosubstrat-Komplexes als Michaelis-Menten-Komplex, indem die Konzentration des jeweiligen Cosubstrates als feststehende Größe angesehen wurden. Die K_M - und V_{max} -Werte der Thiolase betragen 0,15 mM bzw. 1,5 U/mg_{Protein} für 3-OxoadipylCoA und 0,01 mM bzw. 0,9 U/mg_{Protein} für CoA. Die katalytische Konstante beträgt 470 min⁻¹. Das pH-Optimum der Thiolase-Reaktion liegt bei pH 7,8.

6. Literatur

AIBA, H., BABA, T., HAYASHI, K., INADA, T., ISONO, K., ITHO, T., KASAI, H., KASHIMOTO, K., KIMURA, S., KITAKAWA, M., KITAGAWA, M., KAKINO, K., MIKI, T., MIZIBUCHI, K., MIRI, H., MORI, T., MOTOMURA, K., NAKADE, S., NAKAMURA, Y., NASHIMOTO, H., NISHIO, Y., OSHIMA, T., SAITO, N., SAMPEI, G., SEKI, T. Y., SIVASUNDRAMA, S., TAGAMI, H., TAKEDA, J., TAKEMOTO, K., TAKEUCHI, Y., WADA, W., YAMAMOTO, Y., HORIUCHI, T.: A 570 kb DNA sequence of *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 28.0 to 40.1 min region on the linkage map. *DNA Res.* **3**, 363-377 (1996)

ALLRED, J.B.: Interference of thiols in acetoacetate determination. *Anal. Biochem.* **11**, 138-143 (1965)

BAETZ, A. L., ALLISON, M. J.: Purification and characterization of formylcoenzyme A transferase from *Oxalobacter formigenes*. *J. Bacteriol.* **172**, 3537-3540 (1990)

BARKER, H. A., JENG, I. M., NEFF, N., ROBERTSON, J. M., TAM, F. K., HOSAKA, S.: Butyryl-CoA:acetoacetate CoA-transferase from a lysine-fermenting *Clostridium*. *J. Biol. Chem.* **253**, 1219-1225 (1978)

BAYLY, R. C., BARBOUR, M. G.: The degradation of aromatic compounds by the *meta* and gentisate pathways. In: D. T. GIBSON (ed.). Microbial degradation of organic compounds. Marcel Dekker. Inc., New York, 253-294 (1984)

BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976)

BUCKEL, W., DORN, U., SEMMLER, R.: Glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*. *Eur. J. Biochem.* **118**, 315-321 (1981)

CHAPMAN, P.J., RIBBONS, D.W.: Metabolism of resorcinolic compounds by bacteria: Alternative pathway for resorcinol metabolism in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **125**, 985-998 (1976)

DMOCHWITZ, S, BALLSCHMITER, K.: Microbial transformation of technical mixtures of polychlorinated biphenyls (PCB) by the fungus *Aspergillus niger*. *Chemosphere* **17**, 111-121 (1988)

DORN, E., HELLWIG, M., REINEKE, W., KNACKMUSS, H.-J.: Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad. *Arch. Microbiol.* **99**, 61-70 (1974)

DORN, E., KNACKMUSS, HJ.: Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown pseudomonad. *Biochem. J.* **174**, 73-84 (1978a)

DORN, E., KNACKMUSS, HJ.: Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol. *Biochem. J.* **174**, 85-94 (1978b)

DUNCOMBE, G. R., FRERMAN, F. E.: Molecular and catalytic properties of the acetoacetyl-coenzyme A thiolase of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **176**, 159-170 (1976)

ELVIDGE, J. A., LINSTED, R. P., OEKIN, B. A., SIMS, P., BEAR, H., PATTISON, D. B.: Unsaturated lactones and related substances. Part IV. Lactonic products derived from muconic acid. *J. Chem. Soc.* 2228-2235 (1950)

ENGLID, K. C.: Chlorine-containing natural compounds in higher plants. *Phytochemistry* **25**, 781 (1986)

EULBERG, D., LAKNER, S., GOLOVLEVA, L. A., SCHLÖMANN, M.: Characterization of a protocatechuate catabolic gene cluster from *Rhodococcus opacus* 1CP: evidence for a

merged enzyme with 4-carboxymuconolactone-decarboxylating and 3-oxoadipate enol-lactone-hydrolyzing activity. *J. Bacteriol.* **180**, 1072-1081 (1998)

