

**Chemie und Biochemie des *meta*-Weges:
Synthese der Intermediate des 4-Chlorcatechol-Abbaus
und Analyse ihres Metabolismus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften,
angefertigt im Fachbereich C, Fachgruppe Chemie
der Bergischen Universität Wuppertal

vorgelegt von
Frank Reifenrath

Dezember 2004

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20040590

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20040590>]

Die vorliegende Dissertation entstand zwischen September 1999 und Dezember 2004 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Reineke am Institut für Chemische Mikrobiologie des Fachbereiches C, Fachgruppe Chemie der Bergischen Universität Wuppertal.

Die experimentellen Arbeiten wurden durch Mittel der Europäischen Union (Projekte MAROC und Rational Design) gefördert.

Herrn Professor Dr. Walter Reineke danke ich für den mir gewährten Freiraum bei der Gestaltung des Themas, sowie für sein Interesse an dem Fortgang der Arbeit und der hilfreichen Unterstützung bei deren Durchführung.

Herrn Dr. E. Schmidt danke ich für die Übernahme des Koreferats, die gute Zusammenarbeit und freundliche Unterstützung.

Frau Ilka Polanz danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Frau Dipl. Ing. Eva Smets danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Mein Dank gilt ferner allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Arbeitskreises Chemische Mikrobiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Catechol als zentrales Strukturelement des aeroben mikrobiellen Aromatenabbaus	2
1.2 Die Metabolisierung von Catechol: <i>ortho</i> - oder <i>meta</i> -Weg	4
1.3 Abbau von Catechol über den <i>meta</i> -Weg	5
1.4 Der <i>meta</i> -Weg in <i>Pseudomonas putida</i> GJ31	7
1.5 Der <i>meta</i> -Weg in <i>Pseudomonas putida</i> PaW1	12
1.6 Der <i>meta</i> -Weg in <i>Pseudomonas putida</i> WR311	13
1.7 Zielsetzung der Arbeit	15
2. Materialien und Methoden	17
2.1 Verwendete Organismen	17
2.2 Medien	17
2.2.1 Medien für <i>Escherichia coli</i>	18
2.2.2 Medien für <i>Pseudomonas putida</i>	18
2.3 Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien	19
2.3.1 Anzucht und Lagerung von <i>Escherichia coli</i>	19
2.3.2 Anzucht und Lagerung von <i>Pseudomonas putida</i>	19
2.4 Trübungsmessung	20
2.5 Zellernte und Herstellung von zellfreien Proteinextrakten	20
2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration	21
2.7 Bestimmungen von Enzymaktivitäten	21
2.7.1 Catechol-2,3-Dioxygenase, C23O (<i>meta</i> -Pyrocatechase)	23
2.7.2 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, HMSD	23
2.7.3 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, HMSH	23
2.7.4 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, OT	24
2.7.5 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, OD	25
2.7.6 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase, OEH	25
2.7.7 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase, HOA	26
2.7.8 Acetaldehyd-Dehydrogenase, ADA	27
2.8 Bestimmung der maximalen Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten	27
2.9 Ionenaustauschchromatographie	29
2.10 Cellulose-Säulenchromatographie	29
2.11 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	30
2.12 Festphasenextraktion	30
2.13 NMR-Spektroskopie	31
2.14 Massenspektrometrie	31

2.15	Elementaranalyse	31
2.16	pH-Bestimmung	31
2.17	Schmelzpunktbestimmung	32
2.18	Chemikalien und Enzyme	32
3.	Experimente und Ergebnisse	33
3.1	Chemische Synthesen der Metabolite des Catechol- und 4-Chlorcatecholabbaus bzw. deren Derivate	34
3.1.1	Synthese von 2-Hydroxymuconsäure.....	34
3.1.1.1	2-Methoxymuconsäuredimethylester	35
3.1.1.2	2-Methoxymuconsäure	36
3.1.1.3	2-Hydroxymuconsäure	36
3.1.1.4	Alternative Darstellung der 2-Hydroxymuconsäure	37
3.1.2	Darstellung einer 2-Oxo-3-hexendisäure-/4-Oxalocrotonat-Lösung	38
3.1.3	Darstellung einer Vinylpyruvat-Lösung.....	38
3.1.4	Synthese von (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat.....	40
3.1.4.1	3-Acetyl-5-methyldihydro-2-furanon.....	42
3.1.4.2	5-Methyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon	43
3.1.4.3	2-Amino-4-hydroxypentansäure	44
3.1.4.4	3-Amino-5-methyldihydro-2-furanonhydrochlorid.....	46
3.1.4.5	(S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat	47
3.1.5	Synthese von 4-Chlorpicolinsäure	48
3.1.6	Synthese von 5-Chlorpicolinsäure	49
3.1.6.1	2-Brom-5-chlorpyridin	50
3.1.6.2	5-Chlorpicolinsäure.....	50
3.1.7	Versuche zur Synthese von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure.....	51
3.1.7.1	Methansulfonsäure-2,3-dimethoxyphenylester	53
3.1.7.2	Methansulfonsäure-2,3-dihydroxyphenylester	54
3.1.7.3	Methansulfonsäure-4-chlor-2,3-dihydroxyphenylester	54
3.1.8	Synthese von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Chlorvinylpyruvat.....	55
3.1.8.1	<i>cis</i> - und <i>trans</i> -3-Chlorallylacetamidomalonsäurediethylester.....	55
3.1.8.2	<i>cis</i> - und <i>trans</i> -5-Chlor-2-amino-4-pentensäure.....	57
3.1.8.3	<i>cis</i> - und <i>trans</i> -Chlorvinylpyruvat	58
3.1.8.4	Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Chlorvinylpyruvat	59
3.1.9	Synthese von (S)- und (R)-5-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerat.....	60
3.1.9.1	(S)- und (R)-3-Acetyl-5-chlormethyldihydro-2-furanon.....	62
3.1.9.2	(S)- und (R)-5-Chlormethyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon.....	64
3.1.9.3	(S)- und (R)-2-Amino-4,5-epoxy-pentensäure	65

3.1.9.4	5-Chlormethylisoxazolin-3-carbonsäureethylester	67
3.1.9.5	5-Chlormethylisoxazolin-3-carbonsäure	67
3.1.9.6	2-Amino-5-chlor-4-hydroxypentansäure.....	68
3.1.9.7	3-Amino-5-methyldihydro-2-furanonhydrochlorid.....	69
3.1.9.8	(S)- und (R)-5-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerat	70
3.1.10	Acetaldehydphenylhydrazon	71
3.1.11	Pyruvat-Phenylhydrazon	72
3.2	Charakterisierung der beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch <i>Pseudomonas putida</i> GJ31 auftretenden Metabolite.....	73
3.2.1	Isolierung und Charakterisierung des Spaltprodukts der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase.....	77
3.2.1.1	Versuch der direkten Isolierung und Charakterisierung des Metaboliten	78
3.2.1.2	Isolierung und Charakterisierung des Spaltprodukts der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase durch Derivatisierung.....	79
3.2.2	Isolierung und Charakterisierung des Produkts der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase	83
3.2.2.1	Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure	85
3.2.3	Isolierung und Charakterisierung des Produkts der protonenkatalysierten Tautomerisierung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure	86
3.2.4	Isolierung und Charakterisierung des Produkts der 4-Oxalocrotonat Decarboxylase.....	88
3.2.5	Isolierung und Charakterisierung des Produkts der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase.....	89
3.2.6	Isolierung und Charakterisierung der Produkte der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase und 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase durch Derivatisierung und HPLC-Analytik.....	90
3.2.6.1	Ergebnis der Umsetzung der unchlorierten Metabolite <i>Rac</i> -4-Hydroxy-2-oxovalerat und Vinylpyruvat	92
3.2.6.2	Ergebnis der Umsetzung der chlorierten Metabolite <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Chlorvinylpyruvat.....	93
3.2.7	Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung der beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch <i>Pseudomonas putida</i> GJ31 auftretenden Metabolite	94
3.3	Bestimmung von Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der für den Abbau von 4-Chlorcatechol postulierten Enzyme des <i>meta</i> -Weges in Rohextrakten von <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311	95
3.3.1	Aktivitäten der Catechol-2,3-Dioxygenasen aus <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311 für Catechol bzw. 4-Chlorcatechol	97
3.3.2	Aktivitäten der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolasen aus <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311 für 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd bzw. 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd	98
3.3.3	Aktivitäten der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenasen aus <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311 für 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd bzw. 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd	100
3.3.4	Aktivitäten der 4-Oxalocrotonat-Tautomerasen aus <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311 für 2-Hydroxymuconsäure bzw. 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure.....	102
3.3.5	Aktivitäten der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylasen aus <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311 für 4-Oxalocrotonat bzw. 2-Chlor-4-oxalocrotonat.....	103

3.3.6	Aktivitäten der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratasen aus <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311 für Vinylpyruvat bzw. <i>cis</i> - und <i>trans</i> -Chlorvinylpyruvat	104
3.3.7	Aktivitäten der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolasen aus <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311 für (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat	105
3.3.8	Aktivitäten der Acetaldehyd-Dehydrogenasen aus <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311 für Acetaldehyd und Chloracetaldehyd	106
3.4	Wachstumverhalten von <i>Pseudomonas putida</i> WR311 auf 4-Chlorbenzoat	108
4.	Diskussion	110
4.1	Chemische Darstellung der beim Abbau von Catechol und 4-Chlorcatechol über den <i>meta</i> -Weg auftretenden Metabolite	110
4.2	Charakterisierung der beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch <i>Pseudomonas putida</i> GJ31 auftretenden Metabolite	112
4.2.1	Charakterisierung des Spaltprodukts der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase	113
4.2.2	Charakterisierung des Produkts der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase	114
4.2.3	Charakterisierung der Produkte der 4-Oxalocrotonat-Tautomerase und der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase	114
4.2.4	Charakterisierung der Produkte der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase und 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase	116
4.3	Bestimmung der maximalen Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der für den Abbau von 4-Chlorcatechol postulierten Enzyme des <i>meta</i> -Weges in Rohextrakten von <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311	117
4.3.1	Rückschlüsse aus den Ergebnissen der Enzymtests auf die in <i>Pseudomonas putida</i> WR311 exprimierten Enzyme	121
4.4	Abschätzung des beim Abbau von 4-Chlorcatechol in <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311 auftretenden Stoffflusses	122
4.4.1	Der Stofffluss beim Abbau von Catechol durch <i>Pseudomonas putida</i> GJ31 über den <i>meta</i> -Weg	123
4.4.2	Der Stofffluss beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch <i>Pseudomonas putida</i> GJ31 über den <i>meta</i> -Weg	125
4.4.3	Vergleich des Stoffflusses beim Abbau von Catechol und 4-Chlorcatechol über den <i>meta</i> -Weg durch <i>Pseudomonas putida</i> GJ31	126
4.4.4	Der Stofffluss beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch <i>Pseudomonas putida</i> PaW1 über den <i>meta</i> -Weg	127
4.4.5	Der Stofffluss beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch <i>Pseudomonas putida</i> WR311 über den <i>meta</i> -Weg	128
4.4.6	Vergleich des Stoffflusses beim Abbau von 4-Chlorcatechol über den <i>meta</i> -Weg bei <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311	130
4.5	Fazit und Ausblick	132
5.	Zusammenfassung	135
6.	Literaturverzeichnis	138
7.	Abkürzungen	148

8. Anhang	150
8.1 Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen in Rohextrakten von <i>Pseudomonas putida</i> GJ31, PaW1 und WR311	150
8.1.1 Bestimmung der Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitäten	150
8.1.2 Bestimmung der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase- und Dehydrogenase-Aktivitäten.....	153
8.1.3 Bestimmung der 4-Oxalocrotonat-Tautomerase-Aktivitäten	155
8.1.4 Bestimmung der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase-Aktivitäten	156
8.1.5 Bestimmung der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase-Aktivitäten	158
8.1.6 Bestimmung der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase-Aktivitäten.....	160
8.1.7 Bestimmung der Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten.....	161
8.2 Verbindungsverzeichnis:	163

Abstract

The study aimed to elucidate the degradation of 4-chlorocatechol via the *meta*-pathway. Metabolites synthesized chemically were compared with those intermediates from transformations by enzymes. The metabolites were used to determine the substrate affinities and activities of the enzymes involved in the degradation pathways of three *Pseudomonas putida* strains.

1. Postulated metabolites of the degradation of catechol and 4-chlorocatechol were synthesized by chemical methods. If the direct synthetic production failed, the metabolites were obtained by step-by-step-conversion with enzymes in crude extracts or with cloned enzymes (CbzE and CbzG from *Pseudomonas putida* GJ31) starting with the diphenolic compounds.

- 2-Hydroxymuconic acid (**2**), 4-oxalocrotonate (**3**), vinylpyruvate (**4**) as well as 4- and 5-chloropicolinic acid (**19,21**) were synthesized according to published methods. Instructions for the synthesis of acetaldehyde phenylhydrazone (**39**) and pyruvate phenylhydrazone (**40**) were applied.
- (S)- and (R)-4-Hydroxy-2-oxovalerate (**5**) as well as *cis*- and *trans*-chlorovinylpyruvate (**9**) were synthesized in stereoisomeric pure form. The synthesis of (S)- und (R)-5-chloro-4-hydroxy-2-oxovalerate (**10**) failed since the enzymatic conversion of 2-amino-5-chloro-4-hydroxypentanoic acid (**33**) by amino acid oxidase was not successful.
- The ring cleavage product 5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde (**6**) was enriched in solution by conversion of 4-chlorocatechol with crude extract of *Pseudomonas putida* GJ31 or with the crude extract of a CbzE-expression strain. The conversion of a 5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde with the crude extract of a CbzG-expression strain yielded 5-chloro-2-hydroxymuconic acid (**7**).
- 5-Chloro-2-oxo-3-hexenedioic acid (**8a**) and 2-chloro-4-oxalocrotonate (**8b**) respectively were not accessible by chemical synthesis. An aqueous solution with a mixture of 5-chloro-2-hydroxymuconic acid (**7**) and 5-chloro-2-oxo-3-hexenedioic acid (**8a**) was obtained by proton-catalyzed tautomerism of 5-chloro-2-hydroxymuconic acid (**7**).

2. The metabolites occurring in the degradation of 4-chlorocatechol via the *meta*-pathway were obtained by conversion of 4-chlorocatechol or an identified intermediate with crude extract of *Pseudomonas putida* GJ31 due to inhibition of the following reaction step.
 - 5-Chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde (**6**) was the exclusive product of dioxygenolytic cleavage of 4-chlorocatechol by chlorocatechol 2,3-dioxygenase as shown by derivatisation to 5-chloropicolinic acid (**21**). Thus, the attack of the enzyme on 4-chlorocatechol occurred exclusively in the proximal position.
 - 5-Chloro-2-hydroxymuconic acid (**7**) was isolated in solution as the product of the reaction of 5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde (**6**) with 2-hydroxymuconic semialdehyde dehydrogenase.
 - *cis*-Chlorovinylpyruvate (**9**) was the product formed by the 4-oxalocrotonate decarboxylase. Therefore, 5-chloro-2-oxo-3-hexenedioic acid (**8a**) is a metabolite of the dehydrogenolytic branch.
 - The conversion of *cis*- and *trans*-chlorovinylpyruvate (**9**) with crude extract of *Pseudomonas putida* GJ31 yielded 5-chloro-4-hydroxy-2-oxovalerate (**10**) and pyruvate, which were determined as the phenylhydrazone derivatives.
3. To determine potential bottlenecks in the *meta*-pathways of strains *Pseudomonas putida* GJ31 and PaW1 data on the substrate affinity and maximum enzyme activity were obtained.
 - All *meta*-pathway enzymes studied in the crude extract of *Pseudomonas putida* GJ31 grown with chlorobenzene are capable of converting the respective metabolites of 4-chlorocatechol degradation.
 - 2-Hydroxymuconic semialdehyde hydrolase of *Pseudomonas putida* GJ31 showed lower substrate affinity to 5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde (**6**) than 2-hydroxymuconic acid dehydrogenase.
 - In the crude extract of *Pseudomonas putida* PaW1 grown with 3-methylbenzoate the 4-oxalocrotonate isomerase failed to transform 5-chloro-2-hydroxymuconic acid (**7**). Therefore, the degradation of 4-chlorocatechol has to be expected to proceed exclusively through the hydrolytic branch.
 - 4-Oxalocrotonate isomerase and acetaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida* PaW1 failed to convert the chlorinated substrate analogs. The further analyzed enzymes of

the *meta*-pathway showed activities with the intermediates of 4-chlorocatechol degradation.

4. Substance flow in the degradation of 4-chlorocatechol was analyzed in *Pseudomonas putida* WR311, a strain harbouring both the genes coding the *meta*-pathway of *P. putida* GJ31 and PaW1, which allow the degradation 4-chlorobenzoate via the 4-chlorocatechol.

- During degradation of 4-chlorobenzoate an accumulation of the ring cleavage product 5-chloro-2-hydroxymuconic semialdehyde (**6**) was observed.
- 4-Oxalocrotonate isomerase activity was induced, but activity for 5-chloro-2-hydroxymuconic acid (**7**) was absent indicating that the *Pseudomonas putida* PaW1-enzyme is formed in *P. putida* WR311 during growth with 4-chlorobenzoate. Therefore, the hydrolytic branch of the *meta*-pathway is in use for 4-chlorocatechol degradation.
- The following conclusion may be drawn: In *Pseudomonas putida* WR311, grown with 4-chlorobenzoate, the gene cluster *xyWXYZLTEGFJQKIH* encoded by the TOL plasmid of *P. putida* PaW1 and the *meta*-operon *cbzE(2)FJ(2)QK* encoded by plasmid pKW1 of *P. putida* GJ31 are expressed.

5. The acetaldehyde dehydrogenase was identified as the critical enzyme in the degradation of 4-chlorocatechol via the *meta*-pathway. In *Pseudomonas putida* GJ31 and WR311, which are able to degrade 4-chlorocatechol, chloroacetaldehyde and acetaldehyde were transformed by a coenzyme A-independent dehydrogenase.

In contrast, in *Pseudomonas putida* PaW1 a CoA-dependent acetaldehyde dehydrogenase is present, which failed to use chloroacetaldehyde as the substrate. This explains the absence of the potential of strain PaW1 to mineralize 4-chlorocatechol.

1. Einleitung

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte erfolgte die Freisetzung beträchtlicher Mengen anthropogener Schadstoffe in die Umwelt. Hierbei spielt die Stoffklasse der chlorierten organischen Verbindungen eine herausragende Rolle. Die in der Regel niedrigen Produktionskosten und die universellen Einsatzmöglichkeiten sowohl in der Synthese wie auch als Endprodukt machen die Chlorchemie zu den bedeutendsten Zweigen der chemischen Industrie weltweit. Die Emission erfolgt zum Teil bewusst in Form von Pflanzenschutzmitteln und Insektiziden. Aber auch bei der industriellen chemischen Produktion anfallende Nebenprodukte und Abfälle werden über Abwässer oder Abluft freigesetzt und belasten das Ökosystem und gefährden die Umwelt.

Den Quellen oftmals toxischer Chlorverbindungen stehen keine effektiven und umweltschonenden Senken gegenüber. Aliphatische Chlorkohlenwasserstoffe sind oftmals flüchtig, so dass Radikalreaktionen in der oberen Atmosphäre eine maßgebliche Rolle beim Abbau dieser Verbindungen spielen. Aromatischen organischen Chlorverbindungen zeigen hingegen aufgrund ihrer hohen Lipophilie und ihrer zum Teil beachtlichen Stabilität eine hohe Persistenz in der Bodenmatrix, wo sie akkumuliert werden. Weiterhin begünstigen ihre hydrophoben Eigenschaften eine Anreicherung in tierischem und menschlichem Fettgewebe, so dass aromatische Chlorverbindungen auch in der Nahrungskette, z. B. Muttermilch, nachgewiesen werden können (EICHACKER & KOLLER, 1996; WINNEKE, 2002).

Mikroorganismen haben eine große Bedeutung für den gesamten Stofffluss und somit das Funktionieren unseres Ökosystems. Durch Zersetzung und Mineralisierung sorgen sie für eine Rückführung von Nährstoffen innerhalb der natürlichen Kreisläufe. Durch die Biodiversität der Vielzahl an Organismen ist die Menge der metabolisierbaren Verbindungsklassen beachtlich. So konnten auch für eine Reihe von Gefahrstoffen Mikroorganismen isoliert werden, die diese Verbindungen unter Laborbedingungen mineralisieren. Dennoch kommt es in vielen Fällen zu einer Anreicherung persistenter Stoffe. Eine Beobachtung, die die Grenzen der natürlichen Fähigkeit zum Abbau von Schadstoffen durch Mikroorganismen widerspiegelt. Besonders Chemikalien, deren Strukturelemente oder Substituenten sich von natürlich vorkommenden Verbindungen unterscheiden (Xenobiotika), entziehen sich einem schnellen Abbau.

Ein hierfür typisches Beispiel stellt das organisch gebundene Chlor dar: aufgrund seines nur marginalen Vorkommens in der natürlichen Biomasse ist davon auszugehen, dass Mikroorganismen nicht genügend Zeit hatten, um entsprechende Abbauwege zu entwickeln. Für

manche Xenobiotika ist kein mikrobieller Abbau bekannt, in anderen Fällen verläuft dieser nur unvollständig oder ineffizient (REINEKE, 2001).

Es besteht dennoch ein beachtliches mikrobielles Abbaupotential für aromatische Chlorverbindungen. Es könnte eine unter wirtschaftlichen und ökologischen Gesichtspunkten sinnvolle Alternative zu bisher angewandten Dekontaminierungsmethoden darstellen. Die Lagerung von Umweltschadstoffen auf Deponien sowie die gebräuchlichen physikalisch-chemischen Reinigungsverfahren kontaminierter Umweltmedien sind aufwendig und teuer.

Aufgrund der Komplexität der Thematik sind pauschale Aussagen zum Erfolg einer mikrobiellen Dekontamination eines belasteten Standorts jedoch nicht möglich. Um deren Anwendbarkeit beurteilen zu können, sind detaillierte Kenntnisse über die bereits vorhandenen Fähigkeiten der Bakterien notwendig. Abbauwege der beteiligten Bakterien und die daran beteiligten Enzyme, ihre Spezifität und Regulation müssen bekannt sein.

1.1 Catechol als zentrales Strukturelement des aeroben mikrobiellen Aromatenabbaus

Zahlreiche in der Natur vorkommende aromatische Verbindungen können durch Bakterien vollständig zu zentralen Stoffwechselmetaboliten des Tricarbonsäure-Zyklus abgebaut werden. Eine Hürde stellt hierbei das „Aufbrechen“ des stabilen aromatischen Systems dar. Unter aeroben Bedingungen erfolgt eine Aktivierung durch sauerstoffabhängige Mono- und Dioxygenasen (REINEKE, 2001). Das bei diesem Schritt gebildete diphenolische Strukturelement des Catechols stellt daher einen bedeutenden zentralen Metaboliten des aeroben mikrobiellen Aromatenabbaus dar. Bis auf wenige Ausnahmen konvergieren die peripheren Abbauwege vieler aromatischen Ausgangsverbindungen auf der Stufe des Catechols (Abb. 1.1).

Für chlorierte Aromaten stellt sich zusätzlich das Problem der Halogeneliminierung. Hier kann zwischen „frühen“ und „späten“ Dehalogenierungsmechanismen unterschieden werden. Die hydrolytische, reduktive und oxygenolytische Dechlorierung sind Reaktionstypen, die zu einer Eliminierung des Halogensubstituenten am aromatischen Ring führen (KASCHABEK, 1995; REINEKE, 2001). Weitere Umsetzungen der Reaktionsprodukte führen ebenfalls zur Stufe des Catechols.

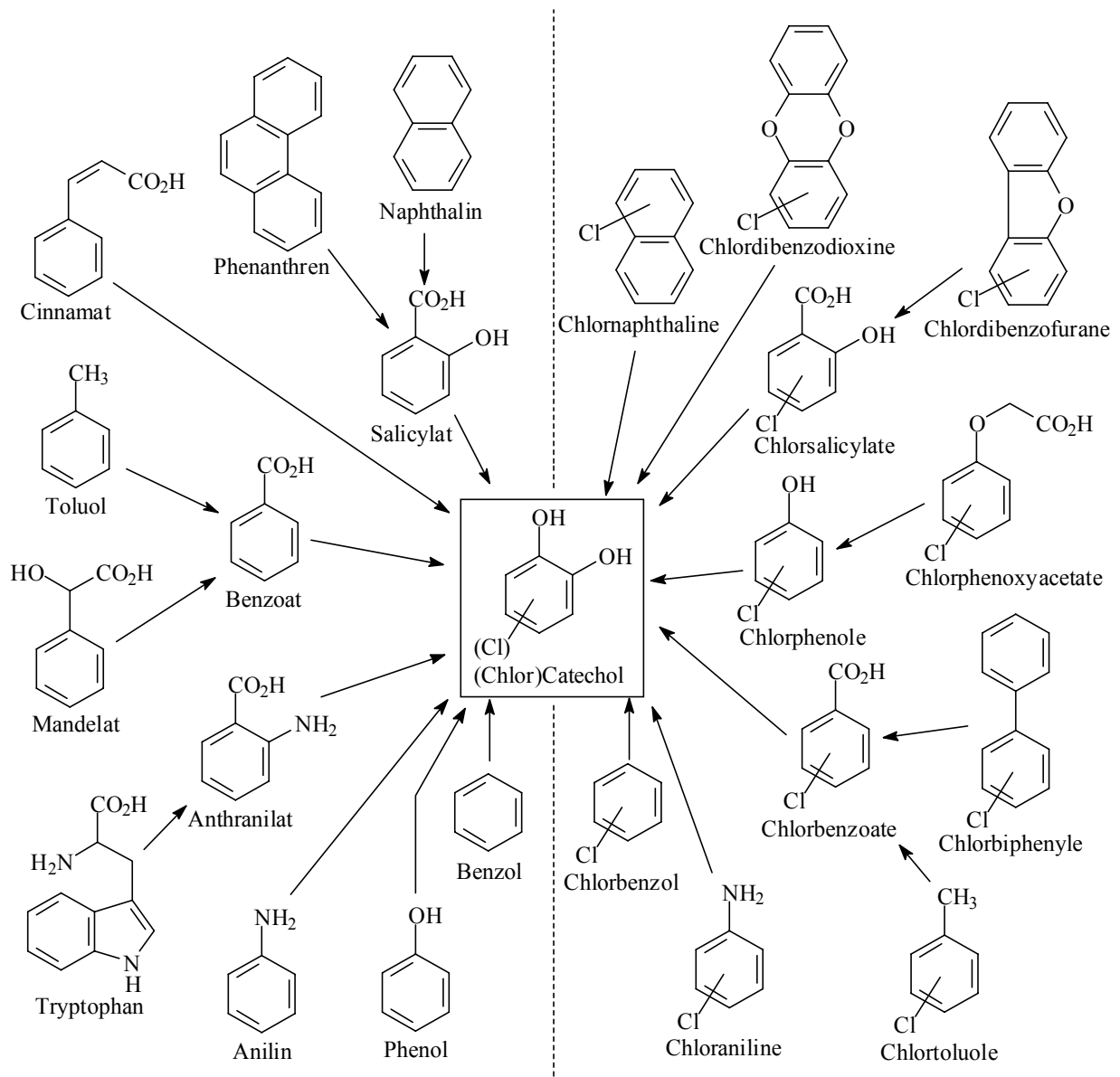


Abb. 1.1: Konvergenz beim Abbau verschiedener Aromaten und Chloraromaten auf der Stufe des Catechols bzw. Chlorcatechols (nach HARWOOD & PARALES (1996) und REINEKE (2001)).

In Abbauwegen, die über „späte“ Dehalogenierungsmechanismen verlaufen, erfolgt die Dechlorierung nach einer dioxygenolytischen Ringspaltung des Catecholsystems. Viele chlorierte Aromaten werden also zunächst zu Chlorcatecholen umgesetzt, so dass auch die Abbauege der Halogen-substituierten aromatischen Verbindungen auf dieser Ebene konvergieren (REINEKE, 2001). Die Eliminierung des Chlorsubstituenten erfolgt nach der Spaltung des Catechols.

1.2 Die Metabolisierung von Catechol: *ortho*- oder *meta*-Weg

Auf der Ebene des Catechols erfolgt die Öffnung des aromatischen Rings durch eine Dioxygenase. Hierbei sind zwei Positionen der Ringspaltung möglich (Abb. 1.2): eine Intradiol-Spaltung zwischen den beiden Hydroxylfunktionen durch eine Catechol-1,2-Dioxygenase führt zur Bildung einer Muconsäure (Fall a). Hierdurch wird eine metabolische Sequenz eröffnet, die als *ortho*- oder 3-Oxadipat-Weg - bei der Umsetzung von chlorierten Catecholen als modifizierter *ortho*-Weg - bezeichnet wird. Die oxygenolytische Extradiol-Spaltung durch eine Catechol-2,3-Dioxygenase liefert hingegen eine 2-Hydroxymuconsäure und führt zum weiteren Abbau über den *meta*-Weg (Fall b).

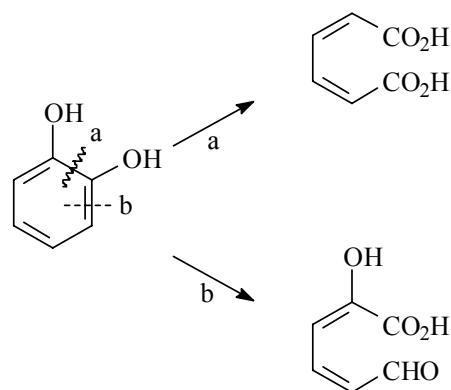


Abb. 1.2: Zwei Möglichkeiten der dioxygenolytischen Spaltung, exemplarisch dargestellt am Beispiel Catechol. a - *ortho*-Spaltung. b - *meta*-Spaltung.

Der *meta*-Weg galt lange als ungeeignet für die Mineralisierung von Chloraromaten, die über die Stufe des Chlorcatechols abgebaut werden (KNACKMUSS, 1981; ROJO et al., 1987; PETTIGREW et al., 1991). Insbesondere führte die Umsetzung von 3-Chlorcatechol durch die Catechol-2,3-Dioxygenase zu einer schnellen Inaktivierung des Enzyms. Für diese effektive Inhibierung werden zwei unterschiedliche Gründe angeführt (Abb. 1.3): BARTELS et al. (1984) konnten zeigen, dass die Umsetzung von 3-Chlorcatechol durch die Catechol-2,3-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* PaW1 (mt-2) ein irreversibler Prozess ist, der unter Sauerstoffverbrauch abläuft. Dies legte die Vermutung nahe, dass durch das Enzym aus 3-Chlorcatechol 2-Hydroxy-6-chlorcarboxymuconsäure gebildet wird und dieses reaktive Säurechlorid durch spontane Reaktion mit nukleophilen Gruppen des Proteins zur reversiblen Inaktivierung der Dioxygenase führt (Fall b). Diese Theorie wird durch die Beobachtung gestützt, dass als Produkt der

Umsetzung geringe Mengen an 2-Hydroxymuconsäure, dem Hydrolyseprodukt des Carbonsäurechlorids, festgestellt werden konnten.

Die zweite Erklärung für eine Inhibierung des Enzyms beruht auf der Beobachtung von KLECKA & GIBSON (1981), dass die Catechol-2,3-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* F1 durch 3-Chlorcatechol reversibel gehemmt wird. Dies wurde von ELTIS & BOLIN (1996) durch eine Chelierung des Fe^{2+} -Cofaktors durch das Substrat erklärt (Fall a).