EU.L.E.: Europäisches Institut für Lebensmittel- und Ernährungswissenschaften e.V., München (2002): <http://www.das-eule.de/4297.html>

FRANTZ, B., NGAI, K.-L., CHATTERJEE, D. K., ORNSTON, L. N., CHAKRABARTY, A. M.: Nucleotide sequence and expression of *clcD*, a plasmid-borne dienelactone hydrolase gene from *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* **169**, 704-709 (1987)

FREIER, R.K.: Wasseranalyse (2.Auflage) S. 45-46, Walter de Gruyter, Berlin

GAAL, A.B., NEUJHR, H.Y.: Metabolism of phenol and resorcinol in *Trichosporon cutaneum*. *J. Bacteriol.* **137**, 13-21 (1979)

GEORGE, H. A., SMIBERT, R. M.: Fumarate reduction and product formation by Reiter strain of *Treponema phagedensis*. *J. Bacteriol.* **152**, 1049-1059 (1982)

GÖBEL, M., KASSEL-CATI, K., SCHMIDT, E., REINEKE, W.: Degradation of aromatics and chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. strain B13: cloning, characterization, and analysis of sequences encoding 3-oxoadipate:succinyl-coenzyme A (CoA) transferase and 3-oxoadipyl-CoA thiolase. *J. Bacteriol.* **184** (1), 216-223 (2002)

HARAYAMA, S., LEHRBACH, P. R., TIMMIS, K. N.: Transposon mutagenesis analysis of *meta*-cleavage operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Bacteriol.* **160**, 251-255 (1984)

HARTMANN, J., REINEKE, W., KNACKMUSS, H.-J.: Metabolism of 3-chloro, 4-chloro, and 3,5-dichlorobenzoate by pseudomonad. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 421-428 (1979)

- HARTNETT, C., NEIDLE, E. L., NGAI, K. L., ORNSTON, L. N.: DNA sequences of genes encoding *Acinetobacter calcoaceticus* protocatechuate 3,4-dioxygenase: evidence indicating shuffling of genes and DNA sequences within genes during their evolutionary divergence. *J. Bacteriol.* **172**, 956-966 (1990)
- HARWOOD, C. S., NICHOLS, N. N., KIM, M. K., DITTY, J. L., PARALES, R. E.: Identification of the *pcaRKF* gene cluster from *Pseudomonas putida*: involvement in chemotaxis, biodegradation, and transport of 4-hydroxybenzoate. *J. Bacteriol.* **176**, 6479-6488 (1994)
- HAYAISHI, O., KATAGIRI, M., ROTHENBERG, S.: Studies on oxygenases: pyrocatechase. *J. Biol. Chem.* **229**, 905-920 (1957)
- HAYAISHI, O.: Direct oxygenation by O₂, oxygenases. In: BOYDER, P. D., LARDY, H. and MYRBÄCK, K. (eds.), *The Enzymes*, 2nd ed., Vol. **8**, 353-371, Academic Press, New York (1963)
- HAYWOOD, G. H., ANDERSON, A. J., CHU, L., DAWES, E. A.: Characterization of two 3-ketothiolases in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**, 91-96 (1988)
- HIGA, T., SAKEMI, S.-I.: Environmental studies on natural halogen compounds. I. Estimation of biomass of the acorn worm *Ptychodera flava* Eschscholtz (Hemichordata: Enteropneusta) and excretion rates of metabolites at Kattore Bay, Kohama Island, Okinawa, Japan. *J. Chem. Ecol.* **9**, 495-502 (1983)
- IGUAL, J. C., GONZALES-BOSCH, C., DOPAZO, J., PEREZ-ORTIN, J. E.: Phylogenetic analysis of thiolase family. Implications for the evolutionary origin of peroxisomes. *J. Mol. Evol.* **35**, 147-155 (1992)
- IMAMURA, S., UEDA, S., MIZUGAKI, M., KAWAGUCHI, A.: Purification of multienzyme complex for fatty acid oxidation from *Pseudomonas fragi* and reconstitution of the fatty acid oxidation system. *J. Biochem.* **107**, 184-189 (1990)