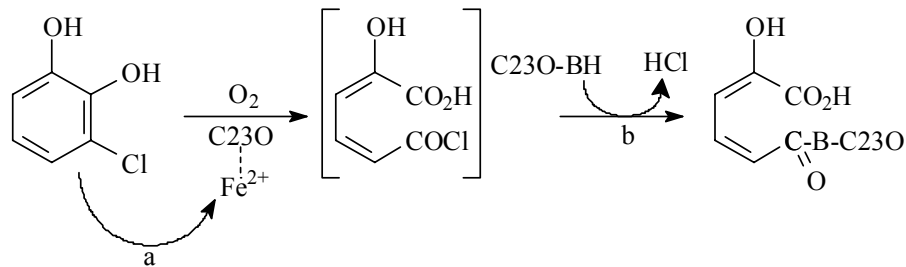


Abb. 1.3: Inaktivierung der Catechol-2,3-Dioxygenase durch 3-Chlorcatechol. a - reversible Inaktivierung durch Chelierung des Fe^{2+} -Cofaktors des Enzyms. b - irreversible Suizid-Inaktivierung durch Reaktion des intermediär gebildeten Säurechlorids mit nucleophilen Gruppen des Enzyms.

1.3 Abbau von Catechol über den *meta*-Weg

Der *meta*-Weg wird von Bakterien eingeschlagen, deren Metabolismus aromatischer Verbindungen über die Stufe von Alkylcatecholen führt. Dieser Abbauweg ist für verschiedene Bakterienstämme gut untersucht (SALA-TREPAT & EVANS, 1971; HARAYAMA et al., 1984; BAYLY & BARBOUR, 1984; SHINGLER et al., 1992) und in Abbildung 1.4 am Beispiel von 3- und 4-Methylcatechol dargestellt.

Zunächst erfolgt die Spaltung des Catechol-Systems durch eine Catechol-2,3-Dioxygenase. Auf der Stufe des 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyds bestehen zwei Möglichkeiten der weiteren Umsetzung. Die beiden hierfür verantwortlichen Enzyme 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase (HMSD) und -Hydrolase (HMSH) können in der Regel parallel beobachtet werden. Lediglich das Substitutionsmuster des einen weiteren Rest tragenden 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyds entscheidet darüber, ob der weitere Abbau über den dehydrogenolytischen oder den hydrolytischen Weg verläuft (HARAYAMA et al., 1987): Durch die Enzyme des TOL-Plasmids werden Catechol und 4-Methylcatechol nur über den dehydrogenolytischen Zweig

abgebaut. Die Metabolisierung von 3-Methylcatechol erfolgt hingegen ausschließlich durch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase. Dieses Enzym katalysiert die hydrolytische Spaltung einer Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung, wodurch der Metabolit Vinylpyruvat gebildet wird.

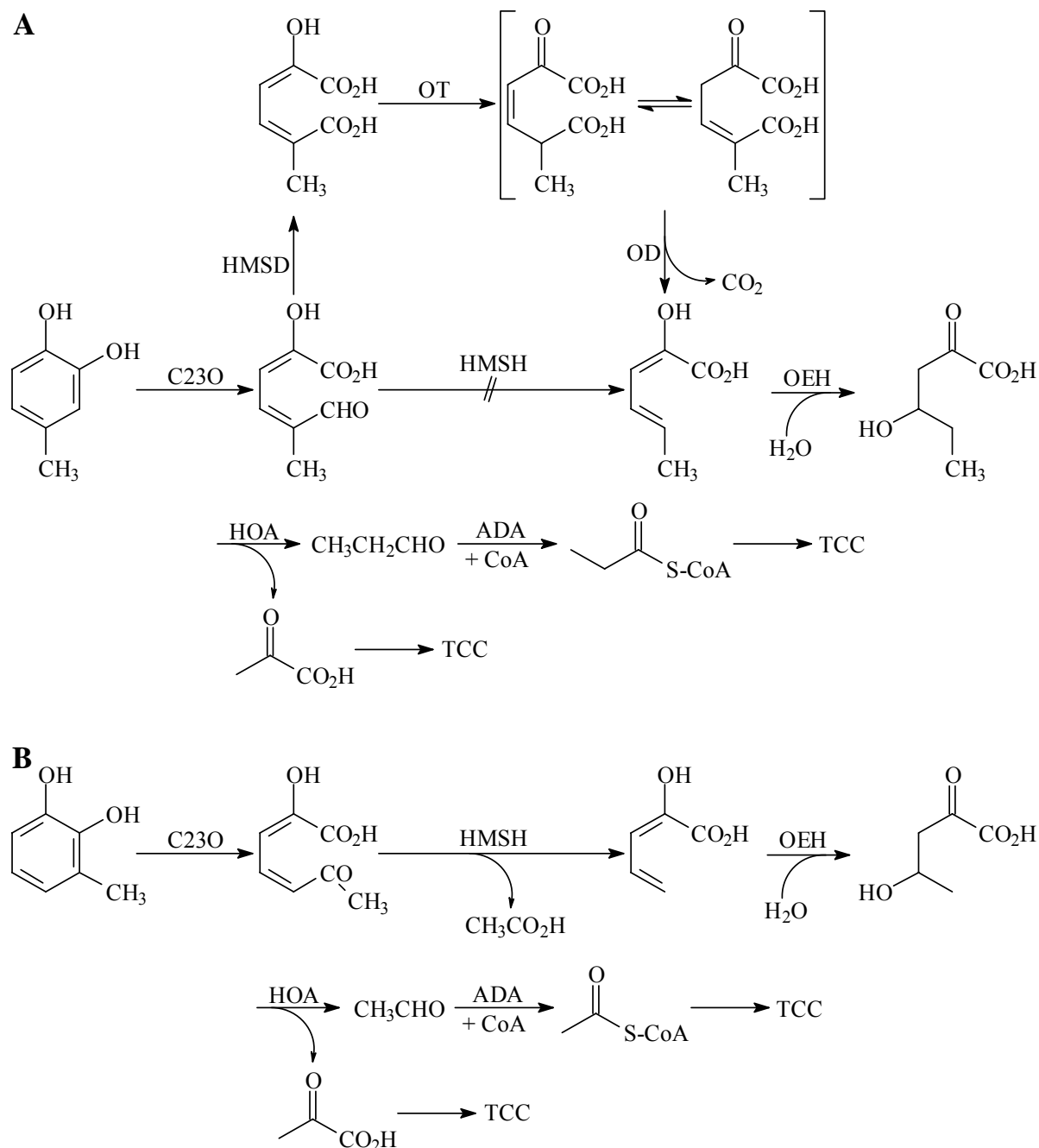


Abb. 1.4: Abbau von Methylcatecholen über den *meta*-Weg (nach HARAYAMA et al., 1987). **A:** Abbau von 4-Methylcatechol über den dehydrogenolytischen Zweig. **B:** Abbau von 3-Methylcatechol über den hydrolytischen Zweig. C23O - Catechol-2,3-Dioxygenase, HMSH - 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, HMSD - 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, OT - 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, OD - 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, OEH - 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase, HOA - 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, ADA - Acetaldehyd-Dehydrogenase, TCC - Tricarbonsäure-Zyklus.

Die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase führt zur Bildung einer 2-Hydroxymuconsäure, deren Isomerisierung zur 5-Methyl-2-oxo-3-hexendisäure bzw. dem methylsubstituierten 4-Oxalocrotonat durch eine 4-Oxalocrotonat-Tautomerase (OT) beschleunigt wird. Durch eine von der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase (OD) katalysierten Abspaltung einer Carboxylgruppe konvergieren die beiden Wege auf der Stufe des (Methyl-)Vinylpyruvats. Die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase (OEH) führt zur Bildung von 4-Hydroxy-2-oxohexansäure (Fall A) bzw. 4-Hydroxy-2-oxovalerat (Fall B), welches durch die 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase (HOA) in Pyruvat und Propion- (Fall A) oder Acetaldehyd (Fall B) gespalten wird. Letzteres wird durch eine Coenzym A-abhängige Acetaldehyd-Dehydrogenase zu Acetyl-CoA (ADA) umgesetzt, so dass die aromatische Ausgangsverbindung in zwei Metabolite des Primärstoffwechsels überführt worden ist.

1.4 Der *meta*-Weg in *Pseudomonas putida* GJ31

Der Stamm *Pseudomonas putida* GJ31 wurde von OLDENHUIS et al. (1989) aus dem Rhein als Verwerter von Chlorbenzol isoliert. Dieser Organismus verfügt über die Fähigkeit, nicht nur Chlorbenzol, sondern auch Toluol als alleinige Kohlenstoffquelle effektiv zu nutzen. Auch auf einem Gemisch der beiden Aromaten kann Zellwachstum beobachtet werden.

Wie Untersuchungen von KASCHABEK et al. (1998) zeigten, beruht diese Eigenschaft auf einer neuen Art von Catechol-2,3-Dioxygenase: Die beiden Aromaten werden über die Stufe des in Position 3 substituierten Catechols abgebaut. Die gereinigte und gut untersuchte Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase CbzE unterliegt aber nicht der unter 1.2 (Abb. 1.3) beschriebenen Suizid-Inaktivierung (MARS et al., 1997; KASCHABEK et al., 1998; MARS et al., 1999). Sie ist gegenüber dem intermediär auftretenden Säurechlorid offensichtlich weniger empfindlich. Eine Umsetzung von 3-Chlorcatechol durch CbzE führt zur Bildung von 2-Hydroxymuconsäure (**2**), einem beim Abbau von Catechol über den *meta*-Weg auftretenden Metaboliten.

Wie MARS et al. (1997) weiterhin feststellten, ist eine *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur auch in der Lage, 4-Chlorcatechol als Substrat zu verwerten. Der Abbau von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg ist nur selten beschrieben worden (HORVATH, 1970; MORRIS & BARNESLEY, 1982; HOLLENDER et al., 1994; ARENSDORF & FOCHT, 1995; AJITHKUMAR & KUNHI, 2000). Die bei diesem Abbau auftretenden Zwischenstufen wurden bisher kaum untersucht.

Für die dioxygenolytische Spaltung des Catecholsystems bestehen durch den zusätzlichen Substituenten an Position 4 des aromatischen Systems zwei Möglichkeiten in der Orientierung: Es stehen zwei Bindungen des Ringsystems für eine enzymkatalysierte 2,3-Spaltung zur Verfügung (Abb. 1.5). Durch eine proximale Spaltung (Fall a) wird ein anders substituiertes Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd gebildet als durch distale Orientierung (Fall b). WIESER et al. (1994) sowie ARENSDORF & FOCHT (1995) konnten für die Organismen *Azotobacter* sp. GP1 bzw. *Pseudomonas cepacia* P166 nachweisen, dass die *meta*-Spaltung von 4-Chlorcatechol ausschließlich in proximaler Position erfolgt. Die distale Spaltung wurde nur selten beobachtet (HORVATH, 1970).

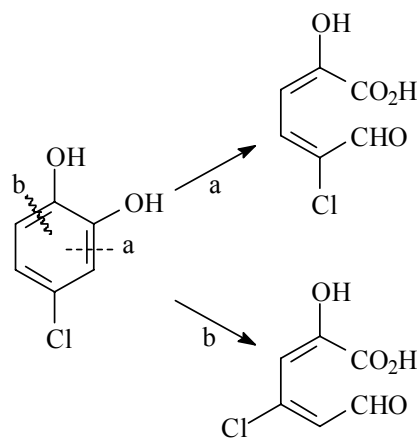


Abb. 1.5: Proximale (a) und distale (b) dioxygenolytische Spaltung von 4-Chlorcatechol.

Die für die Enzyme des *meta*-Weges kodierenden Gene konnten für *Pseudomonas putida* GJ31 auf dem 180 kbp großen Plasmid pKW1 identifiziert werden und verteilen sich auf drei Gen-Cluster (KUNZE, 2002; ZERLIN, pers. Mitteilung). Die Enzyme des peripheren Abbauweges, Chlorbenzol-Dioxygenase und *cis*-Dihydrodiol-Dehydrogenase sind hingegen chromosomal kodiert (KUNZE, 2002).

In dem Abbau-Cluster *cbzTEXG* sind Gene der an dem dehydrogenolytischen Zweig des *meta*-Weges beteiligten Enzyme organisiert (MARS et al., 1997; KUNZE 2002): *cbzT* kodiert für ein Ferredoxin, von dem angenommen wird, dass es zum Schutz des Eisen-(II)-Ions der Dioxygenase gegen Oxidation verantwortlich ist. *cbzE* kodiert für die bereits angesprochene Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase (CC23O), während die Funktion des *cbzX*-Translationsprodukts nicht bekannt ist. Es schließt sich der für CbzG (2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, HMSD) kodierende Bereich an. Weiter downstream folgt das Gen *cbzJ*, welches für eine 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase (OEH) kodiert. Diese Enzyme werden wahrscheinlich

konstitutiv exprimiert. Ihre Expression wird zumindest nicht durch aromatische Substrate induziert, wie MARS et al. (1997) und KUNZE (2002) durch Bestimmung von Enzymaktivitäten in Rohextrakten von *Pseudomonas putida* GJ31-Kulturen zeigen konnten, die auf Acetat oder Chlorbenzol gewachsenen waren.

Das *meta*-Operon stellt den zweiten Cluster mit Genen des *meta*-Weges auf dem degradativen Plasmid aus GJ31 dar (KUNZE, 2002). Die Expression der hierin kodierten Enzyme wird durch aromatische Verbindungen induziert. Die Enzyme sind für den Abbau über den hydrolytischen Zweig des *meta*-Weges notwendig: mit *cbzE(2)* wurde das Gen einer zweiten Catechol-2,3-Dioxygenase entdeckt, deren Substratverwertungsmuster sich laut KUNZE (2002) von dem der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase CbzE unterscheidet. CbzE(2) ist nicht in der Lage, 3-Chlorcatechol umzusetzen und versagt bei einigen höher chlorierten Catecholen, katalysiert aber die dioxygenolytische Spaltung von 4-Chlorcatechol in 2,3-Position. In dem Operon schließen sich die Gene *cbzF* (2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, HMSH), *cbzJ(2)* (2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase, OEH), *cbzQ* (Acetaldehyd-Dehydrogenase, ADA) und das für die 4-Hydroxy-2-oxoalderat-Aldolase (HOA) kodierende *cbzK* an.

Der dritte Gen-Cluster (*nahINLOMKJX*, ZERLIN, pers. Mitteilung) beinhaltet Gene für die folgenden am *meta*-Weg beteiligten Enzyme: *nahI* (2-Hydroxymuconsäure-Dehydrogenase, unvollständig), *nahN* (2-Hydroxymuconsäure-Hydrolase), *nahL* (2-Oxopent-4-enoat-Hydratase), *nahO* (Acetaldehyd-Dehydrogenase), *nahM* (2-Oxo-4-hydroxypentanoat-Aldolase), *nahK* (4-Oxalocrotonat-Decarboxylase), *nahJ* (4-Oxalocrotonat-Tautomerase) und *nahX* (unbekannte Funktion). Über die Induktion dieses Operons gibt es bisher keine Erkenntnisse.

Aus diesen genetischen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass beim Wachstum von *Pseudomonas putida* GJ31 auf Chlorbenzol als alleiniger Kohlenstoffquelle mindestens die beiden Operons *cbzTEXTG* und *cbzE(2)FJ(2)QK* induziert werden. Es werden also isofunktionelle Catechol-2,3-Dioxygenasen und 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratasen exprimiert. Es stellt sich jedoch die Frage, welche der exprimierten Enzyme mit dioxygenolytischer Aktivität nach Wachstum auf Chlorbenzol noch aktiv sind: Das Wachstumssubstrat Chlorbenzol wird über die Zwischenstufe 3-Chlorcatechol abgebaut, das als irreversibler Inhibitor von Catechol-2,3-Dioxygenasen bekannt ist (siehe Abb. 1.3). Aus diesem Grund kann in einem Rohextrakt einer solchen *P. putida* GJ31-Kultur durch Enzymtests möglicherweise nur die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase CbzE nachgewiesen werden. Von KUNZE (2002) konnte noch eine weitere chromosomal kodierte Dioxygenase CbzE(3) lokalisiert werden. Aufgrund einer Punktmutation besitzt dieses Protein gegenüber Catechol jedoch keine Aktivität.

Die Aktivitäten der beiden Enzyme 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase (HMSD) und 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase (HOA) wurden in Rohextrakten von *Pseudomonas putida* GJ31-Zellkulturen bestimmt, die sowohl auf Acetat wie auch Chlorbenzol als alleinigen Kohlenstoffquellen gewachsen waren. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass für beide Proteine sowohl konstitutiv exprimierte wie auch durch Aromaten induzierte Isoenzyme vorhanden sind (KUNZE, 2002; MARS et al., 1997). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde ebenfalls deutlich, dass auch für die beiden Enzyme 4-Oxalocrotonat-Tautomerase (OT) und 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase (OD) beim Wachstum auf Chlorbenzol Isoenzyme exprimiert werden.

Die Nachweise der Enzyme des *meta*-Weges in *Pseudomonas putida* GJ31 erfolgten durch genetische Sequenzvergleiche und Überprüfung der Enzymaktivität im Rohextrakt von Expressionsstämmen gegenüber den unchlorierten Substraten. Teilweise wurden Aktivitäten der am *meta*-Weg beteiligten Enzyme auch in Rohextrakten von *P. putida* GJ31-Kulturen nachgewiesen (MARS et al., 1997). Die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase ist jedoch das einzige Protein, für das die Umsetzung des chlorierten Substrats 4-Chlorcatechol untersucht wurde (MARS et al., 1999). Zusammen mit dem bereits etablierten *meta*-Abbauweg für nicht chlorierte Catechol-Substrate (Abb. 1.4) und den Ergebnissen von ARENSDORF & FOCHT (1995) bei der Untersuchung des Abbaus von 4-Chlorbiphenyl durch *Pseudomonas cepacia* P166 können die in Abbildung 1.6 dargestellten Varianten (A und B) des Abbaus von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31 postuliert werden. Die möglichen Reaktionsprodukte des Umsatzes von 4-Chlor-2-oxo-4-pentenoat durch die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase (OEH) werden unter 3.2 diskutiert.

Bisher sind nur die Enzymaktivitäten der isofunktionellen Catechol-2,3-Dioxygenasen sowie der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase gegenüber den chlorierten Substraten überprüft worden. Für die beiden Dioxygenasen CbzE und CbzE(2) wurde hierbei festgestellt, dass 4-Chlorcatechol mit zum Substratspektrum gehört (KUNZE, 2002). Im Rohextrakt eines CbzF-Expressionsstammes konnte hingegen von KUNZE (2002) keine Aktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase für 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd gemessen werden.

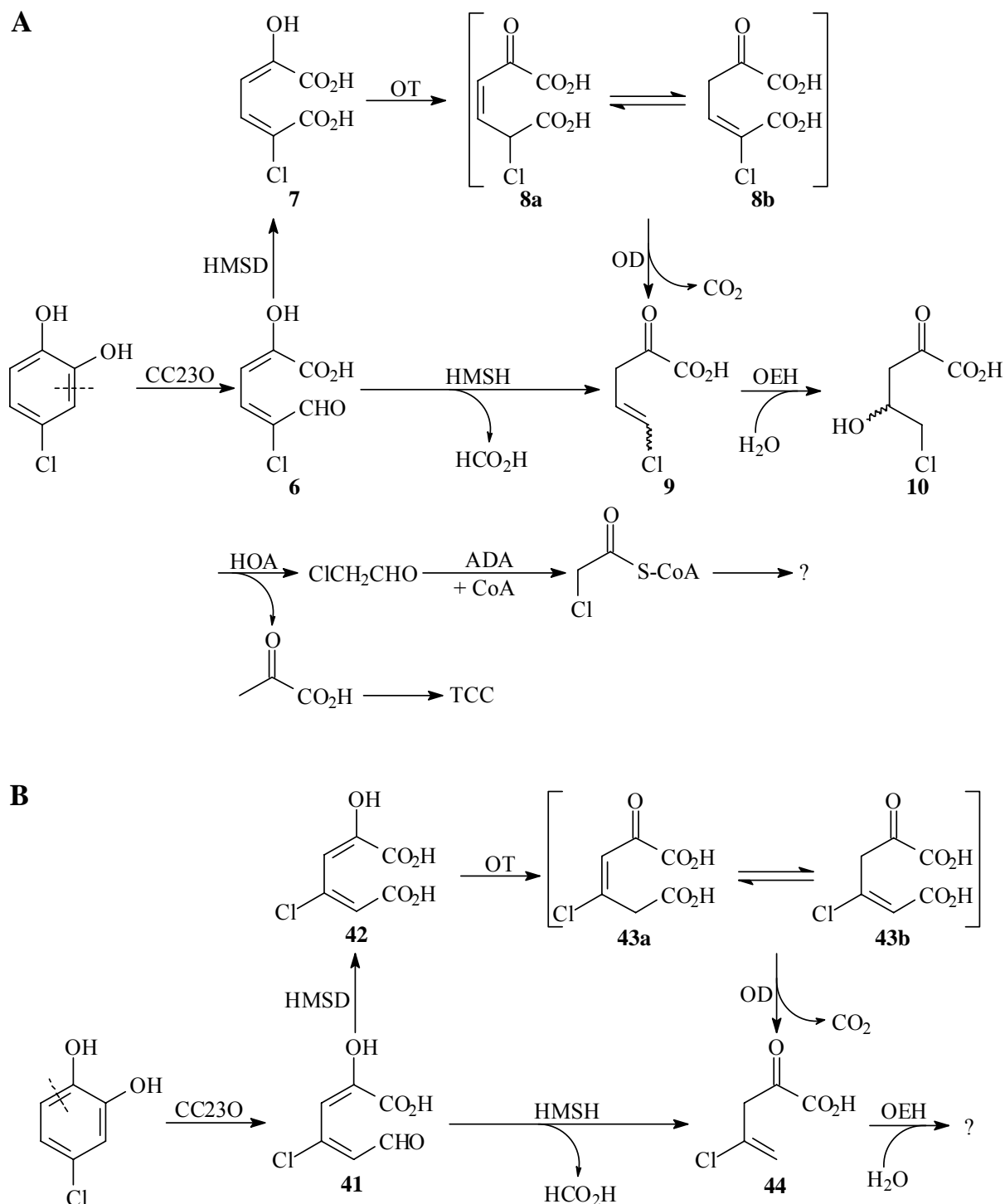


Abb. 1.6: Postulierte Abbauwege von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31. **A:** proximale Ringöffnung des 4-Chlorcatechols. **B:** distale Ringöffnung des 4-Chlorcatechols (Für das Reaktionsprodukt der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase bestehen mehrere Möglichkeiten, siehe 3.2). CC23O - Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase, HMSH - 2-Hydroxy-muconsäuresemialdehyd-Hydrolase, HMSD - 2-Hydroxy-muconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, OT - 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, OD - 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, OEH - 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase, HOA - 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, ADA - Acetaldehyd-Dehydrogenase, TCC - Tricarbonsäure-Zyklus.

1.5 Der *meta*-Weg in *Pseudomonas putida* PaW1

Der Organismus *Pseudomonas putida* PaW1 (auch *P. arvilla* mt-2 oder *P. putida* mt-2) gehört mit zu den am besten untersuchten Aromatenverwertern. Er wurde 1960 in Japan durch Selektion auf 3-Methylbenzoat aus einer Bodenprobe isoliert (NAKAZAWA, 2002) und gehörte damals zu den wenigen Bakterienstämmen, von denen bekannt war, dass sie aromatische Verbindungen über den *meta*-Weg abbauen. In seinem Abbauverhalten unterschied sich der Stamm PaW1 auch von anderen bekannten Aromatenverwertern der Familie *Pseudomonas putida*, die den Abbau von Benzoat über Catechol und weiterführend über den *ortho*-Weg betrieben. Aus diesem Grund konzentrierten sich die Untersuchungen zunächst auf das ringspaltende Enzym. Die Catechol-2,3-Dioxygenase aus *P. putida* PaW1 war die erste kristallisierte Oxygenase (NOZAKI et al., 1963a, b).

Pseudomonas putida PaW1 ist in der Lage, sowohl Toluol, als auch *meta*- und *para*-Xylol als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Durch die drei unspezifischen Enzyme Xylol-Oxidase, Benzylalkohol-Dehydrogenase und Benzaldehyd-Dehydrogenase erfolgt zunächst die sukzessive Oxidation einer Methylgruppe zur Carboxylfunktion. Durch die Toluat-Dioxygenase schließt sich die Dioxygenierung mit anschließender Decarboxylierung an, wobei die Metabolite Catechol, 3-Methyl- bzw. 4-Methylcatechol gebildet werden (WORSEY & WILLIAMS, 1975; WORSEY et al., 1978).

Viele Arbeiten beschäftigten sich mit der Aufklärung des durch *meta*-Spaltung von Catechol und seinen Derivaten eingeleiteten Abbauweges (NISHIZUKA et al., 1962; DAGLEY & GIBSON, 1964; FEIST & HEGEMANN, 1969; SALA-TREPAT & EVANS, 1971; MURRAY et al., 1972; SALAT-TREPAT et al., 1972; BAYLY & BARBOUR, 1984; HARAYAMA et al., 1984; HARAYAMA et al., 1987). Diese Untersuchungen führten als Ergebnis zu der in Abbildung 1.4 dargestellten Reaktionskaskade.

Bereits 1974 zeigten WILLIAMS & MURRAY (1974) und WONG & DUNN (1974) unabhängig voneinander, dass sich die genetische Information für die beim Abbau von 3-Methylbenzoat und Benzoat beteiligten Enzyme in *Pseudomonas putida* PaW1 auf einem konjugativen Plasmid, dem sogenannten TOL-Plasmid (pWW0), befindet. In der Folge konnte gezeigt werden, dass das Plasmid ebenfalls für Enzyme kodiert, die beim Abbau von Toluol zu Benzoat bzw. *meta*- und *para*-Xylol zu dem entsprechenden Methylbenzoat benötigt werden (WORSEY & WILLIAMS, 1975).

Die für die degradativen Enzyme kodierenden Gene sind auf dem Plasmid in zwei Operons organisiert (GREATED et al., 2002). Das obere Operon (*xylUWCMABN*) enthält die Gene für die

Enzyme des peripheren Abbauweges, sie katalysieren die Umsetzungen der Methylaromaten bis zur Stufe des Benzoats bzw. Methylbenzoats (HARAYAMA et al., 1989).

Die Gene des unteren oder *meta*-Operons (*xylXYZLTEGFJQKIH*) kodieren für die am weiteren Abbau beteiligten Proteine (HARAYAMA & REKIK, 1990): Durch die Toluat-1,2-Dioxygenase (*xylXYZ*) und die 1,2-Dihydroxycyclohexa-3,5-dien-1-carboxylat Dehydrogenase (*xylL*) wird Benzoat oder Methylbenzoat zu dem entsprechenden Catechol umgesetzt. Die Nomenklatur der weiteren Gene und Funktion der jeweiligen Enzyme ist der des *meta*-Operons von *Pseudomonas putida* GJ31 analog.

Die Gene für die Enzyme des hydrolytischen wie auch dehydrogenolytischen Zweigs des *meta*-Weges befinden sich auf dem TOL-Plasmid also in einem Operon und werden dementsprechend gemeinsam induziert. Die Expression der Gene des *meta*-Operons wird durch Abbauprodukte des oberen Abbauweges stimuliert (RAMOS et al., 1987). Hierzu gehören unter anderem die beim Abbau von *meta*-Xylol auftretenden Metabolite 3-Methylbenzylalkohol und 3-Methylbenzoat (WORSEY et al., 1978). In Rohextrakten auf aromatischen Substraten gewachsener Zellkulturen von *Pseudomonas putida* PaW1 kann immer eine hohe Aktivität der am *meta*-Weg beteiligten Enzyme festgestellt werden (MURRAY et al., 1972).

Die vollständige Sequenzierung des TOL-Plasmids (GREATED et al., 2002) zeigte, dass jedes Enzym des *meta*-Weges nur ein Mal kodiert ist. WILLIAMS & MURRAY (1974) fanden Hinweise, die darauf hindeuten, dass nur für die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase (OEH) und die 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase (HOA) chromosomal kodierte Isoenzyme vorliegen.

1.6 Der *meta*-Weg in *Pseudomonas putida* WR311

Der Organismus *Pseudomonas putida* WR311 stellt von den drei hier besprochenen *Pseudomonas*-Stämmen den am wenigsten untersuchten Stamm dar. *P. putida* WR311 ist eine Spontanmutante, die durch mehrwöchige Selektion des Stammes *Pseudomonas putida* WR301 auf 4-Chlorbenzoat entstanden ist. *P. putida* WR301 wiederum ist ein Konjugationsprodukt aus *P. putida* GJ31 und PaW258 (REINEKE, pers. Mitteilung). Bei letzterem Stamm handelt es sich um eine *Pseudomonas putida* PaW1-Mutante mit defekter Catechol-2,3-Dioxygenase. Die Einkreuzung der genetischen Information wurde in der Hoffnung durchgeführt, neue, schnell wachsende Stämme zu erhalten, die chlorierte Benzoate zu nutzen in der Lage wären. Hierzu sollte die Fähigkeit von *P. putida* GJ31, 4-Chlorcatechol zu verwerten, mit dem peripheren

Abbauweges des TOL-Plasmids kombiniert werden. Aufgrund der, verglichen mit Chlorcatecholen, geringeren Toxizität der Benzoate sind Selektionsexperimente mit dem Ziel der Erweiterung des Substratverwertungsmusters leichter durchzuführen.

Als Ergebnis einer Reihe solcher Versuche konnte der Stamm *Pseudomonas putida* WR311 isoliert werden, der den Abbau von 4-Chlorbenzoat über die Zwischenstufe 4-Chlorcatechol betreibt. Wie KUNZE (2002) zeigen konnte, beruht diese Fähigkeit auf der Übertragung des TOL-Plasmids auf den Empfängerstamm *Pseudomonas putida* GJ31. Durch die anschließende Selektion hat der hierbei gebildete Organismus die Fähigkeit des peripheren Abbaus von 4-Chlorbenzoat bis auf die Stufe des 4-Chlorcatechols erlangt. Dessen weitere Umsetzung zu Metaboliten des Primärstoffwechsels war durch die Anlage des Empfängerorganismus gegeben.

Der Stamm *Pseudomonas putida* WR311 besitzt also sowohl das TOL-Plasmid als auch das Plasmid pKW1 aus *P. putida* GJ31. Da bisher keine Untersuchungen des neu gebildeten Organismus auf genetischer Ebene durchgeführt wurden, gibt es keine Erkenntnisse über Mutationen, die bei der Selektion unter Umständen aufgetreten sein könnten. Eine Induktion des *meta*-Operons des TOL-Plasmids durch 4-Chlorbenzoat oder eines seiner Abbauprodukte kann nicht ausgeschlossen werden kann, so dass die Möglichkeit besteht, dass die Enzyme beider degradativen Operons beim Wachstum auf 4-Chlorbenzoat exprimiert werden. Es liegen also für die einzelnen Abbauschritte des *meta*-Weges möglicherweise isofunktionelle Enzyme vor.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Abbau von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg durch die Organismen *Pseudomonas putida* GJ31 und WR311 untersucht und aufgeklärt werden. Die Aufgabenstellung umfasste im Einzelnen die folgenden Schritte:

- Soweit nicht etabliert, Erarbeitung von stereoisomerenreinen Darstellungsmöglichkeiten der beim Abbau von Catechol und 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg auftretenden Metabolite: (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat (**5**), 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**), 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**), 2-Chlor-4-oxalocrotonat (**8**), *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**), (S)- und (R)-5-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerat (**10**).
- Darstellung der weiteren unchlorierten Metabolite des *meta*-Weges nach bereits bekannten Methoden: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**), 2-Hydroxymuconsäure (**2**), 4-Oxalocrotonat (**3**), Vinylpyruvat (**4**).
- Charakterisierung der beim Umsatz von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg in *Pseudomonas putida* GJ31 auftretenden Metabolite sowie Position und Mechanismus der Chlor-Eliminierung.
- Bestimmung der Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der in *Pseudomonas putida* GJ31 am *meta*-Weg beteiligten Enzyme für die Metabolite des Catechol- und 4-Chlorcatecholabbaus.
- Vergleich dieser Ergebnisse mit den Aktivitäten und Substrataffinitäten der Enzyme aus *Pseudomonas putida* PaW1 für die Metabolite des 4-Chlorcatecholabbaus. Dieser Stamm ist nicht in der Lage, 4-Chlorcatechol zu verwerten.
- Bestimmung der Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der Enzyme des 4-Chlorcatechol abbauenden *Pseudomonas putida* WR311 für die im *meta*-Weg auftretenden chlorierten Metabolite. Vergleich mit den für *Pseudomonas putida* GJ31 und PaW1 erhaltenen Daten.

- Beurteilung des beim Abbau von Catechol bzw. 4-Chlorcatechol in den untersuchten Organismen auftretenden Stoffflusses:
 - Wo treten Engstellen auf, die zu einer Metabolitenakkumulation führen?
 - Wird der hydrolytische oder dehydrogenolytische *meta*-Weges bevorzugt?
 - Warum ist *Pseudomonas putida* PaW1 nicht in der Lage, 4-Chlorcatechol zu metabolisieren?

2. Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Organismen

Die bei der Anfertigung der Arbeit verwendeten Organismen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tab. 2.1: Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen.

Organismus	Beschreibung/Eigenschaften ^a	Referenz/Herkunft
<i>Pseudomonas putida</i> GJ31	Ben ⁺ , Tol ⁺ , CB ⁺ , 3CBA ⁻	OLDENHUIS et al. (1989), MARS et al. (1997)
<i>Pseudomonas putida</i> WR311	CB ⁺ , 3CBA ⁺ , 4CBA ⁺ , Tol ⁺ , Xyl ⁺ , 3CT ⁺ , 4CT ⁻ , Nic ⁻	REINEKE, pers. Mitteil.
<i>Pseudomonas putida</i> PaW1	BA ⁺ , 3MBA ⁺ , 4MBA ⁺ , CB ⁻ , Nic ⁺	MURRAY et al. (1972) NAKAZAWA (2002)
<i>Escherichia coli</i> JM109 (pU2-36)	CbzE (CC230)-Expressionsstamm	SCHMIDT, pers. Mitteil.
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue (pXPG)	CbzG (HMSD)-Expressionsstamm	KUNZE (2002)

^aFür die Pseudomonaden sind die Eigenschaften aufgeführt, die für die Beschreibung des Abbauverhaltens aromatischer Verbindungen von Wichtigkeit sind. Es wurden die folgenden Abkürzungen für die Wachstums-substrate verwendet: Ben - Benzol, CB - Chlorbenzol; BA - Benzoat; 3MBA - 3-Methylbenzoat, 4MBA - 4-Methylbenzoat, 3CBA - 3-Chlorbenzoat; 4CBA - 4-Chlorbenzoat; Tol - Toluol, 3CT - 3-Chlortoluol; 4CT - 4-Chlortoluol; Xyl - *m*-Xylol; Nic - Nicotinat

2.2 Medien

Die verwendeten Organismen wurden auf unterschiedlichen Medien kultiviert. Die Anzucht der Stämme erfolgte sowohl in flüssigen Nährlösungen als auch auf festen Medien, wobei letztere zusätzlich zur Nährlösung 1,5 % (w/v) Agar enthielten.

Alle eingesetzten Puffer, Lösungen und Medien wurden vor der Anwendung autoklaviert. Nicht hitzebeständige Chemikalien wurden sterilfiltriert (Sartorius Membranfilter, 0,2 µm Porendurchmesser) und dem autoklavierten Medium oder Puffer nach dem Abkühlen zugesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurde zweifach destilliertes Wasser verwendet. Glasgeräte wurden 4 h bei

180 °C hitzesterilisiert. Soweit nicht anders vermerkt, beziehen sich alle prozentualen Angaben bei Feststoffen auf Gewichtsprozente (w/v), bei Flüssigkeiten auf Volumenprozente (v/v).

2.2.1 Medien für *Escherichia coli*

LB-Medium (MILLER, 1972)

10,0 g Pepton aus Casein
10,0 g NaCl
5,0 g Hefeextrakt
ad 1000ml bidest. H₂O

LB-Agar (MILLER, 1972)

LB-Medium
Agar 16 g/l

Für die Anzucht der *Escherichia coli*-Überexpressionsstämme wurde den Medien Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugefügt.

2.2.2 Medien für *Pseudomonas putida*

Die Anzucht der *Pseudomonas putida*-Stämme erfolgte ausschließlich in flüssigem Mineralmedium. Grundlage hierfür ist die von DORN et al. (1974) angegebene chloridfreie und phosphatgepufferte Minerallösung, bei der zur besseren pH-Stabilisierung die Pufferkonzentration verdoppelt wurde (HARTMANN et al., 1979).

7,0 g NaHPO₄ · 2 H₂O
2,0 g KH₂PO₄
0,05 g Ca(NO₃)₂
0,1 g Fe(III)ammoniumnitrat · 7 H₂O
0,2 g MgSO₄ · 7 H₂O
1,0 g (NH₄)₂SO₄
1,0 ml Spurenelementlösung nach PFENNIG & LIPPERT (1966) ohne EDTA und FeSO₄
ad 1000 ml bidest. H₂O

Als Energie- und Kohlenstoffquelle fanden die jeweils angegebenen Substrate in einer Konzentration von 10 mM Verwendung. Flüchtige Substrate wie Chlorbenzol wurden über die Gasphase zugeführt.

2.3 Kulturbedingungen und Lagerung von Bakterien

2.3.1 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung der *Escherichia coli*-Expressionsstämme erfolgte in LB-Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten bei 37 °C unter Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml) und Rhamnose (2 mg/ml) als Induktor. Für die Substratumsetzungen wurden 500 ml Medium in 3000 ml Schikanenkolben mit 20 ml-Vorkulturen angeimpft.

Die Aufbewahrung der Stämme erfolgte bei 4 °C auf LB-Agarplatten. Die Kulturen wurden alle 6 - 8 Wochen überimpft. Dauerkulturen wurden aus Übernachtskulturen durch Zugabe von 50 % Glycerin hergestellt und bei -70 °C aufbewahrt. Als Übernachtskulturen werden Ansätze bezeichnet, die zwischen 16 und 20 Stunden kultiviert worden sind.

2.3.2 Anzucht und Lagerung von *Pseudomonas putida*

Alle Kulturen wurden bei 31 °C auf einem Rotationsschüttler (Typ RC 106, Infors AG, Basel/Schweiz bzw. Gyrotory water bath shaker Typ G 76, New Brunswick, N.J./USA) bei etwa 100 Upm in Mineralmedium inkubiert. Bei der Anzucht von *Pseudomonas putida* WR311 diente 4-Chlorbenzoat als Kohlenstoffquelle, bei *Pseudomonas putida* PaW1 fand 3-Methylbenzoat Verwendung.

Pseudomonas putida GJ31-Kulturen wurden mit Chlorbenzol als Nährstoffquelle kultiviert.

Die für die Herstellung von Rohextrakten benötigten größeren Zellmengen wurden in 3000 ml Schikanenkolben mit 500 ml Medium gewonnen. Diese wurden mit 20 ml-Übernachtskulturen, gewachsen auf LB-Medium, angeimpft.

Dauerkulturen wurden aus Kulturen, die sich kurz vor dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase befanden, durch Zugabe von 50 % Glycerin hergestellt und bei -70 °C aufbewahrt.

2.4 Trübungsmessung

Die optische Dichte der Zellsuspensionen wurde durch Extinktionsmessungen bei 546 nm und einer Schichtdicke von 1 cm in einem Spektralphotometer (Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer, Varian, Australien) ermittelt. Zum Nullabgleich diente das jeweilige frisch angesetzte Nährmedium.

Sobald die Extinktion den Wert von 0,3 überschritt, wurde die Probe entsprechend verdünnt.

2.5 Zellernte und Herstellung von zellfreien Proteinextrakten

Kulturen, die sich kurz vor dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden in einer Kühlzentrifuge (Sigma Laboratory Centrifuge 4K15C) bei einer Temperatur von 4 °C zwanzig Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert. Bei größeren Kulturvolumina wurde dieser erste Zentrifugationsschritt mittels einer Sorvall RC Refrigerated Superspeed Centrifuge RC5B (Du Pont, Bad Nauheim) durchgeführt. Nach zweimaliger Wäsche der Zellrückstände mit Tris/HCl-Puffer (100 mM, pH 7,5 + 0,5 mM Dithioerythrit) oder Na-K-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,5 + 0,5 mM Dithioerythrit) erfolgte Resuspension im gleichen Puffer.

Die resuspendierten Zellen wurden nach Zugabe von Desoxyribonuklease mit einer auf 4 °C vorgekühlten French-Press (Amicon Inc., Beverly MA/USA) bei einem Druck von 14 MPa aufgeschlossen. Noch verbliebene ganze Zellen und Zelltrümmer wurden anschließend in einer Ultrazentrifuge (Sorvall OTD-50B, Du Pont, Bad Nauheim) bei 105 g (60 min, 4 °C) abzentrifugiert. Die Sedimente wurden verworfen, die Überstände abpipettiert und für enzymatische Untersuchungen verwendet. Sie werden im weiteren als Rohextrakte bezeichnet. Es wurden ausschließlich frisch hergestellte Rohextrakte verwendet, die aus Zellkulturen gewonnen wurden, die auf den in Tabelle 2.2 angegebenen Substraten gewachsen waren.

Die folgende Tabelle fasst für jeden eingesetzten Organismus die Wachstums- und Erntebedingungen zusammen.

Tab. 2.2: Optische Dichten der Zellkulturen bei der Zellernte.

Organismus	Substrat/Medien-Zusätze ^a	OD
<i>Pseudomonas putida</i> GJ31	Chlorbenzol	2,3-2,8
<i>Pseudomonas putida</i> PaW1	3-Methylbenzoat	3,7-4,0
<i>Pseudomonas putida</i> WR311	4-Chlorbenzoat	1,4-1,6
<i>Escherichia coli</i> JM109 (CbzE-Expr.)	Ampicillin, Rhamnose	5,0-6,0
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue (CbzG-Expr.)	Ampicillin, Rhamnose	5,0-6,0

^aDie *P. putida*-Stämme wurden auf Minimalmedium angezogen, hier ist das jeweils ausschließlich verwendete Substrat angegeben; für die auf LB-Komplettmedium angezogenen *E. coli*-Stämme ist das eingesetzte Antibiotikum sowie der Expressions-Induktor aufgeführt.

2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Proteinbestimmungs-Kits (BioRad, München) nach der Methode von BRADFORD (1976) spektralphotometrisch bestimmt. Als Referenzsubstanz diente Rinderserumalbumin (BSA).

2.7 Bestimmungen von Enzymaktivitäten

Die Berechnung der spezifischen Enzym-Aktivitäten erfolgte nach der Gleichung:

$$A = \frac{\Delta E / \text{min} \cdot V_1 \cdot 1000}{\epsilon_M \cdot d \cdot V_2 \cdot c_p} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}} = \frac{\text{U}}{\text{mg}} \right]$$

A = spezifische Enzymaktivität	d = Schichtdicke der Küvette [cm]
$\Delta E / \text{min}$ = Extinktionsänderung [min^{-1}]	V2 = Volumen des eingesetzten Rohextrakts [μl]
V ₁ = Volumen des Testansatzes [μl]	c _p = Proteinkonzentration des eingesetzten Rohextrakts
ϵ_M = molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	[$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]

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

Die Messung der Enzymaktivitäten erfolgte in 1 cm Quarz- oder Kunststoffküvetten mit einem Spektralphotometer (Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer, Varian, Australien).

Bei den im folgenden aufgeführten Enzymtests handelt es sich in der Regel um Variationen der in den Literaturstellen angegebenen Vorschriften. Die Mengen der evtl. zugegebenen Cofaktoren und Mineralien wurden anhand von Messungen mit *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakten optimiert. Für Enzyme, die einer Substratinhibierung unterliegen, ist für jedes untersuchte Substrat jeweils die Konzentration angegeben, bei der unter den beschriebenen Bedingungen die höchste Aktivität festgestellt werden konnte. Sofern das angegebene Substrat nicht im Handel zu erwerben ist, wird die Herstellung der Substratlösung im experimentellen Teil beschrieben. Nach Möglichkeit wurden alle eingesetzten Lösungen in dem gleichen Puffer angesetzt.

Die folgende Tabelle fasst die eingesetzten Substrate und die zugehörigen Extinktionskoeffizienten zusammen.

Tab. 2.3: Bei den Enzymtests eingesetzte Substrate mit ihren molaren Extinktionskoeffizienten bei der im Test verwendeten Wellenlänge.

Substrat	λ_{\max} [nm]	ϵ_M [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Referenz
2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (1)	375	36.000 (pH 7,5)	SALAT-TREPAT et al. (1972)
5-Chlor-2-hydroxymuconäuresemialdehyd (6)	379	39.600 (pH 7,4)	SALA-TREPAT & EVANS (1971)
2-Hydroxymuconsäure (2)	290	12.500 (pH 7,5)	KASCHABEK et al. (1998)
5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (7)	307	12.650 (pH 7,5)	diese Arbeit
2-Oxo-3-hexendisäure/ 4-Oxalocrotonat (3)	350	s. Enzymtest (pH 14)	
5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure/ 2-Chlor-4-oxalocrotonat (8)	350	s. Enzymtest (pH 14)	
Vinylpyruvat (4)	265	19.200 (pH 5) ^a	POLLARD & BUGG (1998)
<i>cis</i> -Chlorvinylpyruvat (9)	278	19.600 (MeOH)	diese Arbeit
<i>trans</i> -Chlorvinylpyruvat (9)	278	21.500 (MeOH)	diese Arbeit
4-(S)-/4-(R)-Hydroxy-2-oxovalerat (5)	340 (NADH)	6.300	BERGMEYER (1978)
Acetaldehyd/Chloracetaldehyd	340 (NADH)	6.300	BERGMEYER (1978)

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die ϵ_M bei den angegebenen pH-Werten in wässrigen Pufferlösungen bestimmt.
^aFür den Extinktionskoeffizienten wird ein breites pH-Spektrum angegeben.

2.7.1 Catechol-2,3-Dioxygenase, C23O (*meta*-Pyrocatechase)

Catechol-2,3-Dioxygenase setzt das Substrat Catechol zu 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**) um. Im Enzymtest wird Bildung dieses Produkts bzw. des chlorierten Analogons anhand der Extinktionszunahme beim jeweiligen Absorptionsmaximum verfolgt. Die Testansätze enthielten nach SALA-TREPAT & EVANS (1971) in einem Volumen von 1 ml:

0,1 mmol Tris/HCl-Puffer (100 mM, pH 7,5)
 0,5 μ mol Catechol oder 4-Chlorcatechol
 0,5 - 2,0 μ g Protein

2.7.2 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, HMSD

Die Aktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase kann im Rohextrakt aufgrund der durch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase katalysierten Parallelreaktion nur indirekt bestimmt werden:

Zunächst wird die NAD^+ -abhängige Abnahme des gelben Ringöffnungsprodukts ermittelt und eine Gesamtaktivität für beide Enzyme berechnet. Um die Aktivität der Dehydrogenase zu erhalten, wird von diesem Wert die Hydrolaseaktivität, gemessen bei der gleichen Substratkonzentration (siehe 2.7.3), abgezogen.

Der Reaktionsansatz enthielt nach MARS et al. (1997) in 1 ml:

0,1 mmol Na-K-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,5)
 0,1 μ mol NAD^+
 60 nmol 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**)
 bzw. 25 μ mol 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**)
 50 - 100 μ g Protein

2.7.3 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, HMSH

Die Hydrolaseaktivität wurde durch Bestimmung der NAD^+ -unabhängigen Konzentrationsabnahme des gelben Ringspaltungsprodukts von Catechol und 4-Chlorcatechol ermittelt. Um einen NAD^+ -freien Rohextrakt zu erhalten, wurden 2 ml frisch hergestellter zellfreier Extrakt

mit 0,5 U NADase für 0,25 h auf 37 °C erwärmt. Diese Behandlung wurde bis zur Konstanz der Enzymaktivität wiederholt.

Die Testansätze enthielten nach MARS et al. (1997) in einem Volumen von 1 ml:

0,1 mmol Na-K-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,5)
30 nmol 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**)
bzw. 40 µmol 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**)
20 - 100 µg Protein

Das 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**) wurde analog der chlorierten Verbindung hergestellt (siehe 3.2.1.2). Diese Lösung wurde jedoch immer frisch hergestellt.

2.7.4 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, OT

In einer Quarzküvette wurden Puffer und Substrat vorgelegt, der Abfall der Extinktion durch spontane Tautomerisation beobachtet bis er linear verlief und die Steigung bestimmt. Nach Zugabe des Rohextrakts wurde der anfängliche lineare Extinktionsabfall bestimmt, und hiervon der für die spontane Reaktion ermittelte Wert abgezogen. Aus dieser Differenz konnte die Enzymaktivität berechnet werden. Die Substratkonzentration wurde aus der Extinktion kurz vor Zugabe des Rohextrakts berechnet. In Abhängigkeit des zu vermessenden Substrats wurden unterschiedliche Proteinmengen eingesetzt.

Die Testansätze enthielten in einem Volumen von 1 ml nach SALA-TREPAT & EVANS (1971):

0,1 mmol Na-K-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,5)
150 nmol 2-Hydroxymuconsäure (**2**), gelöst in Ethanol
5 - 10 µg Protein (Substrat: 2-Hydroxymuconsäure (**2**))
bzw. 50 - 100 µg Protein (Substrat: 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**))

Um den Umsatz von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) zu vermessen, wurden Puffer, 0,15 µmol 5-Chlormuconsäuresemialdehyd (**6**) und 0,5 µmol NAD⁺ vorgelegt. Nach Zugabe von Rohextrakt des CbzE-Expressionsstammes im großen Überschuß (ca. 400 µg Protein) wurde der Extinktionsverlauf bei 307 nm spektralphotometrisch verfolgt. Nach Durchlaufen des Maximums und Erreichen eines linearen Abfalls wurde wie oben beschrieben weiter verfahren.

2.7.5 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, OD

Die Aktivität der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase wurde nach SALA-TREPAT & EVANS (1971) und HARAYAMA et al. (1984) bestimmt, indem von einer Reaktionslösung in regelmäßigen Zeitintervallen (10 bis 15 Sek.) Proben von 500 µl in eine Stopplösung gleichen Volumens aliquotiert wurden. In der stark alkalischen Stopplösung konnte nicht umgesetztes Edukt bei einer Wellenlänge von 350 nm photometrisch bestimmt werden. Zur Bestimmung der Konzentration an noch vorhandenem Substrat wurde zunächst eine Eichgerade aufgenommen: 10 µl 10 N Natronlauge und verschiedene Volumina der 10 mM Gleichgewichts-Substratlösung (2 bis 50 µl) wurden mit Na-K-Phosphatpuffer (pH 7,5) auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und die Extinktion ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$) bestimmt.

Eine Auftragung der somit im Enzymtest (unter Beachtung der Verdünnung durch die Stopplösung) ermittelten Konzentrationen gegen die Zeit lieferte eine Gerade mit der Steigung $\frac{\Delta c}{\text{min}}$. Hieraus liess sich die Enzymaktivität berechnen.

Die Reaktionslösung enthielt in einem Volumen von 3 ml:

280 µmol Tris/HCl-Puffer (100 mM, pH 7,5)
 20 µmol MgSO₄
 75 nmol 4-Oxalocrotonat (**3**) oder 2-Chlor-4-oxalocrotonat (**8**, Gleichgewichtslösung)
 10 - 50 µg Protein

Die Stopplösung enthielt in einem Volumen von 500 µl:

150 µmol NaOH
 8 µmol EDTA

2.7.6 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase, OEH

In 1 ml Gesamtvolumen wurden nach COLLINSWORTH et al. (1973) Phosphatpuffer, MnCl₂ und Substrat in einer Quarzküvette vorgelegt, die Extinktionsänderung bis zur Linearität verfolgt und deren Steigung bestimmt. Die Rate der verstärkten Extinktionsabnahme infolge der Zugabe von Rohextrakt wurde ebenfalls bestimmt. Aus der Differenz der beiden Werte wurde die

Enzymaktivität errechnet. Die Substratkonzentration konnte aus der Extinktion kurz vor Zugabe des Rohextrakts berechnet werden.

Die Testansätze enthielten in einem Volumen von 1 ml:

85 nmol	Na-K-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,5)
1,5 µmol	MnCl ₂
0,2 - 0,3 µmol	Vinylpyruvat (4)
bzw. 50 - 100 nmol	<i>cis-/trans</i> -Chlorvinylpyruvat (9)
10 - 50 µg	Protein

2.7.7 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase, HOA

Aufgrund der fehlenden UV-Aktivität des 4-Hydroxy-2-oxoalerats konnte die Aktivität der Aldolase nur durch einen gekoppelten Enzymtest bestimmt werden. Hierbei wurde das Reaktionsprodukt Pyruvat durch einen Überschuss Lactat-Dehydrogenase zu Milchsäure reduziert, wobei die Oxidation des Cofaktors NADH bei 340 nm spektralphotometrisch verfolgt werden konnte. Damit die Nachweisreaktion keinen Einfluss auf das Messergebnis hatte, musste die Lactat-Dehydrogenase in einem großen Überschuss vorliegen.

1 ml des Reaktionsansatzes enthielt SALA-TREPAT & EVANS (1971) und SHINGLER et al. (1992):

85 nmol	Tris/HCl-Puffer (100 mM, pH 7,5)
1,5 µmol	MnCl ₂
40 U	LDH
25 µmol	NADH
2 µmol	4-Hydroxy-2-oxoalerat (5)
10 - 20 ng	Protein

Der Test wird durch Zugabe des Substrats gestartet. Zuvor wird die Rate der NADH-Oxidation bestimmt und von dem später ermittelten Wert als Blindwert abgezogen.

1 Unit ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µmol NADH in Anwesenheit von überschüssiger Lactat-Dehydrogenase pro Minute reduziert.

2.7.8 Acetaldehyd-Dehydrogenase, ADA

Die Coenzym A-abhängige Acetaldehyd Dehydrogenase oxidiert das Substrat zur Carbonsäure und liefert als Reaktionsprodukt den CoA-Ester. In dem Enzymtest wird die Reduktion des Cofaktors NAD^+ bei 340 nm spektralphotometrisch verfolgt. Eine CoA-unabhängige Rate der NAD^+ -Reduktion wird bestimmt und nach Start des Enzymtests durch Zugabe von Coenzym A von der Steigung der linearen Extinktionsänderung abgezogen.

1 Unit ist definiert als die Menge Enzym, die 1 μmol NAD^+ in Anwesenheit von Coenzym A pro Minute reduziert.

Die Testansätze enthielten nach POWLOWSKI et al. (1993) in einem Volumen von 1 ml:

0,1 mmol	Na-K-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,5)
1 μmol	NAD^+
50 nmol	Acetaldehyd oder Chloracetaldehyd
0,1 μmol	Coenzym A
50 - 100 μg	Protein

Um die Aktivität der CoA-unabhängigen Acetaldehyd Dehydrogenase zu bestimmen, wurde im Testansatz auf Coenzym A verzichtet und der Test durch Zugabe des Substrats gestartet.

2.8 Bestimmung der maximalen Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten

Für jedes Enzym wurden die Aktivitäten bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt und die Werte graphisch gegeneinander aufgetragen. Hierbei wurden die in Abbildung 2.1 exemplarisch dargestellten Kurvenverläufe erhalten. Zur Bestimmung der maximalen Enzymaktivitäten A_{max} und Substrataffinitäten $[\text{S}]_{1/2}$ erfolgte eine zweite Auftragung nach HANES & WOOLF (1932): Die Auftragung des Quotienten aus Substratkonzentration und Aktivität gegen die Substratkonzentration liefert eine Gerade, aus deren Steigung und Achsenabschnitt die Werte für A_{max} und $[\text{S}]_{1/2}$ berechnet werden können. Diese Auswertung nach Hanes & Woolf ließ sich jedoch nicht für alle Ergebnisse der Enzymtests durchführen: In einigen Fällen ergab die Auftragung der Messwerte keinen eindeutigen Geradenverlauf, in anderen wichen die aus

Steigung und Achsenabschnitt berechneten Werte sehr stark von dem Kurvenverlauf der Auftragung von Enzymaktivität gegen Substratkonzentration ab.

War eine Berechnung der maximalen Enzymaktivität und Substrataffinität nach Hanes & Woolf nicht möglich, erfolgte die graphische Auswertung des Enzymaktivitäts-Substratkonzentrations-Diagramms: Wie in Abbildung 2.1 A dargestellt, wurde der Mittelwert der im Test höchsten spezifischen Aktivitäten als A_{\max} angenommen. Wurde für ein Enzym eine Substratinhibierung festgestellt, so wurde die höchste gemessene Aktivität als A_{\max} festgehalten (Abb. 2.1 B). Die Bestimmung von $[S]_{1/2}$ als die Substratkonzentration, bei der die halbe maximale Enzymaktivität erreicht wird, erfolgte graphisch aus der Auftragung.

Sofern nicht anders erwähnt, handelt es sich bei denen in dieser Arbeit angegebene Werten für A_{\max} und $[S]_{1/2}$ um die durch graphische Auswertung erhaltene Daten.

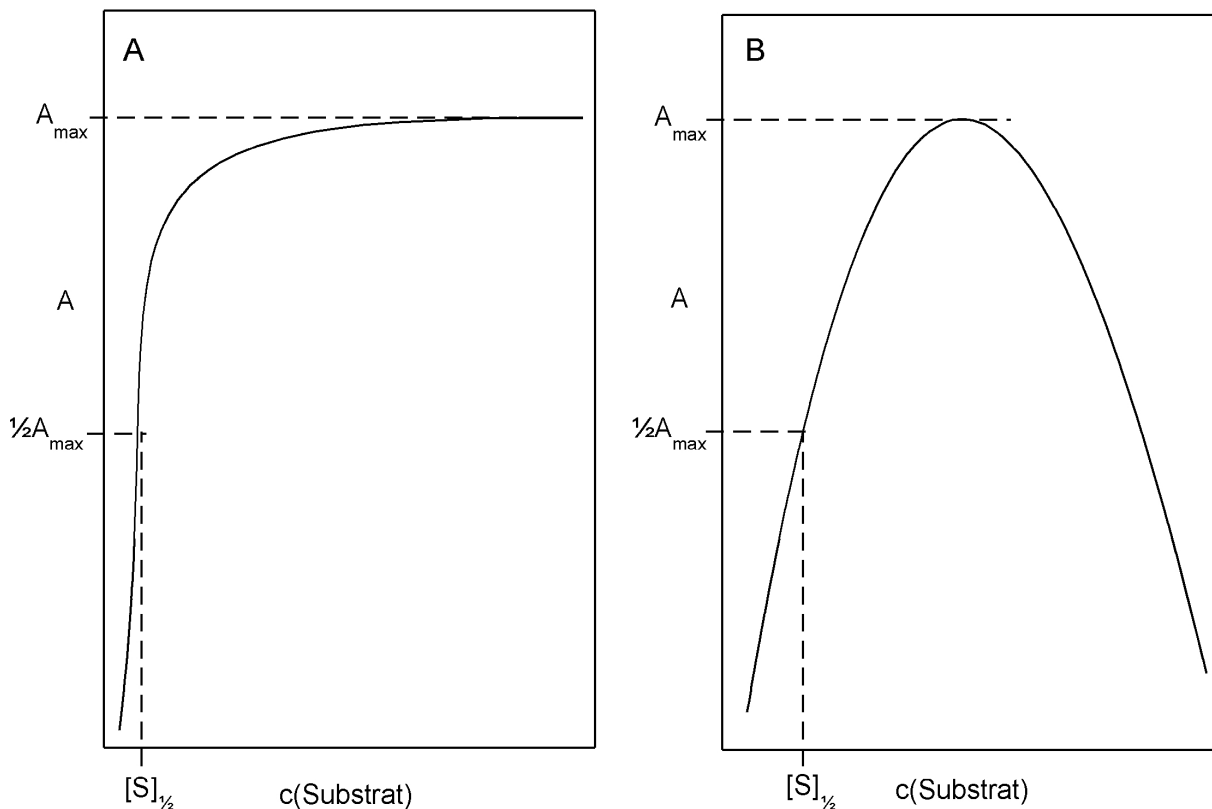


Abb. 2.1: Graphische Bestimmung der maximalen Enzymaktivität A_{\max} und Substrataffinität $[S]_{1/2}$ im Enzymaktivitäts-Substratkonzentrations-Diagramm.

Die in Kapitel 4.4 bei der Diskussion des Stoffflusses angegebenen Enzymaktivitäten wurden nach dem selben Prinzip ermittelt. In dem Enzymaktivitäts-Substratkonzentrations-Diagramm jedes Enzyms wurden für verschiedene Substratkonzentrationen die Enzymaktivitäten graphisch bestimmt.

2.9 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographien wurden jeweils bei 4 °C mit Hilfe einer FPLC-Anlage der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala/Schweden) durchgeführt, die aus folgenden Komponenten bestand:

2 Pumpen:	Präzisions-Kolbenpumpe P-500
Controller:	Liquid Chromatographie-Controller LCC-500 Plus
Injektor:	Injektions-Motorventil MV-7
Fraktionssammler:	Frac-100

1. Säulenmaterial: Q-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden)

- Säule: Ø 1,6 cm, Länge 13 cm
- Flußrate: 4 ml/min
- Fraktionen á 8 ml
- Eluent: A - Na-K-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,5)
 B - Na-K-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,5, 1,2 M KCl)
- Programm: 0 - 80 ml 100 % A
 80 -160 ml linearer Gradient bis 90 % B
 160 - 200 ml 90 % B
 200 - 300 ml 100 % A

2. Säulenmaterial: Dowex 50WX12 (50 - 100 mesh, H⁺) (Fluka)

- Säule: Ø 1,6 cm, Länge 13 cm
- Flussrate: 4 ml/min
- Fraktionen á 5 ml
- Programm: 0 - 150 ml H₂O
 150 - 300 ml 1 N NH₃
 300 - 400 ml H₂O

2.10 Cellulose-Säulenchromatographie

Die Trennung der 2-Amino-4-hydroxypentansäure-Diastereomere wurde an einer Cellulosesäule (Fibrous medium, Sigma-Aldrich (Taufkirchen); Ø 2,6 cm × 90 cm) durchgeführt. Als Laufmittel wurde ein n-BuOH/Aceton/NH₃ (5 %)/Wasser-Gemisch (10:10:5:2) verwendet. Um eine

konstante Flussgeschwindigkeit von 0,9 ml/min zu erreichen, kam eine peristaltische Pumpe (2115 Multiplex Pump, LKB Bromma) zum Einsatz. Nach einem Vorlauf von 300 ml wurden mittels eines Fraktionssammlers (Frac-100, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala/Schweden) Fraktionen von 15 ml aufgefangen.

2.11 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Untersuchungen wurden an einem computergesteuerten System der Firma Dionex (Idstein) durchgeführt. Die Anlage setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Pumpe:	P580 Pump
Autosampler:	ASI-100 Automated Sample Injector
Detektor:	UVD 340S
Software:	Chromeleon 6.40
Säule:	LiChrospher 100Å RP 18 (Ø 4 mm, 12,5 cm; Fa. Knauer, Berlin)

Als Laufmittel kamen ausschließlich Methanol/Wasser-Gemische mit 1 g/l H₃PO₄ zum Einsatz. Die Detektion erfolgte standardmäßig bei 240 nm.

2.12 Festphasenextraktion

Zur Isolierung geringer Substanzmengen aus wässrigen Lösungen wurden Festphasenextraktionssäulen der Firma IST International Sorbent Technology (Mid-Glamorgan, Großbritannien) mit dem Säulenmaterial ENV+ verwendet. Diese wurden jeweils mit einem Reaktionsvolumen 0,01 N Salzsäure vorkonditioniert. Die Flussgeschwindigkeit der Probenaufnahme wurde durch Unterdruck auf ca. 2 ml/min eingestellt. Vor der Elution wurde mit einem Reaktionsvolumen Hexan gewaschen und 5 Minuten im Luftstrom getrocknet.

Die im experimentellen Teil bei der Erwähnung einer Festphasenextraktion angegebenen Mengen geben die Größe der verwendeten SPE-Säulen an.

2.13 NMR-Spektroskopie

Die ^1H - und ^{13}C -Spektren wurden an einem 400 MHz-Gerät (AC 400) der Firma Bruker, USA aufgenommen. Die Meßfrequenz betrug bei den ^1H -NMR-Spektren 400,13 MHz und bei den ^{13}C -Spektren 100,63 MHz. Die Proben wurden in CDCl_3 , d_6 -Aceton, d_4 -Methanol oder D_2O gelöst. Als interner Standard für die ^1H - und ^{13}C -Spektroskopie diente Tetramethylsilan.