IWAGAMI, S., YANG, K., DAVIES, J. E.: Characterization of the protocatechuic acid catabolic gene cluster from *Streptomyces* sp. strain 2065. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1499-1508 (2000)

JACOB, U., MACK, M., CLAUSEN, T., HUBER, R., BUCKEL, W., MESSERSCHIMDT, A.: Glutaconat CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*: the crystal structure reveals homology with other CoA-transferases. *Structure* **5**, 415-426 (1996)

JENCKS, W.P.: Coenzym A transferases. In: BOYDER, P.D. (ed.) *The Enzymes*, 3rd ed., Vol. **9**, 483-496, Academic Press, New York (1973).

KASBERG, T, DAUBARAS, D. L., CHAKRABARTY, A. M., KINZELT, D., REINEKE, W.: Evidence that operons *tcb*, *tfd*, and *clc* encode maleylacetate reductase, the fourth enzyme of the modified *ortho* pathway. *J. Bacteriol.* **177**, 3885-3889 (1995)

KASCHABEK, S. R., REINEKE, W.: Maleylacetate reductase of *Pseudomonas* sp. strain B13: dechlorination of chloromaleylacetates, metabolites in the degradation of chloroaromatic compounds. *Arch. Microbiol.* **158**, 412-417 (1992)

KASCHABEK, S. R., REINEKE, W.: Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of maleylacetate reductase from *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* **175**, 6075-6081 (1993)

KASCHABEK, S. R., REINEKE, W.: Maleylacetate reductase of *Pseudomonas* sp. strain B13: specificity of substrate conversion and halide elimination. *J. Bacteriol.* **177**:320-325 (1995)

KASCHABEK, S. R.: Chemische Synthese von Metaboliten des mikrobiellen Chloraromatenabbaus und Untersuchung der Spezifität der Maleylacetat-Reduktase aus *Pseudomonas* sp. B13. Dissertation., Bergische Universität – Gesamthochschule Wuppertal (1995)

KATAGIRI, M., HAYAISHI, O.: Enzymatic degradation of β -keto adipic acid. *J. Biol. Chem.* **226**, 439-448 (1957)

KOJIMA, Y., ITADA, N., HAYAISHI, O.: Metapyrocatechase: a new catechol-cleaving enzyme. *J. Biol. Chem.* **236**, 2223-2228 (1961)

KUHM, A. E., SCHLÖMANN, M., KNACKMUSS, H.J., PIEPER, D. H.: Purification and characterization of dichloromuconate cycloisomerase from *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Biochem. J.* **266**, 877-883 (1990)

KUHN, B.: Untersuchungen zur Spezifität des modifizierten *ortho*-Abbauweges: Dienlacton-Hydrolase. Diplomarbeit, Bergische Universität – Gesamthochschule Wuppertal (1998)

KURIHARA, T., UEDA, M., TANAKA, A.: Peroxisomal acetoacetyl-CoA thiolase and 3-ketoacetyl-CoA thiolase from *n*-alkane-utilizing yeast *Candida tropicalis*: purification and characterization. *J. Biochem.* **106**, 474-478 (1989)

KYHSER-ANDERSEN, J.: Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209 (1984)

LÜÖND, R. M., WALKER, J., NEIER, R. W.: Assessment of the active-site requirements of 5-aminolaevulinic acid dehydratase: evaluation of substrate and product analogues as competitive inhibitors. *J. Org. Chem.* **57**, 5005-5013 (1992)

MACK, M., BENDRAT, K., ZELDER, O., ECKEL, E., LINDER, D., BUCKEL, W.: Location of the two genes encoding glutaconate coenzyme A transferase at the beginning of the hydroxyglutarate operon in *Acidaminococcus fermentans*. *Eur. J. Biochem.* **226**, 41-51 (1994)

MILLER, J. H.: Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. New York 1972

MIYAZAWA, S., FURUTA, S., OSUMI, T., HASHIMOTO, T., UI, N.: Properties of peroxisomal 3-ketoacetyl-CoA thiolase from rat liver. *J. Biochem.* **90**, 511-519 (1981)

MONTFORTS, F.-P., SCHWARTZ, U. M., MAIB, P., MAI, G.: Darstellung 2-methoxy-substituierter Pyrrole durch intramolekulare Aza-Wittig-Reaktionen. *Liebigs Ann. Chem.* 1037-1043 (1990)