2.14 Massenspektrometrie

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Massenspektren mit einem Varian MAT 311 Massenspektrometer mit 70 eV Ionisierungsenergie aufgenommen.

Die Aufnahme der CI-Spektren erfolgte auf einem Finnigan MAT 8200 mit Isobutan als Reaktand-Gas.

2.15 Elementaranalyse

Elementaranalysen wurden an einem Elementar Vario EL Kohlenstoff-, Wasserstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Analysator durchgeführt.

2.16 pH-Bestimmung

Die H_3O^+ -Ionenkonzentration wurde mit einer Mikro-pH-Einstabmesspipette (80 mm Länge, 6 mm Durchmesser, Ingold, Steinbach) bestimmt.

2.17 Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunktbestimmungsgerät nach Dr. Tottoli (Firma Büchi/Schweiz) bestimmt. Die Aufheizgeschwindigkeit betrug 1 °C/min und die angegebenen Werte wurden nicht korrigiert.

2.18 Chemikalien und Enzyme

In dieser Arbeit fanden Chemikalien und Enzyme der unten aufgeführten Firmen Verwendung:

Chemikalien:

Chemikalien, p.a. Qualität	Fluka (Buchs/Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Acros Organics (Geel/Belgien)
Medienbestandteile	Difco (Detroit/USA), Gibco (Paisley/Großbritannien), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe)

Enzyme:

D-Amino Acid Oxidase,	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
L-Amino Acid Oxidase,	
Catalase, DNase, NADase,	
Lactat-Dehydrogenase	

3. Experimente und Ergebnisse

Dieses Kapitel gliedert sich in vier Teilbereiche. Zunächst erfolgt die Darstellung der chemischen Synthese der Metabolite des 4-Chlorcatecholabbaus bzw. deren Derivate. Anschließend wird die Charakterisierung der Metabolite und die enzymatischen Untersuchungen beschrieben. Es folgt die Untersuchung der Wachstumsphysiologie des 4-Chlorbenzoat-Verwerters *Pseudomonas putida* WR311.

Um eine einheitliche Nomenklatur zu gebrauchen, werden die in der Enzymologie gängigen Trivialnamen der Substrate verwendet. Die folgende Tabelle stellt für die betroffenen Verbindungen Trivial- und IUPAC-Bezeichnung gegenüber (Die Nummerierung der zu den NMR-Daten angegebenen Strukturen entspricht nicht unbedingt der für die Nomenklatur angewandten Zählweise).

Tab. 3.1: In dieser Arbeit verwendeter Trivialnamen und IUPAC-Nomenklatur.

Trivialname	IUPAC-Bezeichnung
(4-Chlor)Brenzcatechin, (4-Chlor)Catechol	(4-Chlor)-1,2-Dihydroxybenzen
(5-Chlor-)2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (6/1)	(5-Chlor-)2-Hydroxy-6-oxohexa-2,4-diensäure
(5-Chlor-)2-Hydroxymuconsäure (7/2)	(5-Chlor-)2-Hydroxyhexa-2,4-diendisäure
(2-Chlor-)4-Oxalocrotonat (8/3)	(5-Chlor-)2-Oxo-4-hexendisäure
<i>cis-/trans</i> -(Chlor)Vinylpyruvat (9/4)	<i>cis-/trans</i> -(5-Chlor-)2-Oxo-4-pentensäure bzw. <i>cis-/trans</i> -(5-Chlor-)2-Hydroxy-2,4-pentadiensäure
(5-Chlor-)4-Hydroxy-2-oxoalerat (10/5)	(5-Chlor-)4-Hydroxy-2-oxopentensäure
4/5-Chlorpicolinsäure (21/20)	4/5-Chlorpyridin-2-carbonsäure

3.1 Chemische Synthesen der Metabolite des Catechol- und 4-Chlorcatecholabbaus bzw. deren Derivate

Alle synthetisierten Verbindungen wurden - soweit es möglich war - durch kernresonanzspektroskopische und massenspektrometrische Analysen sowie die Bestimmung von Schmelz- bzw. Siedepunkten charakterisiert. Die angegebene Struktur wurde bei Übereinstimmung mit vorliegenden Literaturwerten als bewiesen und die Reinheit der Verbindung als ausreichend angesehen. Sind die Analysendaten nicht mit einem Literaturhinweis versehen, so finden sich die Werte in den bei der Synthesebeschreibung zitierten Veröffentlichungen.

War ein Vergleich mit vorhandenen Daten nicht möglich, wurde zur Bestimmung der Reinheit und Zusammensetzung eine Elementaranalyse durchgeführt.

3.1.1 Synthese von 2-Hydroxymuconsäure

Die chemische Synthese von 2-Hydroxymuconsäure (**2**) gelang über zwei unterschiedliche Reaktionswege. In einer dreistufigen Synthese wurde zunächst nach einer modifizierten Vorschrift von GILHEANY et al. (1999) 3-Methoxycatechol mit Bleitetraacetat zu 2-Methoxymuconsäuredimethylester (**11**) umgesetzt. Durch alkalische Hydrolyse wurde hieraus die freie Dicarbonsäure (**12**) gewonnen. Im letzten Schritt konnte die Methoxy-Funktion in stark saurem Medium zur OH-Gruppe demethyliert werden.

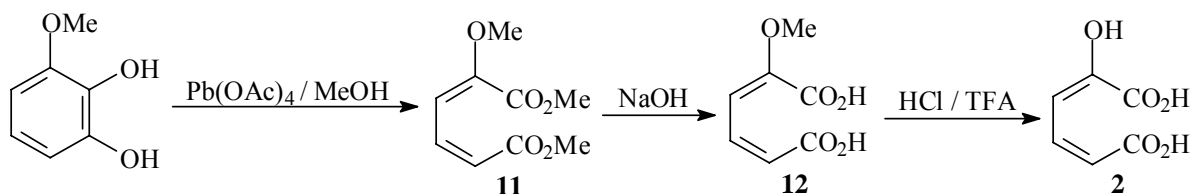


Abb. 3.1: Synthese von 2-Hydroxymuconsäure (**2**) ausgehend von 3-Methoxycatechol.

Die alternative Synthese (PRAGER, 1905) ging von Crotonsäureethylester aus, welcher in deprotonierter Form mit Oxalsäurediethylester zum Natriumsalz des 2-Hydroxymuconsäurediethylesters (**13**) umgesetzt werden konnte. Durch Hydrolyse, die nach einer Vorschrift von MAJOR & BOESE (1934) mit 30%iger Natriumhydroxidlösung durchgeführt wurde, konnte die freie 2-Hydroxymuconsäure (**2**) in unbefriedigender Ausbeute erhalten werden.

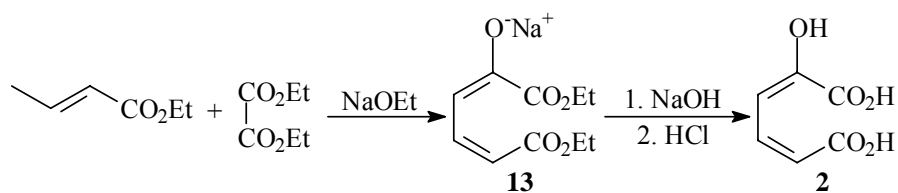
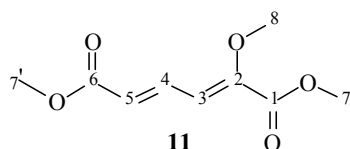


Abb. 3.2: Synthese von 2-Hydroxymuconsäure (2) ausgehend von Crotonsäureethylester und Oxalsäurediethylester.

3.1.1.1 2-Methoxymuconsäuredimethylester

44,3 g (0,1 mol) frisch aus Eisessig/Essigsäureanhydrid umkristallisiertes und getrocknetes Bleitetraacetat wurden in 500 ml einer Mischung aus abs. Toluol und Methanol (1:1) gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Innerhalb von 2 Stunden wurden 7,0 g (0,05 mol) 3-Methoxycatechol in 200 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches zugetropft und für 15 Stunden bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wurde einrotiert, der Rückstand mit 100 ml CHCl_3 versetzt und filtriert. Das Filtrat wurde viermal mit jeweils 100 ml H_2O gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Es folgte Umkondensation im Hochvakuum und Umkristallisation aus Wasser/Methanol.



Ausbeute: 5,2 g (52 %) farbloser Feststoff

Smp.: 48-49 °C

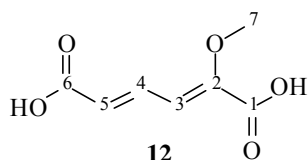
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 7,49 (dd, 1 H (H-4), $^3\text{J}(\text{H,H}) = 11,19 \text{ Hz}$, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 11,70 \text{ Hz}$); 7,33 (d, 1 H (H-3), $^3\text{J}(\text{H,H}) = 11,70 \text{ Hz}$); 5,67 (dd, 1 H (H-5), $^3\text{J}(\text{H,H}) = 11,19 \text{ Hz}$, $^4\text{J}(\text{H,H}) = 1,02 \text{ Hz}$); 3,79 (s, 3 H (H-7)); 3,73 (s, 3 H (H-8)); 3,67 (s, 3 H (H-7'))

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 167,15 (C-6); 162,88 (C-1); 151,48 (C-2); 139,26 (C-4); 117,27 (C-5); 107,19 (C-3); 56,01 (C-8); 52,42 (C-7); 51,08 (C-7')

MS: m/z (%) = 200 (37,8) M^+ ; 185 (2,75) $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$; 169 (22,6) $[\text{M} - \text{OCH}_3]^+$; 153 (7,3) $[\text{M} - \text{CH}_3 - \text{CH}_3\text{OH}]^+$; 141 (100,0) $[\text{M} - \text{CH}_3 - \text{CO}_2]^+$; 126 (23,7) $[\text{M} - 2 \times \text{CH}_3 - \text{CO}_2]^+$; 109 (10,4) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{OH} - \text{CH}_3 - \text{CO}_2]^+$; 98 (53,1) $[\text{M} - \text{CH}_3 - \text{CH}_3\text{CO} - \text{CO}_2]^+$; 95 (37,2) $[\text{M} - \text{CH}_3 - \text{CH}_3\text{OH} - \text{CO}_2]^+$; 83 (17,2) $[\text{M} - 2 \times \text{CH}_3 - \text{CH}_3\text{CO} - \text{CO}_2]^+$

3.1.1.2 2-Methoxymuconsäure

3,0 g (15 mmol) 2-Methoxymuconsäuredimethylester (**11**) wurden mit 1,2 g (30 mmol) NaOH in 12 ml H₂O bei RT so lange gerührt, bis eine klare Lösung entstanden war. Es wurde 1 Stunde nachgerührt, mit konz. HCl angesäuert, die Suspension auf 0 °C abgekühlt und abgesaugt. Der so erhaltene Rückstand wurde mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet.



Ausbeute: 2,1 g (80 %) farbloser Feststoff

Smp.: 223-225 °C (Lit: 222-224 °C, GABBAI & POSTERNAK, 1971)

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 7,58 (dd, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 11,69 Hz, ³J(H,H) = 11,19 Hz); 7,30 (d, 1 H (H-3), ³J(H,H) = 11,70 Hz); 5,64 (d, 1 H (H-3), ³J(H,H) = 11,19 Hz); 3,72 (s, 3 H (H-7))

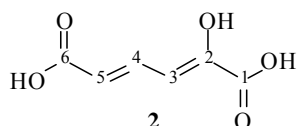
¹³C-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 169,94 (C-6); 165,45 (C-1); 153,73 (C-2); 140,59 (C-4); 118,29 (C-5); 107,29 (C-3); 56,45 (C-7)

MS: m/z (%) = 175 (27,0) M⁺; 141 (2,1) [M -CH₃O]⁺; 127 (100,0) [M -CO₂H]⁺; 111 (7,6) [M -CO₂ -OH]⁺; 99 (16,4) [M -CO₂H -CO]⁺; 95 (33,8) [M -CO₂H -CH₃OH]⁺; 84 (29,9) [M -2×CO₂]⁺; 71 (15,8)

EA: ber. für C₇H₈O₅: C 48,48; H 4,68; gef.: C 48,21; H 4,54

3.1.1.3 2-Hydroxymuconsäure

2,1 g (12,1 mmol) 2-Methoxymuconsäure (**12**) wurden in 5 ml konz. HCl und 15 ml Trifluor-essigsäure für 1 Stunde auf 70 °C erhitzt und anschließend im Eisbad auf 0 °C abgekühlt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit wenig eisgekühltem H₂O gewaschen und im Exsikkator getrocknet.



Ausbeute: 1,2 g (63 %) farbloser Feststoff

Smp.: 181 - 183 °C (Zers.)

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 7,69 (dd, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 11,70 Hz, ³J(H,H) = 15,77 Hz); 6,24 (dd, 1 H (H-3), ³J(H,H) = 11,70 Hz, ⁴J(H,H) = 1,02 Hz); 5,94 (dd, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 15,77 Hz), ⁴J(H,H) = 1,02 Hz)

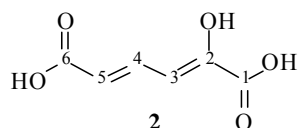
$^{13}\text{C-NMR}$ ($d_4\text{-MeOH}$): δ (ppm) = 170,43 (C-6); 166,61 (C-1); 148,06 (C-2); 139,51 (C-4); 122,25 (C-5); 109,10 (C-3)

MS: m/z (%) = 158 (18,9) M^+ ; 141 (2,2) $[\text{M} - \text{OH}]^+$; 113(100,0) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H}]^+$; 95 (32,3) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 85 (67,0) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - \text{CO}]^+$; 68 (26,8) $[\text{M} - 2 \times \text{CO}_2\text{H}]^+$; 57 (17,4) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - 2 \times \text{CO}]^+$

Die NMR-Daten stimmen mit den von WHITMAN et al. (1991) für diese Verbindung angegebenen Werten überein.

3.1.1.4 Alternative Darstellung der 2-Hydroxymuconsäure

5,0 g (0,22 mol) Natrium und 29,2 g (0,2 mol) Oxalsäurediethylester wurden in 100 ml abs. Petrolether suspendiert und portionsweise mit 22,8 g (0,2 mol) Crotonsäureethylester versetzt. Nachdem die Reaktionsmischung für 2 Tage gerührt worden war, konnte der entstandene Niederschlag abgenutscht und mit Petrolether gewaschen werden. Es wurden 40,1 g eines roten Feststoffes erhalten, der ohne weitere Reinigung unter Eiskühlung portionsweise in 400 ml 30 %ige Natronlauge gegeben und für 3 Stunden gerührt wurde. Die Reaktionsmischung wurde mit H_2O auf 1 l Gesamtvolumen verdünnt, filtriert, unter Eiskühlung mit konz. HCl sauer gestellt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Das Produkt wurde abgesaugt und aus Essigester/Ethanol umkristallisiert.



Ausbeute: 5,1 g (16 %) leicht gelblicher Feststoff

Smp.: 179 - 181 °C

$^1\text{H-NMR}$ ($d_4\text{-MeOH}$): δ (ppm) = 7,62 (dd, 1 H (H-4), $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 11,69$ Hz, $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 15,77$ Hz); 6,24 (dd, 1 H (H-3), $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 11,70$ Hz, $^4\text{J}(\text{H},\text{H}) = 1,02$ Hz); 5,94 (dd, 1 H (H-5), $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 15,77$ Hz), $^4\text{J}(\text{H},\text{H}) = 1,02$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ ($d_4\text{-MeOH}$): δ (ppm) = 170,43 (C-6); 166,63 (C-1); 148,05 (C-2); 139,52 (C-4); 122,23 (C-5); 109,06 (C-3)

MS: m/z (%) = 158 (16,5) M^+ ; 113(100,0) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H}]^+$; 95 (28,6) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 85 (47,5) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - \text{CO}]^+$; 68 (55,4) $[\text{M} - 2 \times \text{CO}_2\text{H}]^+$; 57 (27,4) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - 2 \times \text{CO}]^+$

3.1.2 Darstellung einer 2-Oxo-3-hexendisäure-/4-Oxalocrotonat-Lösung

Die für die Enzymtests der Decarboxylase benötigte Substratlösung wurde durch Tautomerie der 2-Hydroxymuconsäure (**2**) in Phosphatpuffer bei pH 7,5 gewonnen. Da unter diesen Bedingungen eine Verschiebung des Absorptionsmaximums der Reaktionslösung von 295 nm zu 236 nm (2-Oxo-3-hexendisäure, **3a**) erfolgt, konnte das Erreichen des Gleichgewichts durch Aufnahme von UV/VIS-Spektren der Lösung zwischen 200 und 350 nm überprüft werden. Die Isomerisierung des Edukts zum 4-Oxalocrotonat (**3b**) verläuft laut WHITMAN et al. (1998) langsamer. Da dieses Produkt keine Absorption im beobachteten Bereich aufweist, war das Gleichgewicht somit erst vollständig erreicht, als die Extinktion bei 295 nm Konstanz zeigte.

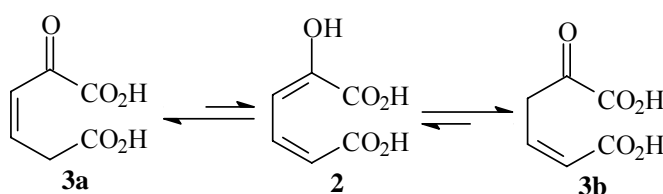


Abb. 3.3: Tautomerie von 2-Hydroxymuconsäure (**2**) in protischen Lösungsmitteln.

Von einer 10 mmolaren Lösung von 2-Hydroxymuconsäure (**2**) in Phosphatpuffer (pH 7,5) wurden stündlich 10 μ l aliquotiert und sofort in 990 μ l des gleichen Puffers UV/VIS-spektrometrisch vermessen. Nach mehreren Stunden blieb die Extinktion bei 295 nm konstant und das Reaktionsgleichgewicht war vollständig erreicht.

Diese Lösung wurde immer frisch hergestellt.

3.1.3 Darstellung einer Vinylpyruvat-Lösung

Durch thermische Decarboxylierung von 2-Hydroxymuconsäure (**2**) konnte nach LIAN & WHITMAN (1993) ein Gemisch der beiden Tautomeren des Vinylpyruvats (2-Hydroxy-2,4-pentadiensäure und 2-Oxo-3-pentensäure, **4**) erhalten werden.

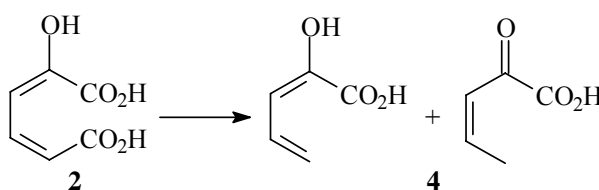


Abb. 3.4: Thermische Decarboxylierung von 2-Hydroxymuconsäure (**2**).

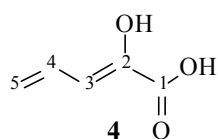
80 mg (0,5 mmol) 2-Hydroxymuconsäure (**2**) wurden in 2 ml d_6 -DMSO unter Inertgas für 3 Minuten auf 120 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung sofort NMR-spektroskopisch vermessen. Um die beiden tautomeren Reaktionsprodukte (**4**) zu erhalten, wurde diese Lösung danach in 100 ml Essigester aufgenommen und zweimal mit jeweils 50 ml Wasser gewaschen. Es folgte Trocknung der organischen Phase über Na_2SO_4 und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum bei 40 °C. Der so erhaltene Rückstand wurde massenspektrometrisch vermessen.

Die 1H -NMR-Analyse zeigte eine leichte Verunreinigung der Probe, so dass auf eine Elementaranalyse verzichtet werden musste. Die Daten stimmen aber mit Literaturwerten überein (LIAN & WHITMAN, 1993). Im Massenspektrum konnten die unten aufgeführten Fragmente den Zielverbindungen zugeordnet werden.

Ausbeute: 34 mg (60 %) farbloser Feststoff.

Die NMR-Daten werden für beide Tautomere getrennt angegeben:

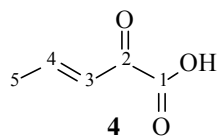
2-Hydroxy-2,4-pentadiensäure (4**):**



1H - NMR (d_6 -DMSO): δ (ppm) = 6,64 (ddd, 1 H (H-4), $^3J(H,H) = 17,29$ Hz, $^3J(H,H) = 11,19$ Hz, $^3J(H,H) = 10,17$ Hz); 6,06 (d, 1 H (H-3), $^3J(H,H) = 11,19$ Hz); 5,31 (dd, $^2J(H,H) = 2,04$ Hz, $^3J(H,H) = 17,29$ Hz); 5,10 (dd, 1 H (H-5), $^2J(H,H) = 2,04$ Hz, $^3J(H,H) = 10,18$ Hz)

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO): δ (ppm) = 164,76 (C-1); 141,81 (C-2); 130,37 (C-4); 118,31 (C-5); 111,61 (C-3)

2-Oxo-3-pentensäure (4**):**



1H - NMR (d_6 -DMSO): δ (ppm) = 7,00 (dq, 1 H (H-4), $^3J(H,H) = 15,77$ Hz, $^3J(H,H) = 6,78$ Hz); 6,45 (dq, 1 H (H-3), $^3J(H,H) = 15,77$ Hz, $^4J(H,H) = 1,53$ Hz); 1,93 (dd, 1 H (H-5), $^3J(H,H) = 6,87$ Hz, $^4J(H,H) = 1,52$ Hz)

^{13}C -NMR (d_6 -DMSO): δ (ppm) = 186,55 (C-2); 165,69 (C-1); 150,46 (C-4); 127,14 (C-3); 18,57 (C-5)

MS: m/z (%) = 114 (4,5) M⁺; 86 (3,7) [M -CO]⁺; 78 (28,1) [M -2×H₂O]⁺; 69 (100,0) [M -CO₂H]⁺; 63 (40,0); 57 (18,5) [M -CO -HCO]⁺; 41 (76,9) C₃H₅⁺; 39 (53,0) C₃H₃⁺

Um eine Substratlösung für enzymatische Untersuchungen der Vinylpyruvat-Hydratase zu erhalten, wurde 2-Hydroxymuconsäure (**2**) in DMSO gelöst, decarboxyliert und die resultierende Lösung in einem entsprechenden Volumen Methanol aufgenommen, um eine 10 mmolare Lösung zu erhalten. Diese Lösung wurde immer frisch hergestellt.

3.1.4 Synthese von (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat

In der Literatur (BURLINGAME & CHAPMAN, 1983; POWLOWSKI et al., 1993; POLLARD & BUGG, 1998) wurde 4-Hydroxy-2-oxovalerat (**5**) als Substrat für Enzymtests stets durch alkalische Hydrolyse des nach einer Synthese von ROSSI & SCHINZ (1948) dargestellten 4-Methyl-2-oxobutyrolactons (**14a**) dargestellt.

Um das Zielprodukt in enantiomerenreiner Form zu erhalten, wurde der im folgenden beschriebene Syntheseweg verfolgt:

2-Amino-4-hydroxypentansäure (**17**), deren Darstellung in der Literatur bereits beschrieben ist, stellt ein zentrales Zwischenprodukt der Synthese dar. Mittels zweier Aminosäureoxidasen ließ sich aus dem Racemat die jeweils enantiomerenreine Zielverbindung (**5**) erhalten.

Die Darstellung der Aminosäure beginnt mit Acetessigsäureethylester, welcher in deprotonierter Form mit Propenoxid zu 3-Acetyl-5-methyldihydro-2-furanon (**15**) reagiert (ZUIDEMA et al., 1963; DYKER & THÖNE, 2000). Mittels der Japp-Klingemann-Reaktion wird hieraus nach einer Vorschrift von DUFFIN & KENDALL (1955) durch Reaktion mit Phenyl diazoniumchlorid 5-Methyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon (**16**) erhalten. Laut FEOFILAKTOW & ONISCHTSCHENKO (1939) ließ sich daraus durch Reduktion mit Zinn in Salzsäure 2-Amino-4-hydroxypentansäure (**17**) darstellen.

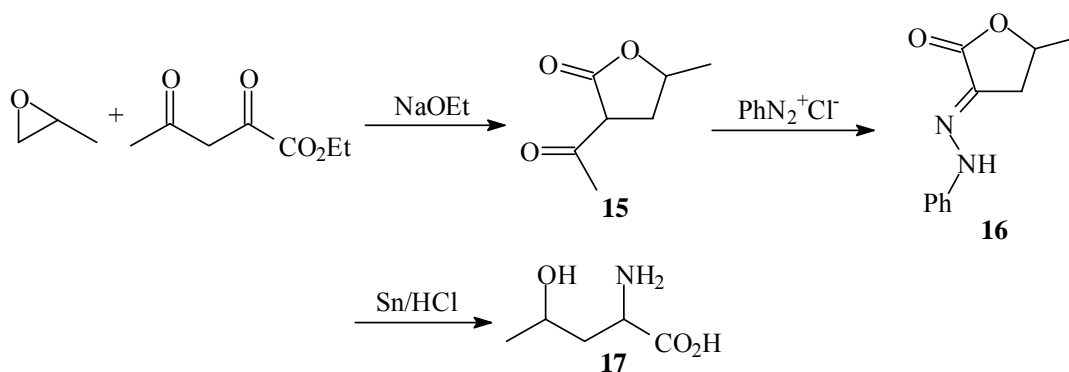


Abb. 3.5: Synthese von 2-Amino-4-hydroxypentansäure (17).

Die Hydroxyaminosäure sollte dabei als Diastereomerenmischung anfallen, welches sich nach MATZINGER et al. (1972) chromatographisch trennen lässt. Da die eingesetzten D- und L-Aminosäureoxidasen bezüglich ihrer Substrate stereospezifisch sind, ließ sich aus der enantiomerenreinen Aminosäure durch Wahl des Enzyms die Konfiguration des Stereozentrums an C-4 des Syntheseprodukts steuern.

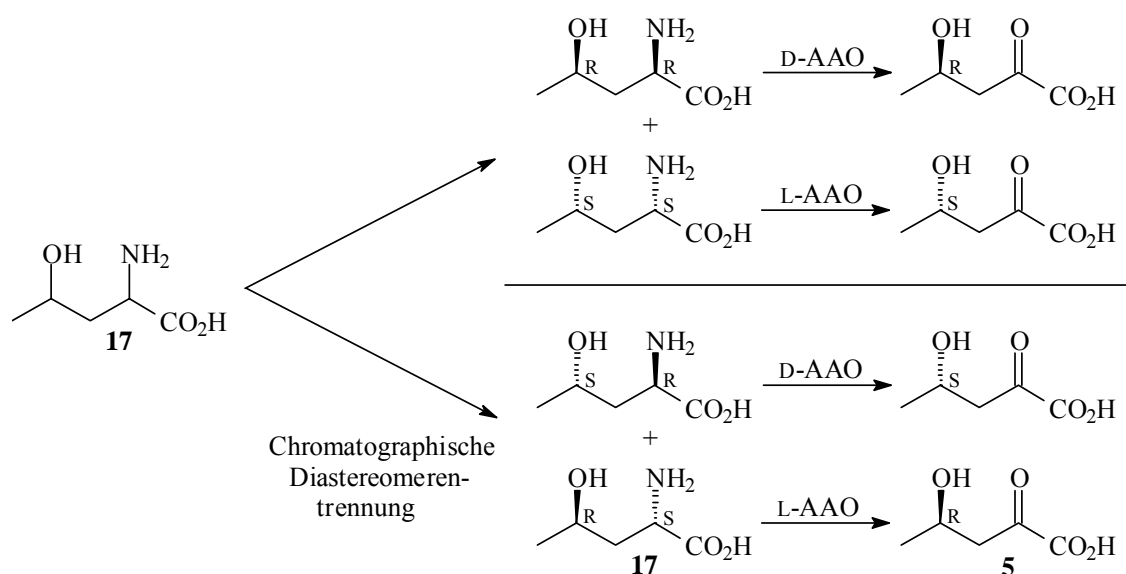


Abb. 3.6: Diastereomerentrennung von 2-Amino-4-hydroxypentansäure (17) und Gewinnung von enantiomerenreinem 4-Hydroxy-2-oxovalerat (5, es sind die absoluten Konfigurationen dargestellt).

Zur Konstitutionsbestimmung nach MATZINGER et al. (1972) durch Interpretation der NMR-Spektren erfolgte eine Lactonisierung des erhaltenen Aminosäure-Racemats zum 3-Amino-5-methyldihydro-2-furanonhydrochlorid (18). Da die Methylenprotonen in den Diastereomeren der γ -Lactone eine stark unterschiedliche Abschirmung erfahren, war eine Bestimmung der

Konstitution leicht möglich. Somit konnte nach obigem Schema durch Wahl des Eduktes und der Aminosäureoxidase die gewünschte Chiralität des 4-Hydroxy-2-oxovalerats (**5**) erhalten werden.

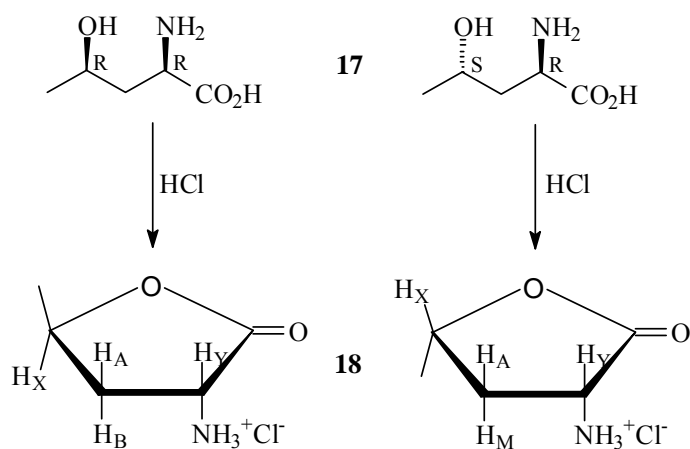
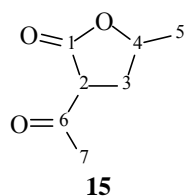


Abb. 3.7: Konstitutionsbestimmung der Diastereomeren (**17**) durch Lactonisierung (es ist stellvertretend jeweils nur ein Enantiomer dargestellt).

3.1.4.1 3-Acetyl-5-methyldihydro-2-furanon

3,9 g (0,17 mol) Natrium wurden in 150 ml abs. Ethanol gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Es folgte die Zugabe von 22,1 g (21,7 ml, 0,17 mol) Acetessigsäureethylester und Rühren der Reaktionsmischung für 30 Minuten bei 0 °C. Nach Zugabe 9,9 g (11,9 ml, 0,17 mol) Propenoxid innerhalb von 0,5 h wurde für 20 h auf 50 °C erhitzt. Nachdem mit 150 ml Wasser hydrolysiert und dreimal mit je 100 ml Diethylether gewaschen worden war, wurde die wässrige Phase mit Eisessig sauer gestellt. Es folgte dreimalige Extraktion mit jeweils 100 ml Ether, Vereinigung der organischen Phasen und Trocknung über Na₂SO₄. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum fielen 16,9 g eines gelblichen Öls an, welches über eine 10 cm-Vigreux-Kolonne fraktioniert destilliert wurde. Die Hauptfraktion ging bei 112 – 115 °C (10 mbar) über.



Ausbeute: 11,4 g (47 %) farblose Flüssigkeit

Sdp.: 112 – 115 °C (10 mbar)

(Lit.: 81 - 85 °C (3 Torr), MORI & IKUNAKA, 1984)

Es wurde ein Gemisch der beiden möglichen Diastereomere erhalten. Im ¹H-NMR-Spektrum ließen diese sich leicht unterscheiden, da sich durch die unterschiedliche räumliche Orientierung

der Acetyl- und Methylgruppe für die Protonen an Position 3 verschiedene magnetische Umgebungen ergeben. So bilden die Ringprotonen im (R,R/S,S)-Stereomer ein AMXY-Spinsystem, während sie in der Verbindung mit (R,S)- bzw. (S,R)-Konfiguration ein ABXY-Spinsystem aufspannen.

(R,R/S,S)-Stereomer:

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 4,67 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 7,53 Hz, ³J(H,H) = 6,89 Hz, ³J(H,H) = 6,16 Hz); 3,75 (m, 1 H (H-2), ³J(H,H) = 9,32 Hz, ³J(H,H) = 4,54 Hz); 2,84 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 13,10 Hz, ³J(H,H) = 6,89 Hz, ³J(H,H) = 4,54 Hz); 2,41/2,45 (s, 3 H (H-7)); 1,86 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 13,10 Hz, ³J(H,H) = 9,32 Hz, ³J(H,H) = 7,53 Hz, ⁴J(H,H) = 0,3 Hz); 1,40 (m, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 6,16 Hz, ⁴J(H,H) = 0,3 Hz)

¹³C-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 200,32/199,89 (C-6); 171,99 (C-1); 76,75 (C-4); 54,75 (C-2); 31,26 (C-3); 29,53/29,06 (C-7); 21,19 (C-5)

(R,S/S,R)-Stereomer:

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 4,60 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 9,83 Hz, ³J(H,H) = 6,11 Hz, ³J(H,H) = 5,90 Hz, ⁴J(H,H) = 0,84 Hz); 3,76 (m, 1 H (H-2), ³J(H,H) = 10,78 Hz, ³J(H,H) = 8,00 Hz, ⁴J(H,H) = 0,84 Hz); 2,41/2,45 (s, 3 H (H-7)); 2,37 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 17,73 Hz, ³J(H,H) = 9,83 Hz, ³J(H,H) = 8,00 Hz, ⁴J(H,H) = 3,13 Hz); 2,36 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 17,73 Hz, ³J(H,H) = 10,78 Hz, ³J(H,H) = 5,90 Hz, ⁴J(H,H) = -2,56 Hz); 1,42 (m, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 6,11 Hz, ⁴J(H,H) = 3,13 Hz, ⁴J(H,H) = -2,56 Hz)

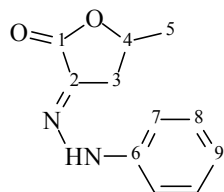
¹³C-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 200,32/199,89 (C-6); 171,99 (C-1); 75,61 (C-4); 54,38 (C-2); 30,76 (C-3); 29,53/29,06 (C-7); 20,97 (C-5)

MS: m/z (%) = 142 (5,1) M⁺; 114 (6,5) [M -CO]⁺; 100 (64,6) [M -CH₃CO +H]⁺; 85 (3,6) [M -CH₃CO -CH₃ +H]⁺; 83 (9,0) [M -CH₃ -CO₂]⁺; 71 (6,7) [M -CH₃CO -CO]⁺; 55 (23,7) [M -CH₃CO -CO₂]⁺; 43 (100,0) CH₃CO⁺

3.1.4.2 5-Methyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon

3,9 g (3,8 ml, 42,2 mmol) frisch destilliertes Anilin wurden in 25 ml 5 N Salzsäure gelöst und bei 0 - 5 °C mit 2,9 g (42,2 mmol) NaNO₂ in 10 ml H₂O unter Rühren diazotiert. Diese Diazoniumsalzlösung wurde sofort bei 0 - 5 °C zu einer Lösung von 6,0 g (42,2 mmol)

3-Acetyl-5-methyldihydro-2-furanon (**15**) in 25 ml Pyridin und 25 ml Wasser getropft. Das ausgefallene Produkt wurde unverzüglich abgesaugt und aus Ethanol/Essigester umkristallisiert.

**16****Ausbeute:** 5,2 g (60 %) gelbe Kristalle**Smp.:** 198-199 °C**¹H-NMR** (d₆-Aceton): δ (ppm) = 9,35 (s, 1 H (NH)); 7,25 (m, 4 H (H-7/8));

6,91 (m, 1 H (H-9)); 4,81 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 7,49 Hz, ³J(H,H) = 6,05 Hz, ³J(H,H) = 6,71 Hz); 3,22 (m, 1 H (H-3), ³J(H,H) = 18,17 Hz, ³J(H,H) = 7,49 Hz); 2,57 (m, 1 H (H-3), ³J(H,H) = 18,17 Hz, ³J(H,H) = 6,05 Hz); 1,42 (d, 3 H (H-5), ³J(H,H) = 6,71 Hz)

¹³C-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 167,93 (C-1); 145,81 (C-2); 133,18 (C-6); 130,67 (C-7); 123,11 (C-9); 115,37 (C-8); 73,98 (C-4); 33,30 (C-3); 23,50 (C-5)

MS: m/z (%) = 204 (100,0) M⁺; 189 (2,7) [M -CH₃]⁺; 171 (47,2) [M -CH₃ -H₂O]⁺; 159 (2,5) [M -CO₂ -H]⁺; 144 (24,4) [M -CO₂ -H -CH₃]⁺; 132 (2,5); 118 (7,5); 105 (8,9) Ph-NH-N⁺; 93 (15,2) Ph-NH⁺; 91 (61,1) Ph-N⁺; 77 (73,9) C₆H₅⁺; 65 (80,8) C₅H₅⁺; 51 (8,2) C₄H₃⁺; 41 (29,7); 39 (40,7) C₃H₃⁺

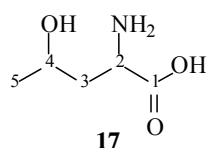
EA: ber. für C₁₁H₁₂N₂O₂: C 64,69; H 5,92; N 13,72; C 64,85; H 5,93; 14,04

3.1.4.3 2-Amino-4-hydroxypentansäure

In einer gegenüber dem Original leicht veränderten Versuchsdurchführung wurden 4,0 g (19,6 mmol) des 5-Methyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon in (**16**) 100 ml konz. HCl gelöst, mit 9,3 g (78,4 mmol) Zinn-Granulat versetzt und so lange gerührt, bis das gesamte Zinn in Lösung gegangen war. Nach ca. 8 Stunden Reaktionszeit wurde die Reaktionsmischung einrotiert und der Rückstand in möglichst wenig Wasser aufgenommen. Es folgte Einleitung von H₂S und Absaugen des ausgefallenen Niederschlags. Nach Neutralisation der so erhaltenen Lösung mit NaHCO₃ konnte wiederum ein Niederschlag abgesaugt und die wässrige Phase zweimal mit dem jeweils gleichen Volumen Ether gewaschen werden. Die wässrige Lösung wurde nun unter möglichst milden Bedingungen einrotiert und mit wenig Methanol versetzt. Der Rückstand wurde abfiltriert und die organische Phase einrotiert. Es konnten 1,3 g eines roten Öls erhalten werden.

Dieses Öl wurde in ca. 30 ml Wasser aufgenommen und zur Entsalzung einer Ionenaustauschchromatographie mit Dowex 50WX4 als Säulenmaterial unterworfen. In den Fraktionen 30 – 45 konnten dünn-schichtchromatographisch (Kieselgel 60, Merck; Laufmittel MeOH/H₂O 1:1; Anfärbung mit Ninhydrin) zwei nicht voneinander getrennte Produkte gefunden werden. Es handelte sich hierbei um die beiden Diastereomere mit R_f-Werten von 0,69 und 0,48. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer vorsichtig bis zur Trockne vom Lösungsmittel befreit. Es konnten 700 mg (27 %) eines farblosen Feststoffs isoliert werden.

Aus dem Diastereomeregemisch der so gewonnenen Aminosäure konnte mittels einer Cellulosesäule chromatographisch ein Racemat abgetrennt werden. Die Überprüfung der Fraktionen auf Produkt erfolgte wiederum dünn-schichtchromatographisch (Cellulose, Merck; Laufmittel siehe präp. Chromatographie; Anfärbung mit Ninhydrin). Es konnten zwei Produkte mit unterschiedlichen R_f-Werten jeweils in den Fraktionen 5 – 15 (R_f = 0,49) und 11 – 25 (R_f = 0,36) festgestellt werden. Die jeweils nur ein Enantiomerenpaar enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum vorsichtig vom Lösungsmittel befreit. Im Fall der Substanz mit kleinerem R_f-Wert wurde hierbei ein schwarzes Öl erhalten, welches nicht weiter untersucht wurde. Aus den Fraktionen 16 – 25 konnte das Racemat des gewünschten Produkts isoliert werden.



Ausbeute: 306 mg (12 % Gesamtausbeute) farbloser Feststoff

Smp.: 203-204 °C (Zers., Lit.: 202 °C, MARCOTTE & WALSH, 1978)

¹H-NMR (D₂O): δ (ppm) = 3,97 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 6,69 Hz, ³J(H,H) = 6,20 Hz, ⁴J(H,H) = 3,92 Hz, ³J(H,H) = -2,38 Hz); 3,88 (m, 1 H (H-2), ³J(H,H) = 7,32 Hz, ³J(H,H) = 4,27 Hz, ⁴J(H,H) = 3,92 Hz); 1,97 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = -5,75 Hz, ³J(H,H) = 4,27 Hz, ³J(H,H) = -2,38 Hz, ⁵J(H,H) = -0,87 Hz); 1,95 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = -5,75 Hz, ³J(H,H) = 7,32 Hz, ³J(H,H) = 6,69 Hz, ⁵J(H,H) = -0,97 Hz); 1,21 (m, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 6,20 Hz, ⁴J(H,H) = -0,87 Hz, ⁴J(H,H) = -0,97 Hz)

¹³C-NMR (D₂O): δ (ppm) = 176,66 (C-1); 67,31 (C-4); 55,25 (C-2); 39,82 (C-3); 24,79 (C-5)

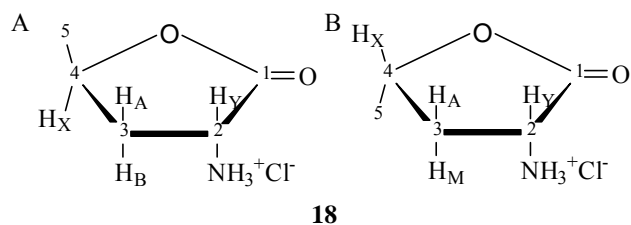
MS: m/z (%) = 118 (4,5) [M -CH₃]⁺; 115 (2,7) [M -H₂O]⁺; 100 (2,9) [M -CH₃ -H₂O]⁺; 97 (2,9) [M -2×H₂O]⁺; 89 (9,8) [M -CO₂]⁺; 88 (100,0) [M -CO₂H]⁺; 74 (70,9) [M -CH₃ -CO₂]⁺; 70 (10,0) [M -H₂O -CO₂H]⁺; 56 (19,4) [M -CH₃ -H₂O -CO₂]⁺; 45 (96,5) CO₂H⁺; 44 (73,5) CO₂⁺; 43 (29,8) CH₃CO⁺

EA: ber. für C₅H₁₁NO₃: C 45,10; H 8,33; N 10,52; C 44,90; H 8,45; N 10,47

Die Aufspaltungsmuster des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums korrelieren mit den von MATZINGER et al. (1972) für die threoide Aminosäure angegebenen Daten. Bei der Verbindung handelt es sich also um das (2S,4R)/(2R,4S)-Racemat der 2-Amino-4-hydroxypentansäure (**17**).

3.1.4.4 3-Amino-5-methyldihydro-2-furanonhydrochlorid

20 mg (0,15 mmol) des unter 3.1.4.3 erhaltenen 2-Amino-4-hydroxypentansäure-Racemats (**17**) wurden für 1,5 Stunden in 15 ml 6 N Salzsäure auf 80 °C erhitzt und anschließend zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde im Exsikkator getrocknet und NMR-spektroskopisch sowie massenspektrometrisch untersucht. Auf eine weitere Reinigung wurde dabei verzichtet.



$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ (ppm) = 4,75 (m, 1 H (H_X), $^3\text{J}(\text{H}_\text{X}, \text{H}_\text{A}) = 5,0$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_\text{X}, \text{H}_\text{M}) = 10,9$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_\text{X}, \text{H}_5) = 5,8$ Hz); 4,44 (m, 1 H (H_Y), $^3\text{J}(\text{H}_\text{Y}, \text{H}_\text{A}) = 8,7$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_\text{Y}, \text{H}_\text{M}) = 12,1$ Hz); 2,85 (m, 1 H (H_A), $^3\text{J}(\text{H}_\text{A}, \text{H}_\text{M}) = 12,5$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_\text{A}, \text{H}_\text{X}) = 5,0$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_\text{A}, \text{H}_\text{Y}) = 8,7$ Hz); 1,97 (m, 1 H (H_M), $^3\text{J}(\text{H}_\text{M}, \text{H}_\text{A}) = 12,5$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_\text{M}, \text{H}_\text{X}) = 10,9$ Hz, $^3\text{J}(\text{H}_\text{M}, \text{H}_\text{Y}) = 12,1$ Hz); 1,41 (d, 3 H (H-5), $^3\text{J}(\text{H}_5, \text{H}_\text{X}) = 5,8$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): δ (ppm) = 176,10 (C-1); 79,33 (C-4); 52,27 (C-2); 36,65 (C-3); 21,69 (C-5)

MS: m/z (%) = 115 (7,3) M^+ ; 71 (31,5) $[\text{M} - \text{CO}_2]^+$; 56 (100,0) $[\text{M} - \text{CO}_2 - \text{CH}_3]^+$; 54 (3,0) $[\text{M} - \text{CO}_2 - \text{NH}_3]^+$; 43 (48,6); 36 (57,9) HCl^+

Im Protonenresonanzspektrum liegen die chemischen Verschiebungen der beiden Methylenprotonen um 0,88 ppm voneinander entfernt. Sie erfahren also eine stark unterschiedliche Abschirmung und bilden somit den AM-Teil des AMXY-Spinsystems, welches durch das Lacton B erzeugt wird. Bei der unter 3.1.4.3 dargestellten Verbindung handelt es sich also um das Racemat (2S,4R)/(2R,4S)-2-Amino-4-hydroxypentansäure (**17**).

3.1.4.5 (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat

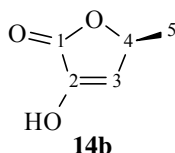
(S)-4-Hydroxy-2-oxovalerat (5):

20 mg (0,15 mmol) 2-Amino-4-hydroxypentansäure (**17**) wurden in 10 ml 23 mM Tris-Puffer/33 mM KCl (pH 7,5) gelöst. 15 mg D-Aminosäureoxidase und 10 μ l Catalase in 1,5 ml 0,1 M NaCl-Lösung wurden zugefügt und die Reaktionsmischung für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde mit 3 ml konz. HCl versetzt und das ausgefallene Protein für 10 Minuten bei 5000 Upm abzentrifugiert.

Die Aufarbeitung erfolgte auf zwei verschiedene Arten:

1. Der Überstand wurde dreimal mit je 30 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer bei RT vom Lösungsmittel befreit. Der dabei erhaltene Rückstand wurde in 1 ml D_2O aufgenommen und NMR-spektroskopisch vermessen. In dem Spektrum waren Signale enthalten, deren chemische Verschiebung und Aufspaltungsmuster denen einer authentischen Probe von 3-Hydroxy-5-methyl-5H-2-furanon (**14b**) entsprachen. Im sauren Medium fand also eine Lactonisierung des in der Enzymreaktion gebildeten 4-Hydroxy-2-oxovalerats (**5**) statt. Die weiteren Signale konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.
2. Um eine vollständige Lactonisierung zu erreichen, wurde ein zweiter Ansatz folgendermaßen aufgearbeitet:

Die Reaktionslösung wurde nach dem Zentrifugationsschritt über Nacht bei RT gerührt und sodann einer Festphasenextraktion unterworfen (50 mg). Von der durch Elution mit d_4 -Methanol erhaltenen Lösung wurde ebenfalls ein NMR-Spektrum aufgenommen. Hier waren wiederum die Signale des Lactonisierungsprodukts (**14b**) sowie geringe Verunreinigungen zu erkennen, deren eindeutige Zuordnung leider nicht möglich war.



$^1\text{H-NMR}$ (d_4 -MeOH): δ (ppm) = 6,26 (d, 1 H (H-3), $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 1,53$ Hz); 5,03 (dq, 1 H (H-4), $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 6,61$ Hz, $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 1,53$ Hz); 1,39 (d, 3 H (H-5), $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 6,61$ Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (d_4 -MeOH): δ (ppm) = 171, 79 (C-1); 144,22 (C-2); 121,73 (C-3); 76,68 (C-4); 20,38 (C-5)

Die Werte stimmen mit den Daten überein, die LIAN & WHITMAN (1994) für die Enolform des Lactons angeben.

Zur Darstellung des anderen Enantiomers wurde die Reaktion unter Durchführung der zweiten beschriebenen Aufarbeitung wiederholt, wobei diesmal L-Aminosäureoxidase eingesetzt wurde. Hierbei wurden die gleichen Ergebnisse erzielt. Beide aus den enzymatischen Umsätzen erhaltenen Substanzen wie auch die Vergleichsprobe wiesen die gleichen UV-Spektren auf:

$$\lambda_{\max} (\text{pH } 1) = 227 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\max} (\text{pH } 14) = 261 \text{ nm}$$

Um Substratlösungen für die Enzymtests zu erhalten, wurden die enzymatischen Umsetzungen wie unter 2. beschrieben aufgearbeitet und der Lösung vor Aufnahme des Spektrums eine definierte Menge reinen Ethanol zugesetzt. Durch Vergleich der Peakintegrale im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte so die Konzentration an (S)- bzw. (R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat (**5**) in der Lösung bestimmt werden. Die NMR-Lösung wurde dann so mit einer 10^{-3} molaren Natronlauge verdünnt, dass eine Endkonzentration des Substrates von 10 mmol/l vorlag. Nach ca. 16-stündigem Rühren bei RT war die Hydrolyse des Lactons beendet (DAGLEY & GIBSON, 1965) und die Lösung konnte zur Enzymvermessung eingesetzt werden.

3.1.5 Synthese von 4-Chlorpicolinsäure

Die Darstellung von 4-Chlorpicolinsäure (**19**) gelang in einem Schritt durch Chlorierung von Picolinsäure mittels Thionylchlorid nach einer abgewandelten Synthesevorschrift von MOSHER & LOOK (1955) isomerenrein.

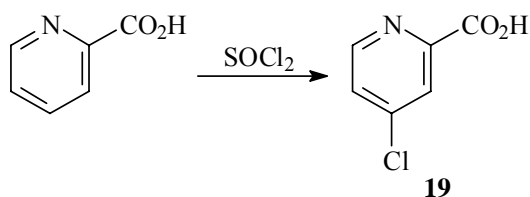
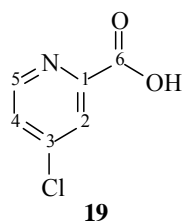


Abb. 3.8: Darstellung von 4-Chlorpicolinsäure (**19**) aus Picolinsäure mittels Thionylchlorid.

10,0 g (0,08 mol) Picolinsäure wurden in 25 ml (40,8 g, 0,34 mol) Thionylchlorid für 62 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Anschließend folgte vorsichtige Hydrolyse der Reaktionsmischung mit H₂O unter Eiskühlung bis sich die Gasentwicklung einstellte. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Wasser im Vakuum entfernt. Der Rückstand konnte aus Methanol/Essigester und dann aus wenig Methanol umkristallisiert werden.



Ausbeute: 7,4 g (58 %) leicht gelblicher Feststoff

Smp.: 180-182 °C

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 8,59 (d, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 5,08 Hz); 8,14 (d, 1 H (H-2), ⁴J(H,H) = 2,04); 7,68 (dd, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 5,08 Hz, ⁴J(H,H) = 2,03 Hz)

¹³C-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 166,41 (C-6); 151,53 (C-5); 150,94 (C-1); 147,12 (C-3); 128,55 (C-4); 126,45 (C-2)

MS: m/z (%) = 140 (2,3) [M -OH]⁺; 113 (100,0) [M -CO₂]⁺; 112 (28,6) [M -CO₂H]⁺; 86 (6,2) [M -CO₂ -HCN]⁺; 85 (5,9) [M -CO₂H -HCN]⁺; 78 (71,6) [M -CO₂ -Cl]⁺; 76 (42,9) [M -CO₂H -HCl]⁺; 60 (4,6) C₂HCl⁺; 51 (35,2) C₄H₃⁺; 50 (43,8) C₃N⁺; 45 (12,6) CO₂H⁺

EA: ber. für C₆H₄ClNO₂: C 45,74; H 2,56; N 8,89; gef. C 45,99; H 2,52; N 8,97

3.1.6 Synthese von 5-Chlorpicolinsäure

Für die Darstellung der 5-Chlorpicolinsäure (**21**) wurde zunächst durch Sandmeyer-Reaktion 2-Amino-5-chlorpyridin zu 2-Brom-5-chlorpyridin (**20**) umgesetzt. Durch Lithiierung und Reaktion mit Kohlendioxid konnte hieraus die Zielverbindung gewonnen werden.

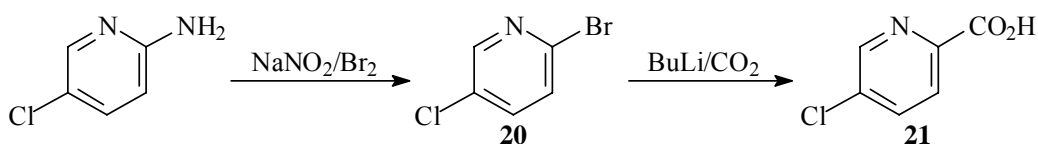
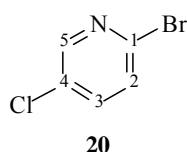


Abb. 3.9: Synthese von 5-Chlorpicolinsäure (**21**) ausgehend von 2-Amino-5-chlorpyridin.

3.1.6.1 2-Brom-5-chlorpyridin

10,2 g (0,08 mol) 2-Amino-5-chlorpyridin wurden in 60 ml 60%iger HBr gelöst und auf -10 °C gekühlt. Anschließend folgte tropfenweise Zugabe von zunächst 38,4 g (12,3 ml, 0,24 mol) Brom und dann 13,8 g (0,2 mol) NaNO₂, gelöst in 30 ml H₂O, ohne dass die Temperatur der Reaktionsmischung über 0 °C anstieg. Es wurde über Nacht bei RT gerührt und dann unter Eiskühlung mit 60 g NaOH in 100 ml Wasser versetzt. Die Reaktionsmischung wurde dreimal mit jeweils 50 ml Diethylether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne einrotiert. Abschließend erfolgte Umkristallisation des Rohprodukts aus Methanol.



Ausbeute: 13,0 g (84 %) farbloser Feststoff

Smp.: 68-69 °C (Lit.: 68-69 °C, SCHLOSSER & COTTET, 2002)

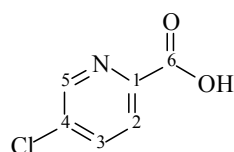
¹H-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 8,39 (d, 1 H (H-5), ⁴J(H,H) = 2,55 Hz); 7,79 (dd, 1 H (H-3), ³J(H,H) = 8,65 Hz, ⁴J(H,H) = 2,55 Hz); 7,62 (d, 1 H (H-2), ³J(H,H) = 8,65 Hz)

¹³C-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 150,44 (C-5); 141,00 (C-4); 140,41 (C-3); 133,14 (C-1); 130,90 (C-2)

MS: m/z (%) = 191 (55,8) M⁺; 112 (100,0) [M -Br]⁺; 85 (15,1) [M -Br -HCN]⁺; 76 (90,5) [M -Br -HCl]⁺; 60 (6,1) C₂HCl⁺; 50 (49,0) C₃N⁺

3.1.6.2 5-Chlorpicolinsäure

20 ml (30 mol) Butyllithium wurden in 50 ml abs. Tetrahydrofuran unter Argonatmosphäre auf -70 °C gekühlt. Anschließend folgte die Zugabe von 4,8 g (25 mmol) 2-Brom-5-chlorpyridin (**20**), gelöst in 20 ml THF, ohne dass die Temperatur der Reaktionsmischung über -60 °C anstieg. Portionsweise wurden ca. 10 g (0,23 mol) Trockeneis zugegeben, wobei die Temperatur wiederum unter -60 °C verblieb. Es wurde langsam auf RT erwärmen lassen, die Reaktionsmischung mit jeweils 50 ml Diethylether und Wasser versetzt und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit konz. HCl angesäuert und dreimal mit je 150 ml Chloroform extrahiert. Es folgte Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum. Zur abschließenden Reinigung wurde aus wenig CHCl₃ umkristallisiert.

**21****Ausbeute:** 2,1 g (53 %) farbloser Feststoff**Smp.:** 167-168 °C (Lit.: 169-170 °C, GRAF, 1932)

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 8,64 (d, 1 H (H-5), ⁴J(H,H) = 2,55 Hz), 8,11 (d, 1 H (H-2), ³J(H,H) = 8,14 Hz), 8,01 (dd, 1 H (H-3), ³J(H,H) = 8,14 Hz, ⁴J(H,H) = 2,54 Hz)

¹³C-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 166,86 (C-6); 149,42 (C-5); 147,62 (C-1); 138,67 (C-2); 137,13 (C-4); 127,24 (C-3)

MS: m/z (%) = 157 (12,9) M⁺; 113 (100,0) [M -CO₂]⁺; 112 (29,4) [M -CO₂H]⁺; 85 (8,4) [M -CO₂H -HCN]⁺; 78 (62,2) [M -CO₂ -Cl]⁺; 76 (39,0) [M -CO₂H -HCl]⁺; 73 (2,4); 60 (5,8) [M -CO₂ -HCN -C₂H₂]⁺; 56 (2,2); 51 (37,4) C₄H₃⁺; 50 (41,7) C₃N⁺; 45 (12,6) CO₂H⁺

EA: ber. für C₆H₄ClNO₂: C 45,74; H 2,56; N 8,89; gef.: 45,90; H 2,50; N 9,09

3.1.7 Versuche zur Synthese von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure

KASCHABEK (mündl. Mitteilung) gelang die chemische Synthese von 5-Chlor-2-methoxymuconsäure (**24**) in drei Schritten nach folgendem Schema.

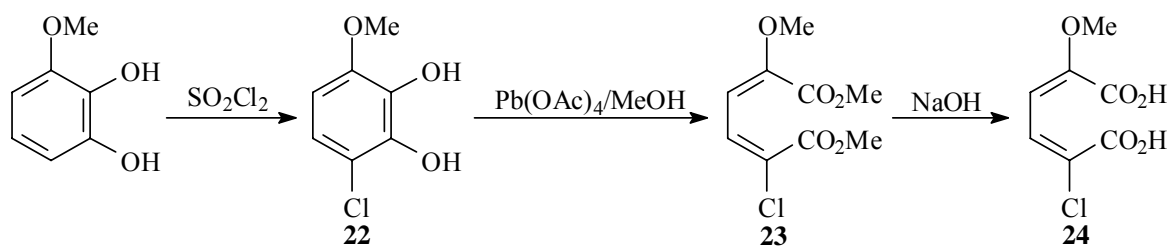


Abb. 3.10: Von KASCHABEK durchgeführte Synthese von 5-Chlor-2-methoxymuconsäure (**24**).

Die zur Zielverbindung 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) führende Etherspaltung nach etablierten Methoden mit den Reagenzien HBr, BBr₃ und AlCl₃ gelang nicht. Für eine Demethylierung mit Kaliumtriphenylphosphid oder eine der unter 3.1.1.3 beschriebenen analogen Versuchsdurchführung mit einem Gemisch aus konz. Salzsäure und Trifluoressigsäure erwies sich das System als zu empfindlich.

Es wurde also eine Synthesestrategie mit einer leichter abzuspaltenden Schutzgruppe für die Hydroxyfunktion erarbeitet. Diese musste unter den Bedingungen der Demethylierung der

beiden anderen OH-Gruppen und der oxidativen Ringspaltung bestehen bleiben und trotzdem unter milden Bedingungen abzuspalten sein. Diese Anforderungen sollten durch eine Maskierung der Hydroxyfunktion durch Reaktion mit Methansulfonsäurechlorid erfüllt werden, da die Mesyl-Schutzgruppe durch leichtes Erwärmen in alkalischer Lösung wieder entfernt werden kann (KAMPOURIS, 1965; LANTOS & LOEV, 1975).

Die Methansulfonsäure-2,3-dimethoxyphenylester (**25**) liefernde Mesylierung des 2,3-Dimethoxyphenols gelang durch Deprotonierung und Umsetzung mit Methansulfonsäurechlorid. Anschließende Demethylierung der beiden Methoxyfunktionen führte zu Methansulfonsäure-2,3-dihydroxyphenylester (**26**). Dessen Chlorierung mit Sulfurylchlorid führte zu einem nicht ganz isomerenreinen Produkt. Unter Einbeziehung von Überlegungen zur Sterie der am aromatischen System befindlichen Substituenten legt eine Abschätzung deren dirigierender Wirkungen nahe, dass es sich hierbei um die Verbindung Methansulfonsäure-4-chlor-2,3-dihydroxyphenylester (**27**) handelt.

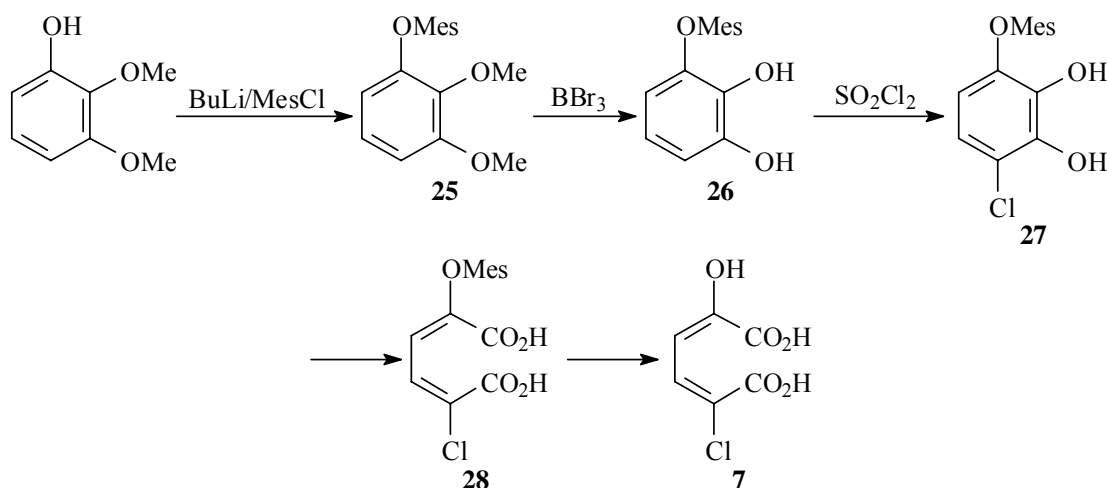


Abb. 3.11: Synthesestrategie zur Darstellung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) ausgehend von 2,3-Dimethoxyphenol. Die für den Ringspaltungsschritt eingesetzten Reagenzien sind im Text beschrieben.

Bevor die Struktur durch weitere Reinigung und ausführliche Analytik bestätigt werden sollte, wurden Vorversuche zur oxidativen Ringspaltung des Systems vorgenommen:

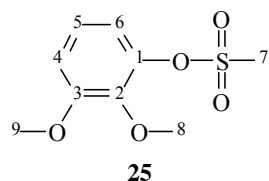
Hierbei führte am unchlorierten Kongeneren etablierte (3.1.1) und von Kaschabek am chlorierten System erfolgreich eingesetzte Methode mittels Bleitetraacetat in Methanol (GILHEANY et al., 1999) zu keinem Ergebnis. Durch eine Oxidation des aromatischen 1,2-Dihydroxysystems (**27**) mit Natriumperodat per Phasentransferkatalyse und anschließende Spaltung des Rings durch Umsetzung mit Bleitetraacetat (PIEKEN & KOZARICH, 1989) konnte ebenfalls nicht das gewünschte Produkt isoliert werden. Weiterhin wurde der Versuch unternommen, die

Ringspaltung nach PANDELL (1983) und MCKAGUE (1999) mit Peressigsäure in Gegenwart von Eisen-III-Ionen durchzuführen. Doch ebenso wie die anderen Methoden führte auch diese Aufarbeitung zu einem dunkel gefärbten Öl, aus welchem die Zielverbindung 5-Chlor-2-hydroxyumuconsäure (**7**) in keinem Fall isoliert werden konnte.

Eine analoge Synthesestrategie mit der Maskierung der OH-Funktion als Toluolsulfonsäureester führte ebenfalls nicht zu dem gewünschten Ergebnis.