MORRIS, H. R., TAYLOR, G. W., MASENTO, M. S., JERMYU, K. A., KAY, R. R.: Chemical structure of the morphogen differentiation inducing factor from *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **328**, 811-814 (1987)

MÜLLER, D., SCHLÖMANN, M., REINEKE, W.: Maleylacetate reductases in chloroaromatic-degrading bacteria using the modified *ortho* pathway: comparison of catalytic properties. *J. Bacteriol.* **178**, 298-300 (1996)

NAUMANN, K.: Chlorchemie der Natur. *Chemie in unserer Zeit*, 27. Jahrgang (Nr. 1), 33-41 (1993)

NEIDLEMAN, S. L., GEIGER, J.: Biohalogenations. Ellis Horwood, Chichester (1986)

NOZAKI, M., KAGAMIYAMA, H., HAYAISHI, O.: Metapyrocatechase. I. Purification, crystallization and some properties. *Biochem. Z.* **338**, 582-590 (1963)

OKA, H., ASHAI, K., MORISHIMA, H., SANADA, M., SHIRATORI, K., IMAMURA, Y., SAKURAI, T., UZAWA, J., IWADARE, S., TAKAHASHI, N.: Differanisole A, a new differentiation inducing substance. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **38**:1100-1102 (1985)

ORNSTON, L.N.: The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. II. Enzymes of the protocatechuate pathway. *J. Biol. Chem.* **241**, 3787-3794 (1966)

ORNSTON, L.N.: The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. III. Enzymes of the protocatechuate pathway. *J. Biol. Chem.* **241**, 3795-3799 (1966)

-
- ORNSTON, L. N.: Conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate (*Pseudomonas putida*). *Methods Enzymol.* **17A**, 529-549 (1970)
- PAASIVIRTA, J., KNUUTINEN, P., MAATELA, R., PAUKUU, J., SOIKKELI, J., SÄRKKA, J.: Organic chlorine compounds in lake sediments and the role of the chlorobleaching effluents. *Chemosphere* **17**, 137-146 (1988)
- PARALES, R. E., HARWOOD, C. S.: Characterization of genes encoding β -keto adipate:succinyl-coenzyme A transferase in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **174**, 4657-4666 (1992)
- PAWAR, S., SCHULZ, H.: The structure of the multienzyme complex of fatty acid oxidation from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **256**, 3894-3899 (1981)
- PEOPLES, O. P., SINSKEY, A. J.: Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* **264**, 15293-15297 (1989)
- PETERSEN, D. J., CARY, J. W., VANDERLEYDEN, J., BENNETT, G. N.: Sequence and arrangement of genes encoding enzymes of the acetone-production pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *Gene* **123**, 93-97 (1993)
- PFENNIG, N., LIPPERT, K.D.: Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Mikrobiol.* **55**, 245-256 (1966)
- POWLOWSKI, J. B., DAGLEY, S.: β -Keto adipate pathway in *Trichosporon cutaneum* modified for the methyl-substituted metabolites. *J. Bacteriol.* **163**, 1126-1135 (1985)
- REINEKE, W.: Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of microorganisms. *The Handbook of Environmental Chemistry* Vol. **2**, Part K, 1-161, B. BEEK (ed.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg (2001)

ROCHET, J. C., BRIDGER, W. A.: Identification of glutamate 344 as the catalytic residue in the active site of pig heart CoA transferase. *Protein Sci.* **3**, 975-981 (1994)

SALA-TREPAT, J. M., EVANS, W. C.: The *meta* cleavage of catechol by *Azotobacter* species: 4-oxocrotonate pathway. *Eur. J. Biochem.* **20**, 400-413 (1971)

SANDER, P., WITTICH, R.-M., FORTNAGEL, P., WILKES, H., FRANCKE, W.: Degradation of 1,2,4-trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1430-1440 (1991)

SCHERF, U., BUCKEL, W.: Purification and properties of 4-hydroxybutyrate coenzyme A transferase from *Clostridium aminobutyricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2699-2702 (1991)

SCHLÖMANN, M., SCHMIDT, E., KNACKMUSS, H.-J.: Different types of dienelactone hydrolase in 4-fluorobenzoate-utilizing bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 5112-5118 (1990)