3.1.7.1 Methansulfonsäure-2,3-dimethoxyphenylester

15,4 g (0,1 mol) 2,3-Dimethoxyphenol wurden in 75 ml abs. Tetrahydrofuran mit 62,5 ml (0,1 mol) Butyllithium-Lösung versetzt und für 1 Stunde gerührt. Es folgte die tropfenweise Zugabe von 7,7 ml (11,5 g, 0,1 mol) Methansulfonsäurechlorid. Nach wiederum einstündigem Nachrühren wurde die Reaktionsmischung mit jeweils 50 ml Wasser und Diethylether verdünnt, die Phasen getrennt, und die organische Phase mit NaHCO₃-Lösung gewaschen. Durch Trocknen über Natriumsulfat, Abdestillieren des Lösungsmittels und anschließender Destillation im Hochvakuum wurde eine farblose Flüssigkeit erhalten.



Ausbeute: 20,4 g (88 %) farblose Flüssigkeit

Sdp.: 126-130 °C (<10⁻² mbar)

25

¹H-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = δ (ppm) = 7,07 (dd, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 8,14 Hz, ³J(H,H) = 8,14 Hz), 6,99 (dd, 1 H (H-6), ³J(H,H) = 8,14 Hz, ⁴J(H,H) = 1,53 Hz), 6,91 (dd, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 8,14 Hz, ⁴J(H,H) = 1,53 Hz), 3,86 (s, 1 H (H-8)), 3,86 (s, 1 H (H-7)), 3,27 (s, 1 H (H-9))

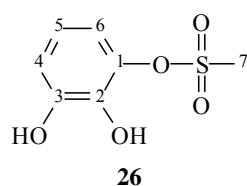
¹³C-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 155,69 (C-1); 144,47 (C-3); 143,36 (C-2); 125,05 (C-5); 117,27 (C-4); 113,11 (C-6); 61,94 (C-7); 57,22 (C-8); 39,24 (C-9)

MS: m/z (%) = 232 (51,0) M⁺; 168 (2,2) [M -SO₂]⁺; 153 (100,0) [M -MeSO₂]⁺; 139 (18,3) [M -CH₃SO₂ -CH₂]⁺; 125 (42,3) [M - CH₃SO₂ -CO]⁺; 110 (23,4) [M - CH₃SO₂ -CO -CH₃]⁺; 95 (23,1) [M - CH₃SO₂ -CO -2×CH₃]⁺; 93 (12,9) [M - CH₃SO₂ -2×OCH₂]⁺; 79 (8,2) CH₃SO₂⁺; 65 (11,5) C₅H₅⁺; 56 (12,6); 51 (8,0) C₄H₃⁺; 39 (30,1) C₃H₃⁺

EA: ber. für CHSO: C 46,54; H 5,21; S 13,80; gef.: C 46,86; H 5,34; S 13,28

3.1.7.2 Methansulfonsäure-2,3-dihydroxyphenylester

19,8 g (85 mmol) Methansulfonsäure-2,3-dimethoxyphenylester (**25**) wurden in 200 ml abs. CH₂Cl₂ gelöst und gekühlt. 120 ml (0,12 mol) BBr₃-Lösung wurden so zugetropft, dass die Temperatur nicht über -80 °C anstieg. Nach Rühren des Ansatzes über Nacht wurde die Reaktionsmischung in 200 ml kaltes Wasser gegossen, die wässrige Phase zweimal mit je 50 ml Diethylether gewaschen und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde im Hochvakuum durch Sublimation gereinigt.



Ausbeute: 13,1 g (76 %) farblose Kristalle

Smp.: 114 - 117 °C

¹H-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 6,81 (dd, 1 H (H-4/6), ³J(H,H) = 7,63 Hz, ⁴J(H,H) = 1,53 Hz), 6,79 (dd, 1 H (H-6/4), ³J(H,H) = 8,65 Hz, ⁴J(H,H) = 1,53 Hz), 6,71 (dd, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 7,63 Hz, ³J(H,H) = 8,14 Hz), 3,24 (s, 1 H (H-7))

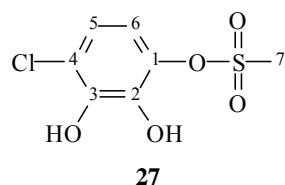
¹³C-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 148,43 (C-1); 139,57 (C-2,3); 120,58 (C-5); 116,38 (C-4/6); 115,59 (C-6/4); 38,90 (C-7)

MS: m/z (%) = 204 (54) M⁺; 125 (100,0) [M -CH₃SO₂]⁺; 107 (10,2) [M -CH₃SO₂ -H₂O]⁺; 97 (44,3) [M -CH₃SO₂ -CO]⁺; 79 (8,4) CH₃SO₂⁺; 68 (9,2); 51 (27,9) C₄C₃⁺; 39 (19,0) C₃H₃⁺

EA: ber. für CHSO: C 41,17; H 3,95; S 15,70; gef.: C 41,30; H 4,10; S 15,64

3.1.7.3 Methansulfonsäure-4-chlor-2,3-dihydroxyphenylester

10,2 g (50 mmol) Methansulfonsäure-2,3-dihydroxyphenylester (**26**) wurden in 100 ml abs. Diethylether gelöst und auf -20 °C gekühlt. 4,0 ml (6,75 g, 50 mmol) Sulfurylchlorid wurden so zugetropft, dass die Temperatur nicht über -10 °C anstieg. Nach Rühren des Ansatzes über Nacht konnte durch Einrotieren und anschließende Umkondensation im Hochvakuum ein gelbliches Öl isoliert werden, welches langsam kristallisierte. Dieses Rohprodukt wurde zur Reinigung aus Toluol umkristallisiert.



Ausbeute: 10,6 g (89 %) farbloser Feststoff

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -Aceton): δ (ppm) = 6,71 (d, 1 H, $^3J(\text{H,H}) = 7,73$ Hz), 6,60 (d, 1 H, $^3J(\text{H,H}) = 8,69$ Hz), 3,81 (s, 1 H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -Aceton): δ (ppm) = 147,00; 145,95; 141,11; 120,80 (C-5/6); 119,17 (C-4); 112,97 (C-6/4); 61,47 (C-7)

3.1.8 Synthese von *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat

Die Synthese von 2-Amino-5-chlor-4-pentensäure (**30**) ist in der Literatur bereits beschrieben (ALBERTSON, 1946; ALBERTSON, 1951). Ausgehend von *cis*- bzw. *trans*-1,3-Dichlorpropen wurde in einer Malonestersynthese jeweils der isomerenreine 3-Chlorallylacetamidomalonsäurediethylester (**29**) erhalten, aus welchem durch Erhitzen in Salzsäure die Aminosäure freigesetzt wurde. Durch Umsetzung mit einem Gemisch aus D- und L-Aminosäureoxidase konnten hieraus die Zielverbindungen (**9**) gewonnen werden.

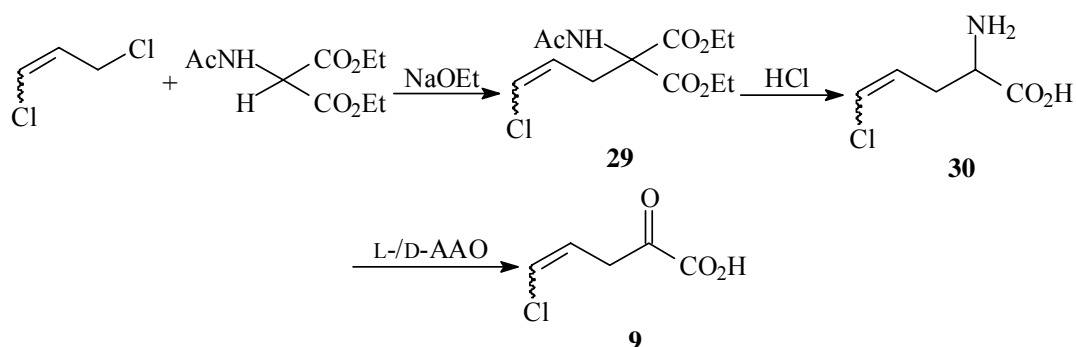
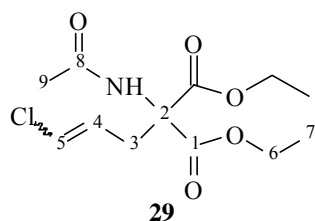


Abb. 3.12: Darstellung von *cis*- und *trans*-5-Chlor-2-oxo-4-pentensäure (**9**).

3.1.8.1 *cis*- und *trans*-3-Chlorallylacetamidomalonsäurediethylester

1,15 g (0,05 mol) Natrium wurden in 40 ml abs. Ethanol gelöst und 10,9 g (0,05 mol) Acetamidomalonsäurediethylester sowie 8,5 g (0,08 mol) *cis*- bzw. *trans*-1,3-Dichlorpropen zugegeben. Nach 17-stündigem Kochen unter Rückfluss folgte die Zugabe von 20 ml H₂O und zweimalige Extraktion mit jeweils 20 ml Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum zur Trockne einrotiert. Durch Umkristallisation des Rückstands aus H₂O und Trocknen im Exsikkator konnte jeweils das saubere Produkt erhalten werden.



***cis*-3-Chlorallylacetamidomalonsäurediethylester (29):**

Ausbeute: 10,2 g (70 %) farblose Blättchen **Smp.:** 55 - 56 °C

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 6,26 (dt, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 7,24 Hz, ⁴J(H,H) = 1,56 Hz); 5,78 (dt, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 7,24 Hz, ³J(H,H) = 7,36 Hz); 4,20 (q, 4 H (H-6), ³J(H,H) = 7,12 Hz); 3,18 (dd, 2 H (H-3), ³J(H,H) = 7,36 Hz, ⁴J(H,H) = 1,56 Hz); 1,98 (s, 3 H (H-9)); 1,23 (t, 6 H (H-7), ³J(H,H) = 7,12 Hz)

¹³C-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 172,54 (C-8); 168,59 (C-1); 125,91 (C-4); 122,90 (C-5); 67,05 (C-2); 63,61 (C-6); 32,06 (C-3); 22,28 (C-9); 14,25 (C-7)

MS: m/z (%) = 291 (16,2) M⁺; 256 (13,1) [M -Cl]⁺; 246 (9,1) [M -C₂H₅O]⁺; 232 (3,4) [M -CH₃CONH₂]⁺; 218 (12,7) [M -C₂H₅O -C₂H₄]⁺; 197 (100,0) [M -CH₃CONH₂ -Cl]⁺; 175 (8,6) [M -C₂H₅O -C₂H₄ -CH₃CO]⁺; 174 (94,2) [M -C₂H₅O -C₂H₄ -CO₂]⁺; 169 (42,1) [M -CH₃CONH₂ -C₂H₄ -Cl]⁺; 146 (10,9) [M -2×C₂H₄ -CO₂H -CO₂]⁺; 141 (8,6) [169-C₂H₄]⁺; 140 (7,4) [169-C₂H₅]⁺; 130 (16,7) [175-CO₂H]⁺; 123 (30,6) [169-C₂H₃ -OH]; 102 (21,3) [130-CO]⁺; 75 (4,4); 68 (3,3); 56 (4,5); 47 (13,4); 43 (62,1) CH₃CO⁺

EA: ber. für C₁₂H₁₈ClNO₅: C 49,41; H 6,22; N 4,80; C 49,64; H 5,86; N 4,76

***trans*-3-Chlorallylacetamidomalonsäurediethylester (29):**

Ausbeute: 10,0 g (69 %) farblose Kristalle **Smp.:** 71 - 72 °C

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 6,14 (dt, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 13,19 Hz, ⁴J(H,H) = 1,30 Hz); 5,76 (dt, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 13,19 Hz, ³J(H,H) = 7,99 Hz); 4,20 (q, 4 H (H-6), ³J(H,H) = 7,12 Hz); 2,98 (dd, 2 H (H-3), ³J(H,H) = 7,99 Hz, ⁴J(H,H) = 1,30 Hz); 1,99 (s, 3 H (H-9)); 1,22 (t, 6 H (H-7), ³J(H,H) = 7,13 Hz)

¹³C-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 172,59 (C-8); 168,47 (C-1); 128,26 (C-4); 122,35 (C-5); 67,59 (C-2); 63,60 (C-6); 35,65 (C-3); 22,25 (C-9); 14,30 (C-7)

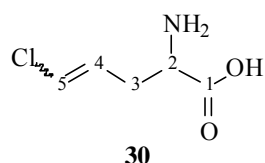
MS: m/z (%) = 291 (142) M⁺; 256 (18,7) [M -Cl]⁺; 246 (9,9) [M -C₂H₅O]⁺; 232 (2,6) [M -CH₃CONH₂]⁺; 218 (12,5) [M -C₂H₅O -C₂H₄]⁺; 197 (97,0) [M -CH₃CONH₂ -Cl]⁺; 175 (8,6) [M -C₂H₅O -C₂H₄ -CH₃CO]⁺; 174 (100,0) [M -C₂H₅O -C₂H₄ -CO₂]⁺; 169 (47,1) [M -CH₃CONH₂ -C₂H₄ -Cl]⁺; 146 (12,6) [M -2×C₂H₄ -CO₂H -CO₂]⁺; 141 (11,5) [169-C₂H₄]⁺; 140 (9,5) [169-

$C_2H_5]^+$; 130 (17,7) $[175-CO_2H]^+$; 123 (41,1) $[169-C_2H_3 -OH]$; 102 (17,6) $[130-CO]^+$; 75 (4,4); 68 (5,6); 56 (5,8); 47 (16,8); 43 (72,2) CH_3CO^+

EA: ber. für $C_{12}H_{18}ClNO_5$: C 49,41; H 6,22; N 4,80; C 49,50; H 6,50; N 4,79

3.1.8.2 *cis*- und *trans*-5-Chlor-2-amino-4-pentensäure

6,4 g (0,02 mol) *cis*- bzw. *trans*-3-Chlorallylacetamidomalonsäurediethylester (**29**) wurden in 30 ml konz. HCl für 8 Stunden zum Sieden erhitzt. Die auf 0 °C gekühlte Reaktionsmischung konnte abgesaugt und der so erhaltene Feststoff in möglichst wenig Ethanol/Wasser (1:1, v/v) aufgenommen werden. Es wurde mit 4 ml Pyridin versetzt, auf 0 °C gekühlt, abgesaugt und mit wenig eiskaltem H_2O gewaschen. Das Rohprodukt wurde aus Ethanol/Wasser umkristallisiert und im Exsikkator getrocknet.



cis-5-Chlor-2-amino-4-pentensäure (**30**):

Ausbeute: 1,2 g (40 %) farbloser Feststoff

Smp.: 230 - 232 °C (Zers.) (Lit.: 226 - 231 °C, SHAPIRA & DITTMER, 1960)

1H -NMR (D_2O): δ (ppm) = 6,40 (m, 1 H (H-5), $^3J(H,H) = 7,23$ Hz, $^4J(H,H) = 1,55$ Hz, $^4J(H,H) = 1,42$ Hz); 5,87 (m, 1 H (H-4), $^3J(H,H) = 7,48$ Hz, $^3J(H,H) = 7,4$ Hz, $^3J(H,H) = 7,23$ Hz); 3,87 (m, 1 H (H-2), $^3J(H,H) = 7,21$ Hz, $^3J(H,H) = 5,52$ Hz); 2,87 (m, 1 H (H-3), $^2J(H,H) = 14,95$ Hz, $^3J(H,H) = 7,41$ Hz, $^3J(H,H) = 5,52$ Hz, $^4J(H,H) = 1,55$ Hz); 2,81 (m, 1 H (H-3), $^2J(H,H) = 14,95$ Hz, $^3J(H,H) = 7,48$ Hz, $^3J(H,H) = 7,21$ Hz, $^4J(H,H) = 1,42$ Hz)

^{13}C -NMR (D_2O): δ (ppm) = 175,84 (C-1); 126,89 (C-4); 124,99 (C-5); 55,93 (C-2); 30,46 (C-3)

MS: m/z (%) = 150 (1,1) $[M+H]^+$; 114 (4,0) $[M-Cl]^+$; 104 (79,8) $[M-CO_2H]^+$; 97 (2,0) $[M-Cl-NH_3]^+$; 88 (5,8) $[M-CO_2-NH_3]^+$; 74 (100,0) $C_2H_4NO_2^+$; 69 (23,7) $[M-CO_2H-Cl]^+$; 68 (64,8) $[M-CO_2H-HCl]^+$; 56 (9,1) $C_2H_2NO^+$; 51 (8,8) $[M-CO_2H-HCl-NH_3]^+$; 46 (78,4) CH_4NO^+ ; 41 (70,0)

EA: ber. für $C_5H_8ClNO_2$: C 40,15; H 5,39; N 9,36; gef.: C 40,06; H 5,53; N 9,45

trans-5-Chlor-2-amino-4-pentensäure (**30**):

Ausbeute: 1,3 g (43 %) farbloser Feststoff

Smp.: 227 - 229 °C (Zers.) (Lit.: 230 - 234 °C, SHAPIRA & DITTMER, 1960)

¹H-NMR (D₂O): δ (ppm) = 6,30 (m, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 13,47 Hz, ⁴J(H,H) = 1,34 Hz, ⁴J(H,H) = 1,24 Hz); 5,93 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 13,47 Hz, ³J(H,H) = 8,74 Hz, ³J(H,H) = 8,14 Hz); 3,81 (m, 1 H (H-2), ³J(H,H) = 6,64 Hz, ³J(H,H) = 5,41 Hz); 2,69 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 15,98 Hz, ³J(H,H) = 8,14 Hz, ³J(H,H) = 5,41 Hz, ⁴J(H,H) = 1,34 Hz); 2,64 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 15,98 Hz, ³J(H,H) = 8,74 Hz, ³J(H,H) = 6,64 Hz, ⁴J(H,H) = 1,24 Hz)

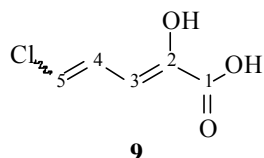
¹³C-NMR (D₂O): δ (ppm) = 175,74 (C-1); 129,15 (C-4); 124,12 (C-5); 56,12 (C-2); 34,03 (C-3)

MS: m/z (%) = 114 (5,5) [M -Cl]⁺; 104 (28,4) [M -CO₂H]⁺; 88 (3,5) [M -CO₂ -NH₃]⁺; 74 (100,0) C₂H₄NO₂⁺; 69 (13,1) [M -CO₂H -Cl]⁺; 68 (45,5) [M -CO₂H -HCl]⁺; 56 (7,2) C₂H₂NO⁺; 51 (5,5) [M -CO₂H -HCl -NH₃]⁺; 46 (71,5) CH₄NO⁺; 41 (33,6)

EA: ber. für C₅H₈ClNO₂: C 40,15; H 5,39; N 9,36; gef.: C 40,14; H 5,44; N 9,44

3.1.8.3 *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat

Je 10 mg D- und L-Aminosäureoxidase wurden in 1,5 ml 0,1 M NaCl-Lösung gelöst. 27 mg (180 µmol) *cis*- bzw. *trans*-2-Amino-5-chlor-4-pentensäure (**30**) in 5 ml 23 mM Tris-Puffer/33 mM KCl (pH 7,5) wurden mit der Oxidase-Lösung sowie 30 µl Catalase versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 1 Stunde bei 37 °C geschüttelt, anschließend mit 3 ml 6 %iger Perchlorsäure versetzt und zur Sedimentation des ausgefallenen Proteins 10 Minuten bei 5000 Upm zentrifugiert. Es folgte zweimalige Extraktion mit jeweils 20 ml Diethylether und Trocknung der vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄. Es wurde im Vakuum bei Raumtemperatur zur Trockne einrotiert, der Rückstand in 1,5 ml d₄-Methanol aufgenommen und NMR-spektroskopisch vermessen. Die NMR-Lösung wurde bei 50 °C eingedampft, in Methanol aufgenommen, nochmals eingedampft und massenspektrometrisch vermessen.



cis-Chlorvinylpyruvat (**9**):

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 6,79 (dd, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 11,19 Hz, ³J(H,H) = 7,12 Hz); 6,53 (dd, 1 H (H-3), ³J(H,H) = 11,19 Hz, ⁴J(H,H) = 1,02 Hz); 6,21 (dd, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 7,12 Hz, ⁴J(H,H) = 1,02 Hz)

^{13}C -NMR (d_4 -MeOH): δ (ppm) = 167,18 (C-1); 144,68 (C-2); 124,56 (C-4); 120,52 (C-5); 105,57 (C-3)

MS: m/z (%) = 148 (67,2) M^+ ; 113 (70,6) $[\text{M} - \text{Cl}]^+$; 103 (35,3) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H}]^+$; 102 (94,2) $[\text{M} - \text{HCO}_2\text{H}]^+$; 95 (5,8) $[\text{M} - \text{Cl} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 75 (51,8) $\text{C}_3\text{H}_4\text{Cl}^+$; 74 (34,8) $[\text{M} - \text{HCO}_2\text{H} - \text{CO}]^+$; 67 (9,9) $[\text{M} - \text{HCO}_2\text{H} - \text{Cl}]^+$; 57 (3,1); 49 (11,1); 45 (21,6) CO_2H^+ ; 39 (100,0) C_3H_3^+

***trans*-Chlorvinylpyruvat (9):**

^1H -NMR (d_4 -MeOH): δ (ppm) = 6,80 (dd, 1 H (H-4), $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 13,73$ Hz, $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 11,19$ Hz); 6,48 (dd, 1 H (H-5), $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 13,73$ Hz, $^4\text{J}(\text{H},\text{H}) = 1,02$ Hz); 6,14 (dd, 1 H (H-3), $^3\text{J}(\text{H},\text{H}) = 11,19$ Hz, $^4\text{J}(\text{H},\text{H}) = 1,02$ Hz)

^{13}C -NMR (d_4 -MeOH): δ (ppm) = 167,25 (C-1); 142,81 (C-2); 128,54 (C-4); 122,84 (C-5); 108,79 (C-3)

MS: m/z (%) = 148 (40,7) M^+ ; 113 (36,3) $[\text{M} - \text{Cl}]^+$; 103 (12,0) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H}]^+$; 102 (97,2) $[\text{M} - \text{HCO}_2\text{H}]^+$; 95 (6,5) $[\text{M} - \text{Cl} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 75 (21,0) $\text{C}_3\text{H}_4\text{Cl}^+$; 74 (25,8) $[\text{M} - \text{HCO}_2\text{H} - \text{CO}]^+$; 67 (5,6) $[\text{M} - \text{HCO}_2\text{H} - \text{Cl}]^+$; 57 (2,0); 49 (6,1); 45 (11,3) CO_2H^+ ; 39 (100,0) C_3H_3^+

Die für enzymatische Untersuchungen benötigten Substratlösungen wurden durch Verdünnen der von Protein befreiten Lösungen mit Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5) erhalten (Endkonzentration 10 mM). Diese Lösungen wurden immer frisch hergestellt.

3.1.8.4 Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat

Die folgende Versuchsdurchführung fand sowohl für das *cis*- wie auch das *trans*-Isomer Anwendung:

Es wurden je 15, 30 und 60 mg 2-Amino-5-chlor-4-pentensäure (**30**) nach obiger Vorschrift (3.1.8.3) zu Chlorvinylpyruvat (**9**) umgesetzt. Die durch Einrotieren erhaltenen Reaktionsprodukte wurden jeweils in 0,75 ml d_4 -Methanol aufgenommen und 5 Minuten bei 13500 Upm zentrifugiert. jeweils 700 μl des Überstands wurden mit 5 μl Ethanol versetzt und einer ^1H -NMR-spektroskopischen Messung unterworfen. Durch Vergleich der Integrale konnte aus der bekannten Ethanolkonzentration die Konzentration an 5-Chlor-2-oxo-4-pentensäure in jeder Probe berechnet werden.

Die Proben wurden 1:100 mit Methanol verdünnt und für verschiedene Volumina zwischen 10 und 100 μl aliquotiert, mit Methanol auf 1 ml aufgefüllt und die Extinktion beim Extinktionsmaximum von 278 nm bestimmt. Durch Auftragung der gemessenen Werte gegen die Substanzkonzentrationen der Lösungen wurden Geraden erhalten, deren Steigungen die Extinktionskoeffizienten ergaben.

Durch Mittelwertbildung konnten aus den Geradensteigungen für die beiden Konfigurationsisomere die folgenden Extinktionskoeffizienten bestimmt werden:

$$\epsilon_{278}(\textit{cis}\text{-Chlorvinylpyruvat}) = 19600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

$$\epsilon_{278}(\textit{trans}\text{-Chlorvinylpyruvat}) = 21500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

3.1.9 Synthese von (S)- und (R)-5-Chlor-4-hydroxy-2-oxoalerat

Die Darstellung der Enantiomeren 4-(S)- und 4-(R)-5-Chlor-4-hydroxy-2-oxoalerat sollte nach dem gleichen Syntheseweg erfolgen wie bei dem unchlorierten Kongeneren (Kap. 3.1.4). Hierbei konnte ausgenutzt werden, dass der im ersten Schritt eingesetzte Reaktand Epichlorhydrin enantiomerenrein erhältlich ist. Dadurch sollte die Diastereomerentrennung auf Stufe der Aminosäure (**33**) nicht notwendig sein, da die Syntheseprodukte bezüglich des Stereozentrums an Position 4 enantiomerenrein sind. Um auf dieser Ebene die gut wasserlöslichen Produkte von anorganischen Salzen zu trennen, wurde eine Ionenaustauschchromatographie unter den selben Bedingungen wie bei dem unchlorierten Analogon durchgeführt. Die Elution mit 1 M NH_3 -Lösung hatte jedoch eine Deprotonierung der OH-Funktion mit anschließender Substitution des Chloratoms an C-5 zur Folge, so dass anstelle des gewünschten 1,2-Chlor-Hydroxy-Substitutionsmusters ein Epoxid (**34**) isoliert wurde.

Um dennoch das 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxoalerat (**10**) zu erhalten, wurde eine weitere zeitgleich begonnene Synthese fortgeführt. Nach DREFAHL & HÖRLUND (1964) konnte durch Addition von Allylchlorid an Oxalsäureethylesternitroxid (**35**) 5-Chlormethylisoxazolin-3-carbonsäureethylester (**36**) erhalten werden. Der 1,3-Dipol dieser [4+2]-Cycloaddition wurde in situ durch basenkatalysierte HCl-Eliminierung aus 2-Chlor-2-hydroxyiminoessigsäureethylester gewonnen. Saure Hydrolyse des Esters und anschließende Reduktion lieferte die 2-Amino-5-chlor-4-hydroxypentansäure (**33**).

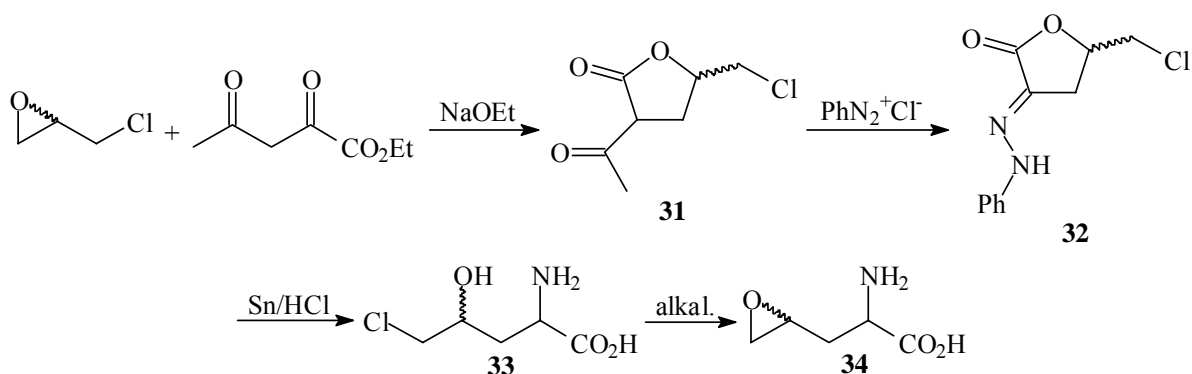


Abb. 3.13: Synthese von 4-(S)-/4-(R)-4,5-Epoxy-2-oxopentansäure (34).

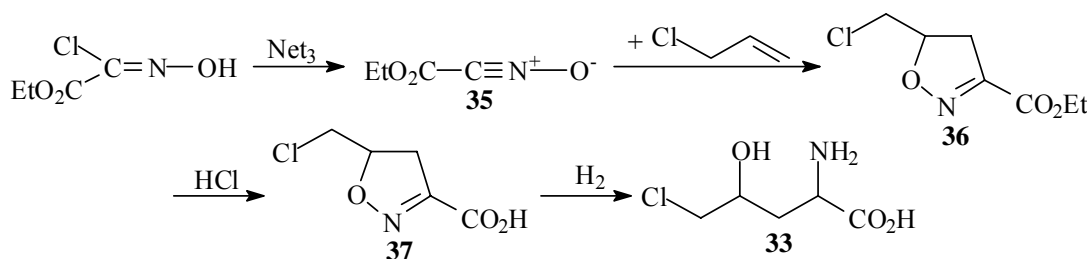


Abb. 3.14: Synthese von 2-Amino-5-Chlor-4-hydroxypentansäure (33).

In diesem Fall war nun wiederum eine chromatographische Trennung der Diastereomere notwendig, um durch gezielten Einsatz der Aminosäureoxidasen enantiomerenreine Produkte zu erhalten.

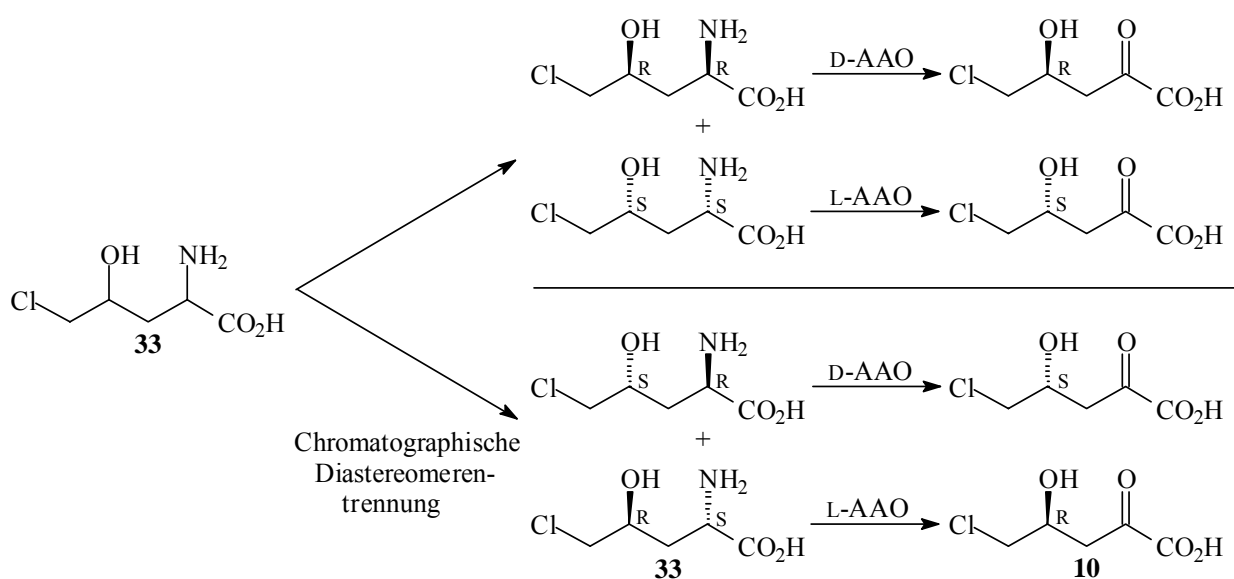


Abb. 3.15: Diastereomertrennung von 2-Amino-5-chlor-4-hydroxypentansäure (33) und Gewinnung von enantiomerenreinem 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerat (10, es sind die absoluten Konfigurationen dargestellt).

Die Diastereomere wurden entsprechend dem unchlorierten Analogon durch Erhitzen in 6 N Salzsäure zur Bestimmung der Konstitution zum 3-Amino-5-chlormethyldihydro-2-furanonhydrochlorid (**38**) umgesetzt.

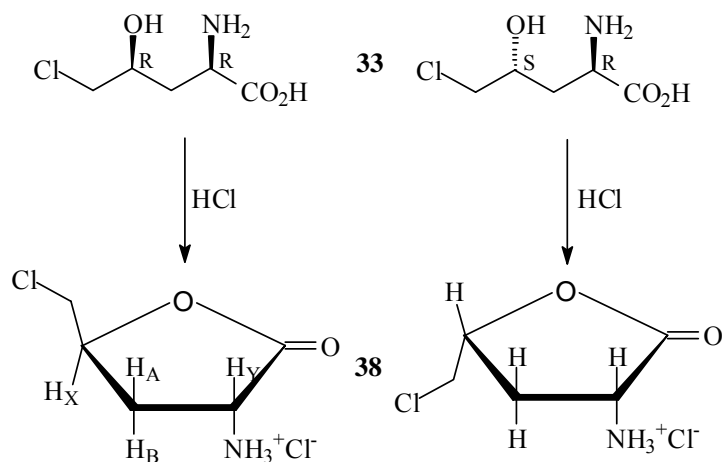
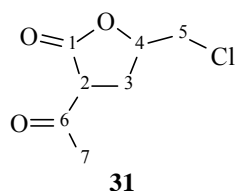


Abb. 3.16: Konstitutionsbestimmung der Diastereomeren (**33**) durch Lactonisierung (es ist stellvertretend jeweils nur ein Enantiomer dargestellt).

3.1.9.1 (S)- und (R)-3-Acetyl-5-chlormethyldihydro-2-furanon

1,5 g (63,9 mmol) Natrium wurden in 50 ml abs. Ethanol gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. Es folgte die Zugabe von 8,3 g (8,1 ml, 63,9 mmol) Acetessigsäureethylester. Die Reaktionsmischung wurde für 30 Minuten bei 0 °C gerührt und dann innerhalb von 0,5 h mit 5,9 g (5,0 ml, 63,9 mmol) Epichlorhydrin versetzt. Nachdem für 20 h auf 50 °C erhitzt wurde, folgte Hydrolyse mit 150 ml Wasser. Es wurde dreimal mit je 100 ml Diethylether gewaschen und die Waschphasen verworfen. Die wässrige Phase wurde mit Eisessig sauer gestellt, dreimal mit jeweils 100 ml Ether extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der dabei angefallene Rückstand wurde mit 20 ml CHCl₃ versetzt, auf 0 °C gekühlt und abgesaugt. Nachdem das Filtrat im Vakuum vom Lösungsmittel befreit worden war, folgte eine fraktionierte Vakuumdestillation über eine 10 cm-Vigreux-Kolonnen.



Wegen des im Produkt vorhandenen zweiten Stereozentrums an C-2 wurden jeweils Diastereomerenmischungen erhalten. In den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren überlappten die Signale teilweise, so dass eine exakte Auswertung der Spektren nicht möglich war. Die Zuordnung der Resonanzen erfolgte aufgrund der Signalintensitäten sowie ^{13}C , ^1H -Shift-korrelierten 2D-NMR-Spektren.

(R)-3-Acetyl-5-chlormethyldihydro-2-furanon (31):

Ausbeute: 6,3 g (56 %) farblose Flüssigkeit. **Sdp.:** 77 – 80 °C (0,5 mbar)

$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -Aceton): δ (ppm) = 4,78 - 4,86/4,65 - 4,73 (m, 1 H (H-4)); 3,86 - 3,91/3,76 - 3,83 (m, 1 H (H-2)); 3,76 - 3,86 (m, 1 H (H-5)); 3,65 - 3,71 (m, 1 H (H-5)); 3,65 - 3,71 (m, 2 H (H-5)); 2,90 - 2,99/2,63 - 2,72/2,39 - 2,46/2,16 - 2,25 (m, je 1 H (H-3)); 2,47/2,45 (s, 3 H (H-7))

$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -Aceton): δ (ppm) = 199,40 (C-6); 171,26 (C-1); 77,32/76,48 (C-4); 53,89/53,43 (C-2); 46,34/45,95 (C-5); 45,06 (C-5); 29,36/29,20 (C-7); 26,48/26,26 (C-3)

MS: m/z (%) = 176 (7,1) M^+ ; 161 (3,4) $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$; 134 (78,6) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO}]^+$; 127 (46,2) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{Cl}]^+$; 99 (30,9) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{Cl} - \text{CO}]^+$; 85 (8,6) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{Cl} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$; 81 (6,6); 70 (6,8); 62 (5,5); 55 (35,7) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{Cl} - \text{CO} - \text{CO}_2]^+$; 43 (100,0) CH_3CO^+

(S)-3-Acetyl-5-chlormethyldihydro-2-furanon (31):

Ausbeute: 5,7 g (51 %) farblose Flüssigkeit. **Sdp.:** 85 – 87 °C (0,5 mbar)

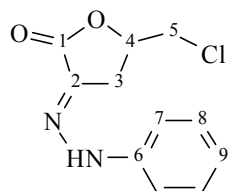
$^1\text{H-NMR}$ (d_6 -Aceton): δ (ppm) = 4,77 - 4,85/4,64 - 4,72 (m, 1 H (H-4)); 3,85 - 3,91/3,75 - 3,82 (m, 1 H (H-2)); 3,75 - 3,82 (m, 1 H (H-5)); 3,64 - 3,70 (m, 1 H (H-5)); 3,64 - 3,70 (m, 2 H (H-5)); 2,87 - 2,95/2,59 - 2,68/2,38 - 2,47/2,14 - 2,23 (m, je 1 H (H-3)); 2,44/2,42 (s, 3 H (H-7))

$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -Aceton): δ (ppm) = 199,38 (C-6); 171,28 (C-1); 77,36/76,52 (C-4); 53,79/53,36 (C-2); 46,32/45,98 (C-5); 45,07 (C-5); 29,30/29,14 (C-7); 26,42/26,22 (C-3)

MS: m/z (%) = 176 (8,2) M^+ ; 161 (3,7) $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$; 134 (79,5) $[\text{M} - \text{CH}_3\text{CO}]^+$; 127 (47,9) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{Cl}]^+$; 99 (38,3) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{Cl} - \text{CO}]^+$; 85 (10,5) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{Cl} - \text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^+$; 81 (8,8); 70 (8,3); 62 (6,9); 60 (10,9); 55 (35,9) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{Cl} - \text{CO} - \text{CO}_2]^+$; 43 (100,0) CH_3CO^+

3.1.9.2 (S)- und (R)-5-Chlormethyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon

2,9 g (2,8 ml, 31,1 mmol) frisch destilliertes Anilin wurden in 15 ml 5 N Salzsäure bei 0 - 5 °C mit 2,1 g (31,1 mmol) NaNO₂ in 15 ml H₂O unter Rühren diazotiert. Diese Diazoniumsalzlösung wurde sofort bei 0 - 5 °C zu einer Lösung von 5,5 g (31,1 mmol) 3-Acetyl-5-chlormethyldihydro-2-furanon (**31**) in 15 ml Pyridin und 15 ml Wasser getropft. Das ausgefallene Produkt wurde unverzüglich abgesaugt und aus Ethanol/Essigester umkristallisiert.



32

(R)-5-Chlormethyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon (**32**):

Ausbeute: 5,1 g (69 %) leicht gelbliche Kristalle. **Smp.:** 186 - 187 °C

¹H-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 9,47 (s, 1 H (NH)); 7,26 (m, 4 H (H-7/8)); 6,93 (m, 1 H (H-9)); 5,04 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 8,68 Hz, ³J(H,H) = 4,71 Hz, ³J(H,H) = 4,38 Hz, ³J(H,H) = 4,35 Hz); 3,95 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = 11,91 Hz, ³J(H,H) = 4,35 Hz); 3,91 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = 11,91 Hz, ³J(H,H) = 4,71 Hz); 3,21 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 18,60 Hz, ³J(H,H) = 8,68 Hz); 2,89 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 18,60 Hz, ³J(H,H) = 4,38 Hz)

¹³C-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 167,36 (C-1); 145,68 (C-2); 131,73 (C-6); 130,72 (C-7); 123,33 (C-9); 115,47 (C-8); 75,53 (C-4); 48,73 (C-5); 29,38 (C-3)

MS: m/z (%) = 238 (68,7) M⁺; 202 (2,3) [M -HCl]⁺; 185 (3,1) [M -Cl -H₂O]⁺; 171 (31,5) [M -CH₂Cl -H₂O]⁺; 159 (7,2) [M -Cl -CO₂]⁺; 157 (5,4) [M -Cl -CO -H₂O]⁺; 145 (46,3) [M -CH₂Cl -CO₂]⁺; 118 (6,8) Ph-NH-N=CH⁺; 105 (16,4) Ph-NH-N⁺; 92 (100,0) Ph-NH⁺; 91 (58,7) Ph-N⁺; 77 (70,0) C₆H₅⁺; 65 (93,8) C₅H₅⁺; 56 (7,3); 51 (8,5); 49 (10,6); 39 (30,0) C₃H₃⁺

EA: ber. für C₁₁H₁₁ClN₂O₂: C 55,36; H 4,65; N 11,74; gef.: C 55,47; H 4,54; N 11,87

(S)-5-Chlormethyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon (**32**):

Ausbeute: 4,5 g (61 %) leicht gelbliche Kristalle. **Smp.:** 186 - 187 °C

¹H-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 9,46 (s, 1 H (NH)); 7,25 (m, 4 H (H-7/8)); 6,93 (m, 1 H (H-9)); 5,03 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 8,56 Hz, ³J(H,H) = 4,40 Hz, ³J(H,H) = 4,24 Hz, ³J(H,H) = 4,21 Hz); 3,94 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = 11,77 Hz, ³J(H,H) = 4,21 Hz); 3,90 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = 11,77 Hz, ³J(H,H) = 4,24 Hz); 3,21 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 18,32 Hz, ³J(H,H) = 8,56 Hz); 2,88 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 18,32 Hz, ³J(H,H) = 4,40 Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$ (d_6 -Aceton): δ (ppm) = 167,37 (C-1); 145,66 (C-2); 131,73 (C-6); 130,72 (C-7); 123,33 (C-9); 115,47 (C-8); 75,52 (C-4); 48,73 (C-5); 29,37 (C-3)

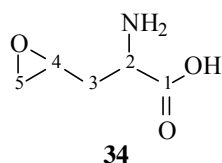
MS: m/z (%) = 238 (70,9) M^+ ; 185 (3,6) $[\text{M} - \text{Cl} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 171 (32,2) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{Cl} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 159 (5,4) $[\text{M} - \text{Cl} - \text{CO}_2]^+$; 157 (3,6) $[\text{M} - \text{Cl} - \text{CO} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 145 (51,6) $[\text{M} - \text{CH}_2\text{Cl} - \text{CO}_2]^+$; 118 (6,2) $\text{Ph-NH-N}=\text{CH}^+$; 105 (14,3) Ph-NH-N^+ ; 92 (100,0) Ph-NH^+ ; 91 (58,8) Ph-N^+ ; 77 (70,1) C_6H_5^+ ; 65 (99,2) C_5H_5^+ ; 56 (7,0); 51 (6,3); 49 (8,8); 39 (33,1) C_3H_3^+

EA: ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2$: C 55,36; H 4,65; N 11,74; gef.: C 55,63; H 4,73; N 12,00

3.1.9.3 (S)- und (R)-2-Amino-4,5-epoxypentansäure

4,2 g (17,6 mmol) 5-Chlormethyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon (**32**) wurden in 100 ml konz. HCl gelöst, mit 8,4 g (70,4 mmol) Zinn-Granulat versetzt und so lange gerührt, bis das gesamte Zinn in Lösung gegangen war. Nach ca. 8 Stunden Reaktionszeit wurde die Reaktionsmischung einrotiert und der Rückstand in möglichst wenig Wasser aufgenommen. Durch diese Lösung wurde nun H_2S geleitet und der ausgefallene Niederschlag abgesaugt. Nach Neutralisation dieser Lösung mit NaHCO_3 konnte wiederum ein Niederschlag abgesaugt und die wässrige Phase zweimal mit dem jeweils gleichen Volumen Ether gewaschen werden. Die wässrige Lösung wurde unter möglichst milden Bedingungen einrotiert und mit wenig Methanol versetzt. Der Rückstand wurde abfiltriert und die organische Phase einrotiert.

Das hierbei angefallene Öl wurde in ca. 30 ml Wasser aufgenommen und einer zur Entsalzung Ionenaustauschchromatographie mit Dowex 50WX4 als Säulenmaterial unterworfen. Im Fall des 4-(R)-Enantiomers konnten in den Fraktionen 38 – 47 dünnschichtchromatographisch (Kieselgel 60, Merck; Laufmittel $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1; Anfärbung mit Ninhydrin) zwei nicht getrennte Produkte gefunden werden ($R_f = 0,70$ und $R_f = 0,56$). Für das 4-(S)-Enantiomer fand sich in den Fraktionen 38 – 45 ein Produkt mit einem R_f -Wert von 0,69. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer vorsichtig bis zur Trockne vom Lösungsmittel befreit.



(4R)-2-Amino-4,5-epoxypentansäure (34):

Ausbeute: 1,3 g (57 %) farbloser Feststoff.

Smp.: 214 - 216 °C

Es sind die NMR-Daten eines im Überschuss erhaltenen Diastereomers angegeben.

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 4,54 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 7,63 Hz, ³J(H,H) = 3,83 Hz, ³J(H,H) = -2,10 Hz); 4,17 (m, 1 H (H-2), ³J(H,H) = 10,67 Hz, ³J(H,H) = -0,05 Hz); 3,43 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = -12,51 Hz, ³J(H,H) = 7,64 Hz, ⁴J(H,H) = 3,50 Hz, ⁴J(H,H) = 2,02 Hz); 3,33 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = -12,51 Hz, ³J(H,H) = 3,83 Hz, ⁴J(H,H) = 5,00 Hz, ⁴J(H,H) = 2,91 Hz); 2,47 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 14,79 Hz, ³J(H,H) = 10,67 Hz, ⁴J(H,H) = 5,00 Hz, ⁴J(H,H) = 3,50 Hz); 2,21 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 14,79 Hz, ³J(H,H) = -0,05 Hz, ³J(H,H) = -2,10 Hz, ⁴J(H,H) = 2,91 Hz, ⁴J(H,H) = 2,02 Hz)

¹³C-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 176,68 (C-1); 71,40 (C-4); 61,98 (C-2); 55,18 (C-5); 39,38 (C-3)

MS (CI): m/z (%) = 263 (0,73) [2M +H]⁺; 132 (48,5) [M +H]⁺; 114 (2,9) [M -OH]⁺; 86 (16,5) [M -CO₂H]⁺; 68 (3,1) [M -CO₂H -H₂O]⁺; 57 (85,4) [C₄H₉⁺]; 43 (100,0) [C₃H₇⁺]; 42 (19,4) CH₂=C-NH₂⁺

EA: ber. für C₅H₉NO₃: C 45,80; H 6,92; N 10,68; gef.: C 44,05; H 6,99; N 11,09

(4S)-2-Amino-4,5-epoxypentansäure (34):

Ausbeute: 0,8 g (35 %) farbloser Feststoff.

Smp.: 229 - 233 °C

Es sind die NMR-Daten eines im Überschuss erhaltenen Diastereomers angegeben.

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 4,53 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 4,52 Hz, ³J(H,H) = 4,17 Hz, ³J(H,H) = 2,12 Hz, ³J(H,H) = 1,86 Hz); 4,16 (m, 1 H (H-2), ³J(H,H) = 10,42 Hz, ³J(H,H) = 3,89 Hz); 3,41 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = -12,40 Hz, ³J(H,H) = 2,12 Hz, ⁴J(H,H) = 0,76 Hz); 3,32 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = -12,40 Hz, ³J(H,H) = 4,17 Hz, ⁴J(H,H) = 3,30 Hz); 2,46 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 14,31 Hz, ³J(H,H) = 10,42 Hz, ³J(H,H) = 4,52 Hz); 2,20 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 14,31 Hz, ³J(H,H) = 3,89 Hz, ³J(H,H) = 1,86 Hz, ⁴J(H,H) = 3,30 Hz, ⁴J(H,H) = 0,76 Hz)

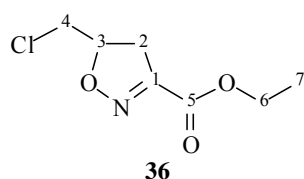
¹³C-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 176,68 (C-1); 71,39 (C-4); 61,97 (C-2); 55,17 (C-5); 39,37 (C-3)

MS (CI): m/z (%) = 132 (9,8) [M +H]⁺; 114 (0,8) [M -OH]⁺; 86 (2,3) [M -CO₂H]⁺; 57 (100,0) [C₄H₉⁺]; 43 (69,6) [C₃H₇⁺]; 42 (11,1) CH₂=C-NH₂⁺

EA: ber. für C₅H₉NO₃: C 45,80; H 6,92; N 10,68; gef.: C 44,39; H 6,93; N 10,88

3.1.9.4 5-Chlormethylisoxazolin-3-carbonsäureethylester

22,0 g (23,5 ml, 0,29 mol) Allylchlorid und 21,8 g (0,14 mol) 2-Chlor-2-hydroxyiminoessigsäureethylester wurden in 300 ml abs. Diethylether gelöst. Unter Eiskühlung folgte die Zugabe einer Lösung von 14,6 g (20,1 ml, 0,14 mol) Triethylamin in abs. Ether innerhalb von zwei Stunden so, dass die Temperatur der Reaktionsmischung unter 10 °C blieb. Es wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, der entstandene Niederschlag abgesaugt und das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit. Durch Umkondensation im Hochvakuum wurde aus dem Rückstand ein farbloses Öl erhalten, welches bei Zugabe von wenig Ether unter Kühlung kristallisierte.



Ausbeute: 9,7 g (36%) farblose Kristalle.

Smp.: 39-40 °C

¹H-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 5,10 (m, 1 H (H-3), ³J(H,H) = 11,43 Hz, ³J(H,H) = 7,33 Hz, ³J(H,H) = 4,83 Hz, ³J(H,H) = 4,62 Hz); 4,26 (q, 2 H (H-6), ³J(H,H) = 7,12 Hz); 3,80 (m, 1 H (H-4), ²J(H,H) = 11,76 Hz, ³J(H,H) = 4,62 Hz); 3,78 (m, 1 H (H-4), ²J(H,H) = 11,76 Hz, ³J(H,H) = 4,83 Hz); 3,40 (m, 1 H (H-2), ²J(H,H) = 17,91 Hz, ³J(H,H) = 11,43 Hz); 3,14 (m, 1 H (H-2), ²J(H,H) = 17,91 Hz, ³J(H,H) = 7,33 Hz); 1,28 (t, 3 H (H-7), ³J(H,H) = 7,13)

¹³C-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 161,68 (C-5); 153,13 (C-1); 83,62 (C-3); 62,91 (C-6); 46,91 (C-4); 38,25 (C-2); 15,02 (C-7)

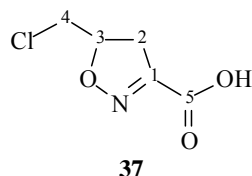
MS: m/z (%) = 191 (22,9) M⁺; 163 (8,3) [M - C₂H₄]⁺; 146 (29,7) [M - OCH₂CH₃]⁺; 142 (23,4) [M - CH₂Cl]⁺; 114 (6,0) [M - CH₂Cl - C₂H₄]⁺; 101 (4,3); 96 (5,7) [M - CH₂Cl - C₂H₄ - H₂O]⁺; 81 (10,8); 73 (34,2); 70 (44,3) [M - CH₂Cl - C₂H₄ - CO₂]⁺; 53 (19,8); 49 (26,1) CH₂Cl⁺; 42 (100,0) [70-CO]⁺

EA: ber. für C₇H₁₀ClNO₃: C 43,88; H 5,26; N 7,31; gef.: C 43,58; H 5,26; N 7,24

3.1.9.5 5-Chlormethylisoxazolin-3-carbonsäure

6,5 g (33,9 mmol) 5-Chlormethylisoxazolin-3-carbonsäureethylester (**36**) wurden für 1 Woche in 50 ml konz. HCl bei Raumtemperatur gerührt. Zur Vervollständigung der Reaktion wurde die Lösung anschließend für 12 Stunden auf 40 °C erhitzt, bevor die Salzsäure bei derselben Temperatur im Vakuum abdestilliert wurde. Der Rückstand wurde mit ca. 5 ml Diethylether versetzt und auf 0 °C abgekühlt. Nachdem das ausgefallene, nicht umgesetzte Edukt abgesaugt

war, wurde das Filtrat vom Lösungsmittel befreit, woraufhin es unter Kühlung kristallisierte. Das Rohprodukt wurde durch Umkristallisation Toluol/Diethylether gereinigt.



Ausbeute: 3,7 g (67 %) farblose Kristalle.

Smp.: 99-100 °C

¹H-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 5,11 (m, 1 H (H-3), ³J(H,H) = 11,38 Hz, ³J(H,H) = 7,23 Hz, ³J(H,H) = 4,75 Hz, ³J(H,H) = 4,55 Hz); 3,81 (m, 1 H (H-4), ²J(H,H) = 11,69 Hz, ³J(H,H) = 4,55 Hz); 3,78 (m, 1 H (H-4), ²J(H,H) = 11,69 Hz, ³J(H,H) = 4,75 Hz); 3,39 (m, 1 H (H-2), ²J(H,H) = 17,84 Hz, ³J(H,H) = 11,38 Hz); 3,14 (m, 1 H (H-2), ²J(H,H) = 17,84 Hz, ³J(H,H) = 7,23 Hz)

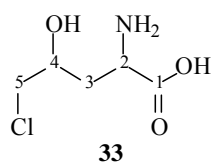
¹³C-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 162,30 (C-5); 153,27 (C-1); 83,75 (C-3); 47,00 (C-4); 38,20 (C-2)

MS: m/z (%) = 163 (13,2) M⁺; 114 (72,2) [M -CH₂Cl]⁺; 96 (5,4) [M -CH₂Cl -H₂O]⁺; 79 (12,7); 70 (28,1) [M -CH₂Cl -CO₂]⁺; 54 (24,5); 49 (13,1) ClCH₂⁺; 45 (78,8) CO₂H⁺; 44 (53,9) CO₂⁺; 42 (100,0) [M -CH₂Cl -CO₂ -CO]⁺; 41 (34,0) [M -CH₂Cl -CO₂H -CO]⁺; 36 (25,7) HCl⁺

EA: ber. für C₅H₆ClNO₃: C 36,72; H 3,70; N 8,56; gef.: C 36,45; H 3,54; N 8,51

3.1.9.6 2-Amino-5-chlor-4-hydroxypentansäure

1,7 g (10,4 mmol) 5-Chlormethylisoxazolin-3-carbonsäure (**37**) wurden zusammen mit 45 mg Palladium/Aktivkohle (5 %) in 45 ml abs. Ethanol für 2 Tage unter 5 bar Wasserstoffatmosphäre (Autoklav) gerührt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und die Mutterlauge am Rotationsverdampfer bei 40 °C Badtemperatur auf ca. 10 ml eingengt. Es wurde ebenfalls filtriert und die vereinigten Rückstände mit 50 ml Wasser aufgekocht und heiß filtriert. Nachdem der Rückstand mit 20 ml heißem Wasser gewaschen wurde, konnten die vereinigten wässrigen Phasen vorsichtig einrotiert werden. Der dabei erhaltene Rückstand wurde zur Auftrennung in die Diastereomere einer Säulenchromatographie (Cellulose, Merck; Vorlauf 200 ml) unterworfen. Die Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie (Cellulose, Merck; selbes Laufmittel; Anfärbung mit Ninhydrin) auf die Produktverteilung untersucht. Es konnten zwei Produkte mit unterschiedlichen R_f-Werten jeweils in den Fraktionen 14 – 27 (R_f = 0,50, Fraktion A) und 29 - 42 (R_f = 0,25, Fraktion B) festgestellt werden. Durch vorsichtiges Einrotieren wurde aus beiden Fraktionen jeweils ein farbloser Feststoff in den folgenden Ausbeuten gewonnen:

**Fraktion A:****Ausbeute:** 355 mg (20 %) farbloser Feststoff.**Smp.:** 195 - 198 °C (Zers.)

¹H-NMR (D₂O): δ (ppm) = 4,06 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 10,06 Hz, ³J(H,H) = 5,79 Hz, ³J(H,H) = 4,13 Hz, ³J(H,H) = 2,83 Hz); 3,96 (m, 1 H (H-2), ³J(H,H) = 6,95 Hz, ³J(H,H) = 4,03 Hz); 3,69 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = -11,51 Hz, ³J(H,H) = 4,13 Hz, ⁴J(H,H) = 1,39 Hz, ⁴J(H,H) = 1,21 Hz); 3,61 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = -11,51 Hz, ³J(H,H) = 5,79 Hz, ⁴J(H,H) = 1,45 Hz, ⁴J(H,H) = 1,43 Hz); 2,15 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 15,61 Hz, ³J(H,H) = 6,95 Hz, ³J(H,H) = 2,83 Hz, ⁴J(H,H) = 1,43 Hz, ⁴J(H,H) = 1,21 Hz); 2,12 (m, 1 H (H-3), ²J(H,H) = 15,61 Hz, ³J(H,H) = 10,06 Hz, ³J(H,H) = 4,03 Hz, ⁴J(H,H) = 1,45 Hz, ⁴J(H,H) = 1,39 Hz)

¹³C-NMR (D₂O): δ (ppm) = 176,12 (C-1); 70,50 (C-4); 54,92 (C-2); 51,08 (C-5); 35,60 (C-3)

MS: m/z (%) = 122 (2,7) [M -CO₂H]⁺; 86 (16,6) [M -HCl -CO₂H]⁺; 74 (5,1) H₂N-CH-CO₂H⁺; 72 (20,1) [M -CO₂ -Cl -NH₂]⁺; 70 (21,7) [M -CO₂ -Cl -H₂O]⁺; 68 (11,0) [M -HCl -CO₂H -H₂O]⁺; 56 (26,5) H₂N-C=C=O⁺; 44 (38,2) CO₂⁺

EA: ber. für C₅H₁₀ClNO₃: C 35,83; H 6,01; N 8,36; gef. C 35,91; H 6,18; N 8,25

In Analogie zu dem unchlorierten Kongeneren (3.1.4.3) zeigt sich auch hier im ¹H-NMR-Spektrum durch die gleiche chemische Verschiebung der Resonanzsignale der Methylen-Protonen das Vorliegen der threoiden Aminosäure.

Fraktion B:**Ausbeute:** 3 mg (2 %) farbloser Feststoff.**Smp.:** 184 - 187 °C (Zers.)

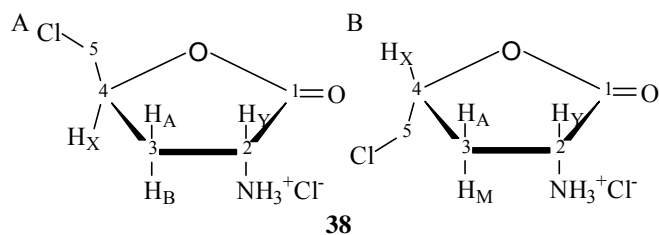
Aufgrund der geringen Menge war leider nur eine massenspektrometrische Analyse möglich.

MS (CI): m/z (%) = 189 (1,9) [M +C₄H₉ -Cl]⁺; 175 (2,0) [M +C₃H₇ -Cl]⁺; 158 (35,6) [M +C₃H₇ -HCl -NH₂]⁺; 132 (1,0) [M -Cl]⁺; 118 (100,0) [M -CH₂Cl]⁺; 116 (50,6) [M -Cl -NH₂]⁺; 98 (2,5) [M -Cl -NH₂ -H₂O]⁺; 72 (16,1) [M -Cl -NH₂ -CO₂]⁺; 57 (32,0) [C₄H₉⁺]; 43 (33,5) [C₃H₇⁺]

3.1.9.7 3-Amino-5-methyldihydro-2-furanonhydrochlorid

25 mg (0,15 mmol) des unter 3.1.9.6 aus Fraktion A erhaltenen 2-Amino-5-chlor-4-hydroxypentansäure-Racemats (**33**) wurden für 1,5 Stunden in 15 ml 6 N Salzsäure auf 80 °C erhitzt und anschließend zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde im Exsikkator getrocknet

und NMR-spektroskopisch sowie massenspektrometrisch untersucht. Auf eine weitere Reinigung wurde dabei verzichtet.



¹H-NMR (D₂O): δ (ppm) = 4,87 (m, 1 H (H_X), ²J(H,H) = 5,50 Hz, ³J(H,H) = 10,21 Hz, ³J(H,H) = 4,91 Hz, ³J(H,H) = 3,96 Hz); 4,48 (m, 1 H (H_Y), ³J(H,H) = 11,71 Hz, ³J(H,H) = 8,73 Hz); 3,92 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = 12,36 Hz, ³J(H,H) = 3,96 Hz); 3,81 (m, 1 H (H-5), ²J(H,H) = 12,36 Hz, ³J(H,H) = 4,91 Hz); 2,83 (m, 1 H (H_A), ²J(H,H) = 12,34 Hz, ³J(H,H) = 8,73 Hz, ³J(H,H) = 5,50 Hz); 2,22 (m, 1 H (H_M), ²J(H,H) = 12,34 Hz, ³J(H,H) = 11,71 Hz, ³J(H,H) = 10,21 Hz)

¹³C-NMR (D₂O): δ (ppm) = 172,59 (C-1); 78,23 (C-4); 50,53 (C-2); 45,55 (C-5); 31,45 (C-3)

MS (CI): m/z (%) = 299 (13,7) [2M + H]⁺; 219 (1,8) [2M + H - 2Cl]⁺; 190 (3,4) [M + C₄H₉ - NH₃]⁺; 150 (94,2) [M + H]⁺; 114 (2,0) [M - Cl]⁺; 70 (13,7) [M - Cl - CO₂]⁺; 57 (100,0) [C₄H₉⁺]; 56 (9,9) [M - Cl - CO₂ - CH₂]⁺; 43 (98,6) [C₃H₇⁺]

Die Aussage über die Stereochemie der isolierten Aminosäure (**33**) wird durch die kernresonanzspektroskopische Vermessung des Lactons (**38**) bestätigt. Im ¹H-NMR-Spektrum weisen die Resonanzsignale der beiden Wasserstoffatome der Methylgruppe eine stark unterschiedliche chemische Verschiebung auf. Zusammen mit den beiden benachbarten Protonen stellen sie also ein AMXY-Spinsystem dar. Dieses Ergebnis geht mit der jeweils unterschiedlichen Umgebung der beiden Kerne im Lacton B konform.

3.1.9.8 (S)- und (R)-5-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerat

Um spektroskopische Daten des 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerats (**10**) zu erhalten, wurden im NMR-Röhrchen 10 mg (0,06 mmol) 2-Amino-5-chlor-4-hydroxypentansäure (**33**) in 0,5 ml 50 mM Phosphat-Puffer (Na₂DPO₄/KD₂PO₄ in D₂O) gelöst und mit einer Lösung aus je 3 mg D- und

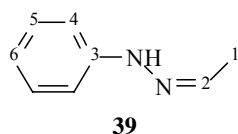
L-Aminosäureoxidase in 0,5 ml 0,1 M NaCl-Lösung (D₂O) versetzt. Nach der Zugabe von 10 µl Catalase wurde die Mischung für 30 Minuten auf 37 °C erwärmt und anschließend vermessen.

Hierbei wurde deutlich, dass sich in dem Reaktionsansatz eine noch beträchtliche Menge Edukt befand (Intensitätsverhältnis Edukt:Produkt ca. 2,6:1), also kein vollständiger Umsatz stattgefunden hatte. Die Umsetzung wurde unter anderen Bedingungen wiederholt, indem jeweils 5 mg Enzym eingesetzt und die Reaktionszeit auf 1,5 Stunden verlängert wurde. In diesem Fall konnte das Verhältnis von Produkt zu Edukt nicht gesteigert werden.

In einem dritten Ansatz wurden 5 mg (0,03 mmol) Edukt mit jeweils 10 mg Oxidase versetzt, was jedoch keine Ergebnisverbesserung mit sich brachte.

3.1.10 Acetaldehydphenylhydrazon

2,0 g (2,6 ml, 45 mmol) wurden in 10 ml abs. Toluol gelöst und unter Inertgas tropfenweise mit 5,0 g (4,5 ml, 46 mmol) Phenylhydrazin versetzt. Die Mischung wurde mit 5 ml Essigester verdünnt, über Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Nach Kühlung des Rohprodukts auf -20 °C erfolgte Kristallisation, so dass anschließend durch Umkristallisation aus Ethanol gereinigt werden konnte.