SCHMIDT, E., KNACKMUSS, H.-J.: Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid. *Biochem. J.* **192**, 339-347 (1980)

SCHMIDT, E., REMBERG, G., KNACKMUSS, H.-J.: Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Halogenated muconic acids as intermediates. *Biochem. J.* **192**, 331-337 (1980)

SCHWIEN, U., SCHMIDT, E., KNACKMUSS, H.-J., REINEKE, W.: Degradation of chlorosubstituted aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. strain B13: fate of 3,5-dichlorocatechol. *Arch. Microbiol.* **150**, 78-84 (1988)

SEGATE-DIOURY, F., LINGIBE, O., GRAFFE, B., SACQUET, M.-C., LHOMMET, G.: A general synthesis of enantiopure 1,2-aminoalcohols via chiral morpholinones. *Tetrahedron* **56**, 233-248 (2000)

SHINGLER, V., POWLOWSKI, J., MARKLUND, U.: Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **174**, 711-724 (1992)

SIMON, E. J., SHEMIN, D.: The preparation of S-succinyl coenzyme A. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 2520 (1953)

SISTROM, W. R., STANIER, R. A.: The mechanism of formation of β -ketoacid by bacteria. *J. Biol. Chem.* **210**, 821-836 (1954)

SLIWKOWSKI, M. X., HATMANIS, M. G. N.: Simultaneous single-step purification of thiolase and NADP-dependent 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Anal. Biochem.* **141**, 344-347 (1984)

STAAK, H., BINSTOCK, J. F., SCHULZ, H.: Purification and properties of a pig heart thiolase with broad chain length specificity and comparison of thiolase from pig heart and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **253**, 1827-1831 (1978)

SUZUKI, F., ZAHLER, W. I., EMERICH, D. W.: Acetoacetyl-CoA thiolase of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **254**, 272-281 (1987)

TUNG, K. K., WOOD, W. A.: Purification, new assay, and properties of coenzyme A transferase from *Peptostreptococcus elsdenii*. *J. Bacteriol.* **124**, 1462-1474 (1975)

UMWELTBUNDESAMT (2001):

<http://www.umweltbundesamt.de/uba-info-daten/daten/polyvinylchlorid.htm>

VAN DER MEER, J. R., RAVATN, R., SENTCHILO, V.: The *clc* element of *Pseudomonas* sp. B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrase. *Arch. Microbiol.* **175**, 79-85 (2001)

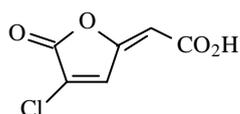
- VANDERWINKEL, E., FURMANSKI, P., REEVES, H. C., AJL, S. J.: Growth of *Escherichia coli* on fatty acids: requirement for coenzyme A transferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**, 902-908 (1968)
- VOLLMER, M. D., SCHLÖMANN, M.: Conversion of 2-chloro-*cis,cis*-muconate and its metabolites 2-chloro- and 5-chloromuconolactone by chloromuconate cycloisomerases of pJP4 and pAC27. *J. Bacteriol.* **177**, 2938-2941 (1995)
- VOLLMER, M. D., STADLER-FRITZSCHE, K., SCHLÖMANN, M.: Conversion of 2-chloromaleylacetate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Arch. Microbiol.* **159**, 182-188 (1993)
- WATANABE, K., MYAKADO, M., OHNO, N., OKEADA, A., YANAGI, K., MORIGUCHI, K.: A polyhalogenated insecticidal monoterpene from the red alga *Plocamium telfairia*. *Phytochemistry* **28**, 77-78 (1989)
- WIESBORN, D. P., RUDOLPH, F. B., PAPOUTSAKIS, E. T.: Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the synthesis of acids and solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2717-2722 (1988)
- YANG, S. Y., YANG, X. Y., HEALY-LOUIE, G., SCHULZ, H., ELZINGA, M.: Nucleotide sequence of the *fadA* gene. Primary structure of 3-ketoacyl-coenzyme A thiolase from *Escherichia coli* and the structural organization of the *fadAB* operon. *J. Biol. Chem.* **265**, 10424-10429 (1990). (Erratum: **266**, 16255 (1991))
- YEH, W. K., ORNSTON, L. N.: Evolutionary homologous $\alpha_2\beta_2$ oligomeric structures in β -ketoacid succinylCoA transferases from *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* **256**, 1565-1569 (1981)
- YOSHIOKA, S., KATO, K., NAKAI, K., OKAYAMA, H., NOJIMA, H.: Identification of open reading frames in *Schizosaccharomyces pombe* cDNAs. *DNA Res.* **4**, 363-369 (1997)
- ZETSCH, C.: Photochemischer Abbau in Aerosolphasen. *Umwelt Chem. Ökotox.* (Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung) **3**, 59-64 (1991)

7. Anhang

Zur verwendeten Nomenklatur von Enlactonen und Dienlactonen

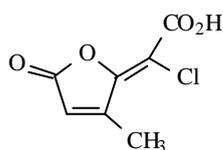
Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen „Enlacton“ und „Dienlacton“ für Verbindungen des *ortho*- bzw. des modifizierten *ortho*-Weges von Aromaten und Chloraromaten entsprechen nicht der IUPAC-Nomenklatur. Die Trivialnamen „Enlacton“ und „Dienlacton“ finden jedoch breite Verwendung und Akzeptanz in der Fachliteratur und werden der Einfachheit halber daher auch in dieser Arbeit verwendet.

Die folgende **Abb. 45** definiert die verwendete Trivialnomenklatur und zeigt die jeweilige IUPAC-Nomenklatur.



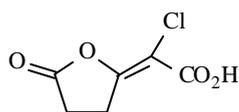
2-Chlor-cis-dienlacton

IUPAC: (2E)-4-Chlor-5-oxofuran-2(5H)-ylidenessigsäure



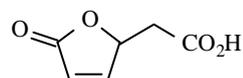
5-Chlor-3-methyl-trans-dienlacton

IUPAC: (2E)-Chlor-3-methyl-5-oxofuran-2(5H)-ylidenessigsäure



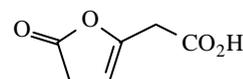
5-Chlor-cis-enlacton

IUPAC: (2Z)-Chlor-5-oxodihydrofuran-2(3H)-ylidenessigsäure



Muconolacton

IUPAC: 5-Oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl-essigsäure



3-Oxadipatenollacton

IUPAC: 5-Oxo-4,5-dihydrofuran-2-yl-essigsäure

Abb. 45: Trivial- und IUPAC-Nomenklatur anhand des Beispiels einiger Enlactone und Dienlactone.

Abkürzungen

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
$A_{\text{spez.}}$	Spezifische Aktivität
ATP	Adenosintriphosphat
CoA	Coenzym A
DEAE	Diethylaminoethyl
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EC	Enzyme Commission
EE	Extinktionseinheiten
ϵ_M	Molarer Extinktionskoeffizient
eV	Elektronenvolt
FPLC	fast protein liquid chromatography
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HPLC	high-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
$k_{\text{cat.}}$	Katalytische Konstante
kDa	Kilo-Dalton
K_M	Michaelis-Konstante
kt	Kilo-Tonnen = 10^3 Tonnen
L	Liter
M	Stoffmengenkonzentration: Molar (= 1 mol/L)
mA	Milli-Ampere (Stromstärke)
mg	Milli-Gramm
MHz	Mega-Hertz
min	Minute
MPa	Mega-Pascal
M_r	Relatives Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie

Mt	Mega-Tonnen = 10^6 Tonnen
N	Normal (Reaktionsäquivalente/L)
NAD(P) ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid-phosphat (oxydiert)
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
nm	Nano-Meter ($1\text{nm} = 10^{-9}$ m)
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PVC	Polyvinylchlorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R _f	Ratio of fronts (Bei der Elektrophorese: Laufstrecke des Proteins dividiert durch die Laufstrecke des Markierungsfarbstoffes)
R _t	Retentionszeit
R _{t,rel.}	Relative Retentionszeit
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp.	Spezies
TCC	Tricarbonsäure-Cyclus = Zitronensäure-Cyclus
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylethylendiamin
TMS	Tetramethylsilan
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	Internationale Enzymeinheit [Definition siehe Seite 18]
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt (Spannung)
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit bei Substratsättigung
v/v	Volumenkonzentration (veraltet: Volumenprozent)
w/w	Massenanteil (veraltet: Massenprozent)