Ausbeute: 3,9 g (65 %) gelbe Kristalle.

Smp.: 96 - 100 °C (Lit.: 93 - 100 °C, BELLAMY & GUTHRIE, 1965)

¹H-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 8,40 (s, 1 H (NH)); 7,16 (m, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 8,10 Hz, ³J(H,H) = 7,34 Hz, ⁴J(H,H) = 1,70 Hz, ⁵J(H,H) = 0,63 Hz); 7,16 (m, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 8,26 Hz, ³J(H,H) = 7,43 Hz, ⁴J(H,H) = 1,70 Hz, ⁵J(H,H) = 0,28 Hz); 7,09 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 8,10 Hz, ⁴J(H,H) = 1,32 Hz, ⁴J(H,H) = 1,06 Hz, ⁵J(H,H) = 0,28 Hz); 7,09 (m, 1 H (H-4), ³J(H,H) = 8,26 Hz, ⁴J(H,H) = 1,23 Hz, ⁴J(H,H) = 1,06 Hz, ⁵J(H,H) = 0,63 Hz); 6,73 (m, 1 H (H-6), ³J(H,H) = 7,43 Hz, ³J(H,H) = 7,34 Hz, ⁴J(H,H) = 1,32 Hz, ⁴J(H,H) = 1,23 Hz); 6,54 (q, 1 H (H-2), ³J(H,H) = 5,60 Hz); 1,85 (d, 3 H (H-1), ³J(H,H) = 5,59 Hz)

¹³C-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 148,01 (C-3); 136,17 (C-2); 130,40 (C-4); 120,53 (C-6); 114,26 (C-5); 13,52 (C-1)

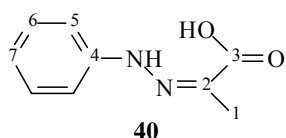
MS: m/z (%) = 134 (100,0) M⁺; 119 (6,6) [M -CH₃]⁺; 105 (3,6) Ph-NH-N⁺; 92 (67,4) Ph-NH⁺; 91 (3,5) Ph-N⁺; 77 (4,9) C₆H₅⁺; 65 (28,7) C₅H₅⁺

EA: ber. für C₈H₁₀N₂: C 71,61; H 7,51; N 20,88; gef. C 71,06; H 7,34; N 19,97

Die NMR-Daten stimmen mit von BARCHIESI et al. (1988) angegebenen Werten überein.

3.1.11 Pyruvat-Phenylhydrazon

0,5 g (0,45 ml, 4,6 mmol) Phenylhydrazin wurden in einer Mischung aus 3 ml Wasser und 10 ml Ethanol gelöst und mit 2 ml konz. H₂SO₄ versetzt. Es folgte die Zugabe einer Lösung von 0,4 g (4,6 mmol) Pyruvat in 10%igem Ethanol. Das ausgefallene Produkt wurde abgesaugt und aus Ethanol umkristallisiert.



Ausbeute: 0,58 g (71 %) gelbe Kristalle.

Smp.: 191 - 195 °C (Lit.: 189 - 194 °C, PANETTA & MILLER, 1978)

¹H-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 9,24 (s, 1 H (NH)); 7,36 (m, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 8,19 Hz, ⁴J(H,H) = 2,14 Hz, ⁴J(H,H) = 0,94 Hz, ⁵J(H,H) = 0,53 Hz); 7,36 (m, 1 H (H-5), ³J(H,H) = 8,36 Hz, ⁴J(H,H) = 2,14 Hz, ⁴J(H,H) = 1,19 Hz, ⁵J(H,H) = 0,49 Hz); 7,25 (m, 1 H (H-6), ³J(H,H) = 8,19 Hz, ³J(H,H) = 7,54 Hz, ⁴J(H,H) = 1,78 Hz, ⁵J(H,H) = 0,49 Hz); 7,25 (m, 1 H (H-6), ³J(H,H) = 8,36 Hz, ³J(H,H) = 7,23 Hz, ⁴J(H,H) = 1,78 Hz, ⁵J(H,H) = 0,53 Hz); 6,90 (m, 1 H (H-7), ³J(H,H) = 7,54 Hz, ³J(H,H) = 7,23 Hz, ⁴J(H,H) = 1,19 Hz, ⁴J(H,H) = 0,94 Hz); 2,09 (s, 3 H (H-1))

¹³C-NMR (d₆-Aceton): δ (ppm) = 166,56 (C-3); 145,60 (C-4); 134,13 (C-2); 130,55 (C-6); 123,00 (C-7); 115,61 (C-5); 10,97 (C-1)

MS: m/z (%) = 178 (95,2) M⁺; 133 (10,7) [M -CO₂H]⁺; 132 (51,8) [M -HCO₂H]⁺; 92 (78,0) Ph-NH⁺; 91 (100,0) Ph-N⁺; 77 (12,2) C₆H₅⁺; 65 (61,7) C₃H₅⁺; 51 (9,1); 42 (11,2); 39 (21,5) C₃H₃⁺

EA: ber. für C₉H₁₀N₂O₂: C 60,66; H 5,66; N 15,72; gef. C 60,61; H 5,75; N 16,07

3.2 Charakterisierung der beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31 auftretenden Metabolite

Die im Kapitel 1.4 postulierten möglichen Abbauwege des 4-Chlorcatechols in *Pseudomonas putida* GJ31 (siehe Abb. 3.17) wurden überprüft, indem jeder beteiligte Metabolit isoliert und durch NMR- und Massenspektren charakterisiert wurde. Da sich dies aufgrund der hohen Instabilität einiger Verbindungen als nicht möglich erwies, wurden instabile Metabolite derivatisiert und mit authentischen Verbindungen verglichen.

Diese Untersuchungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

Aus der Zellkultur eines Expressionsstammes oder einer *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur, die mit Chlorbenzol als alleiniger Kohlenstoffquelle gewachsen war, wurde ein Rohextrakt hergestellt (siehe 2.5). In dem *P. putida* GJ31-Rohextrakt wurden die Folgeenzyme des zu untersuchenden Schrittes durch Entfernung von beteiligten Cofaktoren aus der Enzymlösung oder - im Fall von zweiwertigen Ionen - durch Komplexbildung mittels EDTA inhibiert. Das Vorliegen einer deutlichen Aktivitätsverminderung in Abwesenheit des Cofaktors wurde für jedes zu inhibierende Protein zuvor im Enzymtest überprüft. Der Rohextrakt wurde mit dem jeweiligen Substrat versetzt und das in der Reaktionsmischung enthaltene Protein ausgefällt. Der in der Lösung verbliebene Metabolit wurde derivatisiert oder isoliert und anschließend charakterisiert.

Die Abbildung 3.17 fasst die an der untersuchten Abbausequenz beteiligten Enzyme mit ihren jeweiligen Cofaktoren zusammen. Es sind beide Reaktionswege aufgeführt, die durch die proximale (A) sowie distale (B) Spaltung des 4-Chlorcatechols eingeleitet werden.

Wie in Abbildung 3.17 B dargestellt, tritt für den Fall der distalen Ringspaltung des 4-Chlorcatechols der Metabolit 4-Chlor-2-oxo-4-pentenoat (**44**) auf. Über das Reaktionsprodukt der Umsetzung dieses Metaboliten durch die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Vorausgesetzt, eine Umsetzung findet statt, sind in Abbildung 3.18 zwei mögliche Folgemetabolite dargestellt: Im Fall a wird eine Umkehrung der Orientierung der H₂O-Addition angenommen. Eine Umsetzung des hierbei gebildeten 4-Chlor-5-hydroxy-2-oxovalerats (**45**) durch die 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase könnte dann formal zur Bildung von Formyl-CoA führen. Fall b zeigt die Addition des Wassers an die Doppelbindung unter gleicher Orientierung wie beim unsubstituierten Vinylpyruvat (**4**). Dies hätte einen Metaboliten mit geminal substituierten C-Atom (**46**) zur Folge, aus dem eine spontane HCl-Eliminierung zu erwarten wäre. Das Produkt dieser Reaktion wäre Acetylpyruvat. In zwei *Pseudomonas putida*-

Stämmen wurde eine Acetylpyruvat-Hydrolase nachgewiesen, die Acetylpyruvat in Acetat und Pyruvat spaltet (DAVEY & RIBBONS, 1975, CHAPMAN & RIBBONS, 1976; POKORNY et al., 1999).

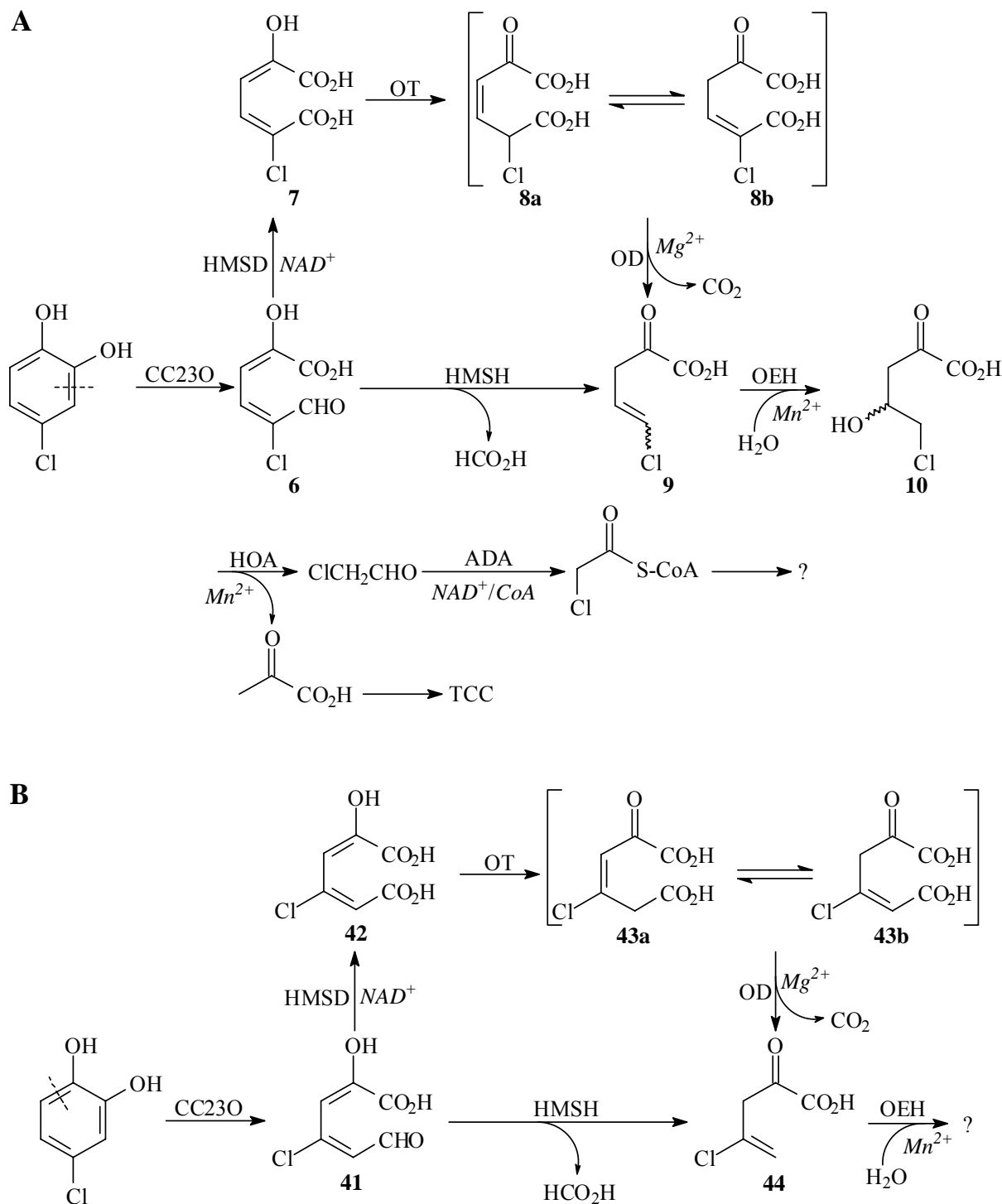


Abb. 3.17: Postulierter Abbauweg von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31. **A:** proximale Ringöffnung des 4-Chlorcatechols. **B:** distale Ringöffnung des 4-Chlorcatechols (Für das Reaktionsprodukt der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase bestehen mehrere Möglichkeiten, siehe Text). Es sind für jeden Schritt in kursiver Schrift die von dem jeweiligen Enzym benötigten Cofaktoren angegeben. CC23O - Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase, HMSH - 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, HMSD - 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, OT - 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, OD - 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, OEH - 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase, HOA - 4-Hydroxy-2-oxo-valerat-Aldolase, ADA - Acetaldehyd-Dehydrogenase, TCC - Tricarbonsäure-Zyklus.

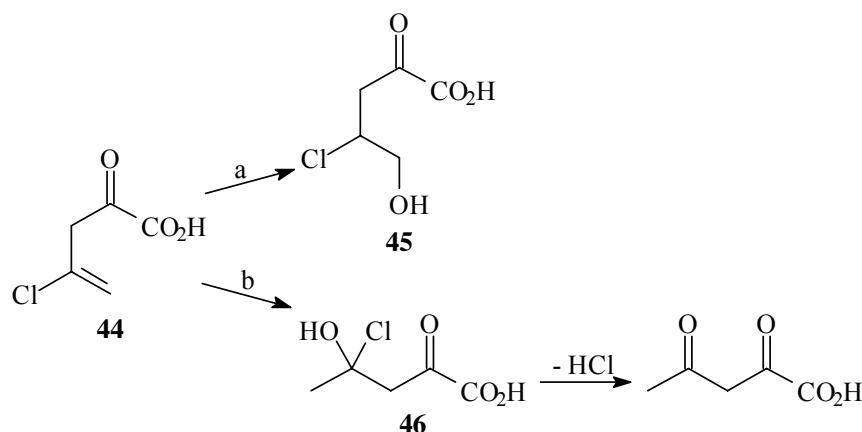


Abb. 3.18: Mögliche Produkte der Umsetzung von 4-Chlor-2-oxo-4-pentenoat durch die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase (OEH).

Die Charakterisierung des Reaktionsprodukts der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase gelang durch Umsetzung von 4-Chlorcatechol mit Rohextrakt des CbzE-Expressionsstammes *Escherichia coli*-Stammes JM109 (pU2-36) und anschließender Derivatisierung mit Ammoniumchlorid zu Picolinsäure. Eine Akkumulation des Ringspaltungsprodukts nach Umsetzung mit Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Zellkultur wurde durch alleinige Inhibierung der nachfolgenden 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase HMSD erreicht. Auf eine Blockierung der durch die Hydrolase katalysierte Konkurrenzreaktion konnte verzichtet werden, da im *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt für das Substrat 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) eine ausreichend geringe Aktivität des Enzyms festgestellt wurde (siehe 3.3.2).

Dementsprechend gelang es auch nicht, das Chlorvinylpyruvat (**9**) als Produkt der Umsetzung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) durch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase zu isolieren: Nach Zutropfen einer 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd-Lösung zu *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt und anschließender Festphasenextraktion konnten durch kernresonanzspektroskopische Vermessung der Lösung keine von *cis*- oder *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) stammenden Resonanzsignale ausgemacht werden. Das NMR-Spektrum zeigte statt dessen die Signale von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**). Um eine Inhibierung der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase durch eine zu hohe Substratkonzentration zu vermeiden, wurde die Dauer des Zutropfens der 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd-Lösung auf bis zu 3 Stunden erhöht, das NMR-Spektrum zeigte aber mit zunehmender Reaktionsdauer nur eine Zunahme von nicht zuzuordnenden Signalen.

Der im dehydrogenolytischen Zweig als nächstes auftretende Metabolit 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) konnte isoliert werden, indem eine Lösung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure-

semialdehyd (**6**) mit Rohextrakt des CbzG-Expressionsstammes *Escherichia coli* XL1-Blue (pXPG) versetzt wurde.

Um Verbindung **8a** bzw. **8b** als Produkt der 4-Oxalocrotonat-Tautomerase charakterisieren zu können, wurde eine 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd-Lösung unter Zusatz von NAD^+ und EDTA mit *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt versetzt. Hierbei konnte jedoch nur das Reaktionsprodukt der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase (**9**) nachgewiesen werden. Auch Variationen der unter 3.2.4 beschriebenen Versuchsbedingungen wie Erhöhung der EDTA-Konzentration oder Änderung der Reaktionszeit lieferten das selbe Ergebnis. Spektroskopische Daten der 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**) konnten nur durch protonenkatalysierte Tautomerie der 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) in wässriger Lösung erhalten werden.

Die Identifizierung des Produkts der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase-Reaktion (**10**) wurde dadurch erschwert, dass sowohl das diese Reaktion katalysierende Enzym wie auch das Nachfolgeenzym zweiwertige Ionen als Cofaktor benötigt. Eine alleinige Reduktion der Aktivität des Folgeenzym 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase durch Komplexierung der Ionen mittels EDTA war also nicht möglich. Für die Umsetzung wurde daher mit NADase behandelter *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt eingesetzt, um so zumindest den nachfolgenden Metabolit Chloracetaldehyd als Produkt der Umsetzung von 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxoalerat (**10**) durch die 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase nachweisen zu können.

Dieser Rohextrakt setzte sowohl *cis*- als auch *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) sowie deren unchloriertes Kongener (**4**) um. In der nach Aufarbeitung der Reaktionslösungen erhaltenen Analysenlösungen konnten im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum keine (Chlor-)Acetaldehyd oder auch Pyruvat zuzuordnenden Signale identifiziert werden. Lediglich in dem aus der Umsetzung von Vinylpyruvat (**4**) resultierenden Spektrum waren schwache Signalmuster vorhanden, die mit der Struktur des durch Lactonisierung in saurem Medium aus 4-Hydroxy-2-oxoalerat (**5**) gebildeten 3-Hydroxy-5-methyl-5*H*-2-furanons (**14b**) vereinbar waren.

Auch durch Umsetzung von 4-Hydroxy-2-oxoalerat (**5**) als Substrat der Aldolase mit von NAD^+ befreitem Rohextrakt konnten nicht die erwarteten Metabolite Acetaldehyd und Pyruvat identifiziert werden.

Alle zur Metaboliten-Identifizierung dieses unteren Teils der untersuchten Abbausequenz von 4-Chlorcatechol aufgenommenen NMR-Spektren wiesen im hohen Feld eine Vielzahl von unspezifischen Signalen auf. In diesem Resonanzbereich treten hauptsächlich Absorptionen von aliphatischen Protonen auf. Dies deutet darauf hin, dass lediglich Zerfallsprodukte der instabilen postulierten Metabolite isoliert werden konnten.

Um diese instabilen Zwischenstufen dennoch nachweisen zu können, wurde eine in-situ-Derivatisierung in Kombination mit einer empfindlicheren Analyseverfahren angewendet. Der indirekte Nachweis gelang durch Derivatisierung der Metabolite zu den jeweiligen Phenylhydrazonen und Vergleich mit chemisch synthetisierten Standard-Verbindungen per HPLC.

3.2.1 Isolierung und Charakterisierung des Spaltprodukts der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase

Die Umsetzung von 4-Chlorcatechol durch die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase kann prinzipiell zwei Reaktionsprodukte liefern: Durch distale 1,6-Spaltung (Abb. 3.19, Weg b) würde 4-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**41**) entstehen, während eine proximale 2,3-Ringspaltung (Abb. 3.19, Weg a) zu 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) führen würde. Eine Unterscheidung dieser beiden Verbindungen ist anhand ihrer NMR-Spektren leicht möglich: eine 1,3-Kopplung der an das Kohlenstoff-Rückgrat gebundenen Protonen ist deutlich größer als eine 1,4-Kopplung. Es wurde zunächst versucht, die intensiv gelb gefärbte Metabolite (**6**, **41**) aufzukonzentrieren und zu vermessen.

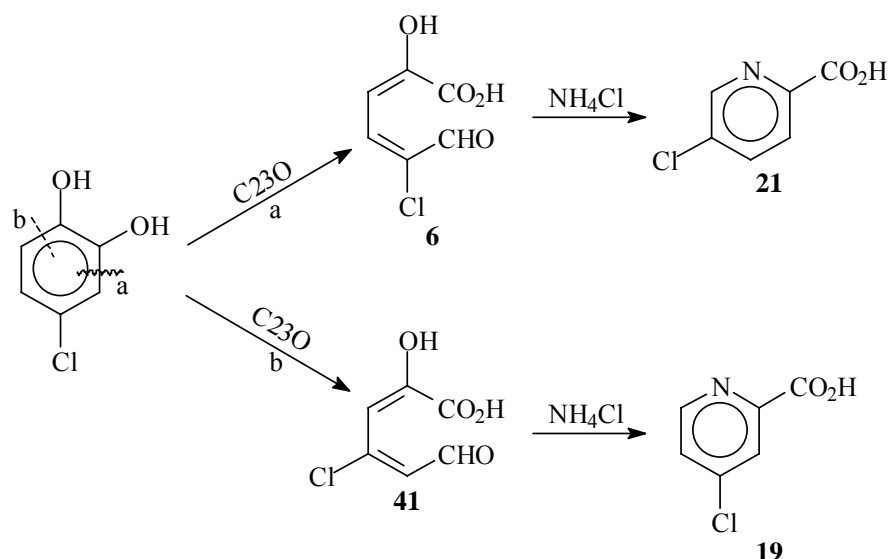


Abb. 3.19: Die C23O-Reaktion mit den beiden möglichen Reaktionsprodukten aus proximaler (a) und distaler (b) Spaltung sowie anschließender Derivatisierung zur 5- bzw. 4-Chlorpicolinsäure (**21** bzw. **19**).

Da eine Aufreinigung des Chlorhydroxymuconsäuresemialdehyds im Gegensatz zu Literaturangaben (WIESER et al., 1994) nicht gelang, wurde eine Derivatisierung mit Ammoniumchlorid

zur stabilen Picolinsäure durchgeführt (MATTHEWS et al., 1995; RIEGERT et al., 1998). Diese ließ sich NMR-spektroskopisch sowie massenspektrometrisch vermessen. Weiterhin erfolgte ein Vergleich des isolierten Derivats mit chemisch synthetisierten Standardverbindungen durch HPLC.

Für die Untersuchung der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase-Reaktion wurde mit NADase behandelter *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt eingesetzt, der aus einer mit Chlorbenzol als alleiniger Kohlenstoffquelle gewachsenen Zellkultur erhalten wurde. Durch die Zerstörung des im Rohextrakt vorhandenen NAD⁺ ist der Hauptabbauweg des CC23O-Reaktionsprodukts versperrt. Da von den beiden abbauenden Enzymen die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase gegenüber dem chlorierten Metabolit eine relativ geringe Aktivität besitzt und zusätzlich einer Substratinhibierung unterliegt (siehe 3.3.2), reichte die Inhibierung der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase aus, um eine Akkumulation des chlorierten Hydroxymuconsäuresemialdehyds zu erreichen.

Für die Voruntersuchungen zur Isolierung des Metaboliten wurde der CbzE-Expressionsstamm *Escherichia coli* JM109 (pU2-36) eingesetzt, da hier keine Folgeenzyme vorhanden sind, die den Metaboliten weiter umsetzen könnten.

3.2.1.1 Versuch der direkten Isolierung und Charakterisierung des Metaboliten

Um das Reaktionsprodukt der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase-Reaktion zu gewinnen, wurden in zwei Ansätzen jeweils 2 ml Rohextrakt des *Escherichia coli* CbzE-Expressionsstammes (Prot.-Gehalt: 3,7 mg/ml, Tris/HCl-Puffer, 100 mM, pH 7,5) innerhalb von 30 Minuten mit einer Lösung von 5 mg 4-Chlorcatechol in 2 ml Tris/HCl-Puffer (100 mM, pH 7,5) versetzt. Die beiden so erhaltenen Lösungen des Ringspaltungsprodukts wurden vereinigt.

Nach dieser Vorgehensweise wurden drei Lösungen hergestellt, mit denen auf verschiedene Arten weiter verfahren wurde:

1. Es wurde mit konz. HCl pH 2 eingestellt, die Lösung zentrifugiert (10 Min., 5000 Upm) und einer Festphasenextraktion unterworfen (50 mg). Elution mit d₄-Methanol lieferte eine dunkelrote Lösung, in deren NMR-Spektrum dem postulierten Reaktionsprodukt keine Signale zugeordnet werden konnten.

2. Die Reaktion wurde in deuteriertem Puffer im NMR-Röhrchen durchgeführt (\varnothing 10 mm), so dass die Reaktionsmischung ohne Isolierungsschritt vermessen werden konnte. Trotz intensiver Färbung der Lösung wies das Spektrum keine Signale im erwarteten Bereich auf.
3. Die gelbe Metabolitenlösung wurde mit konz. Salzsäure angesäuert, zentrifugiert (10 Min., 5000 Upm) und dreimal mit 10 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und mit etherischer Diazomethanlösung versetzt. Erneutes Trocknen über Natriumsulfat und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lieferte ein rotes Öl, welches kernresonanzspektroskopisch vermessen wurde. Auch diese Derivatisierung führte nicht zu dem erwarteten Ergebnis.

3.2.1.2 Isolierung und Charakterisierung des Spaltprodukts der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase durch Derivatisierung

10 ml eines *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakts (Wachstumssubstrat: Chlorbenzol, Proteingehalt: 2,8 mg/ml, Tris/HCl-Puffer, 100 mM, pH 7,5) wurden für 30 Minuten bei 37 °C mit NADase (1 U) behandelt. Es wurden jeweils 5 ml der Enzymlösung innerhalb von 30 Minuten unter Rühren bei Raumtemperatur mit jeweils 5 ml einer 4-Chlorcatechollösung (2 mg/ml) versetzt. Nach 15 minütigem Nachrühren wurden die beiden Lösungen vereinigt und bei 4 °C einer Ionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) unterworfen. Alle Fraktionen mit einem Absorptionsmaximum bei 379 nm wurden vereinigt, wobei 48 ml einer Lösung mit einer Extinktion von E_{379} (1:50) = 1,25 erhalten wurden (Ausbeute: 55 %). Anschließend wurde mit 5,1 g Ammoniumchlorid versetzt (Endkonzentration 2 M) und über Nacht bei RT gerührt. Es wurde mit konz. HCl vorsichtig pH 2 eingestellt und das ausgefallene Protein durch Zentrifugation (10 Minuten, 5000 Upm) sedimentiert. Der Überstand wurde einer Festphasenextraktion unterworfen (100 mg, Elution mit 1,5 ml d_4 -Methanol). Die dabei erhaltene Lösung wurde kernresonanzspektroskopisch vermessen und anschließend im Vakuum bei RT vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und das Lösungsmittel wiederum am Rotationsverdampfer entfernt. Der so erhaltene Rückstand wurde massenspektrometrisch vermessen.

$^1\text{H-NMR}$ (d_4 -MeOH): δ (ppm) = 8,65 (s, 1 H); 8,13 (d, 1 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8,14$ Hz); 8,04 (dd, 1 H, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8,14$ Hz, $^4\text{J}(\text{H,H}) = 2,03$ Hz)

^{13}C -NMR (d_4 -MeOH): δ (ppm) = 149,39; 138,86; 127,32

MS: m/z (%) = 157 (25,2) M^+ ; 140 (3,4) $[\text{M} - \text{OH}]^+$; 113 (100,0) $[\text{M} - \text{CO}_2]^+$; 112 (55,9) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H}]^+$; 86 (8,3) $[\text{M} - \text{CO}_2 - \text{HCN}]^+$; 85 (14,2) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - \text{HCN}]^+$; 78 (98,1) $[\text{M} - \text{CO}_2 - \text{Cl}]^+$; 76 (81,5) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - \text{HCl}]^+$; 73 (4,9); 60 (11,2) $[\text{M} - \text{CO}_2 - \text{HCN} - \text{C}_2\text{H}_2]^+$; 56 (4,8); 51 (68,2) $\text{C}_4\text{H}_3\text{N}^+$; 50 (92,6) C_3N^+ ; 45 (26,0) CO_2H^+

Die aufgeführten Daten stimmen mit denen der synthetisierten 5-Chlorpicolinsäure (**21**) überein (3.1.6.2). Weiterhin wurden HPLC-Chromatogramme der Vergleichssubstanzen und der aus dem enzymatischen Umsatz gewonnenen Chlorpicolinsäure aufgenommen. Hier zeigt sich ebenfalls eine Übereinstimmung mit der Retentionszeit von 5-Chlorpicolinsäure (**21**). Somit konnte die Struktur des Metaboliten als 5-Chlor-2-hydroxyumuconsäuresemialdehyd (**6**) indirekt nachgewiesen werden.

Keine der beiden Analysemethoden (NMR und HPLC) lieferte Hinweise auf das aus der distalen Ringspaltung resultierende Isomer 4-Chlorpicolinsäure (**19**).

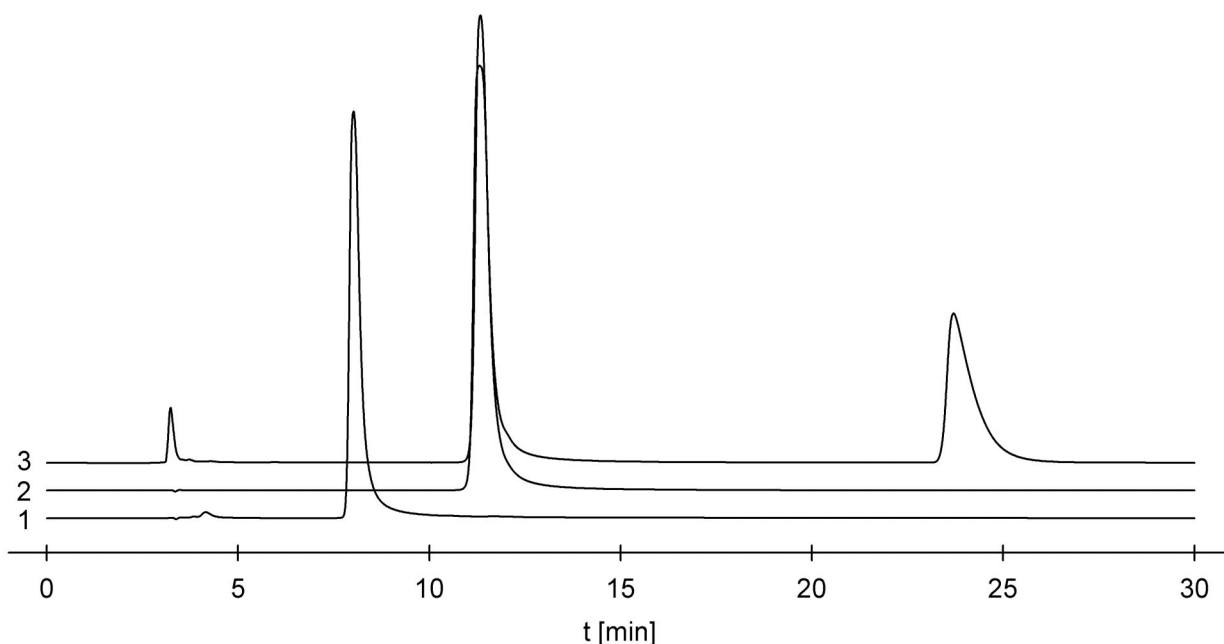


Abb. 3.20: Vergleich der HPLC-Chromatogramme (Lichrospher RP 18, 40 % Methanol, 1 g/l H_3PO_4) der Picolinsäuren. 1: 4-Chlorpicolinsäure (**19**). 2: 5-Chlorpicolinsäure (**21**). 3: Zu Picolinsäure derivatisiertes Produkt aus Umsetzung von 4-Chlorcatechol mit *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt (die Herkunft des Peaks bei 24,7 Minuten ist unbekannt).

Da sich eine Aufkonzentrierung des 5-Chlor-2-hydroxyumuconsäuresemialdehyds (**6**) als nicht möglich erwies, wurde die Stabilität der aus der Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Lösung überprüft: vier Proben wurden bei verschiedenen Temperaturen gelagert und in

regelmäßigen Abständen die Extinktion bei 379 nm (1:200 verdünnt (v/v) mit Na-K-Phosphat-Puffer, 100 mM, pH 7,5) bestimmt (Abb. 3.21).

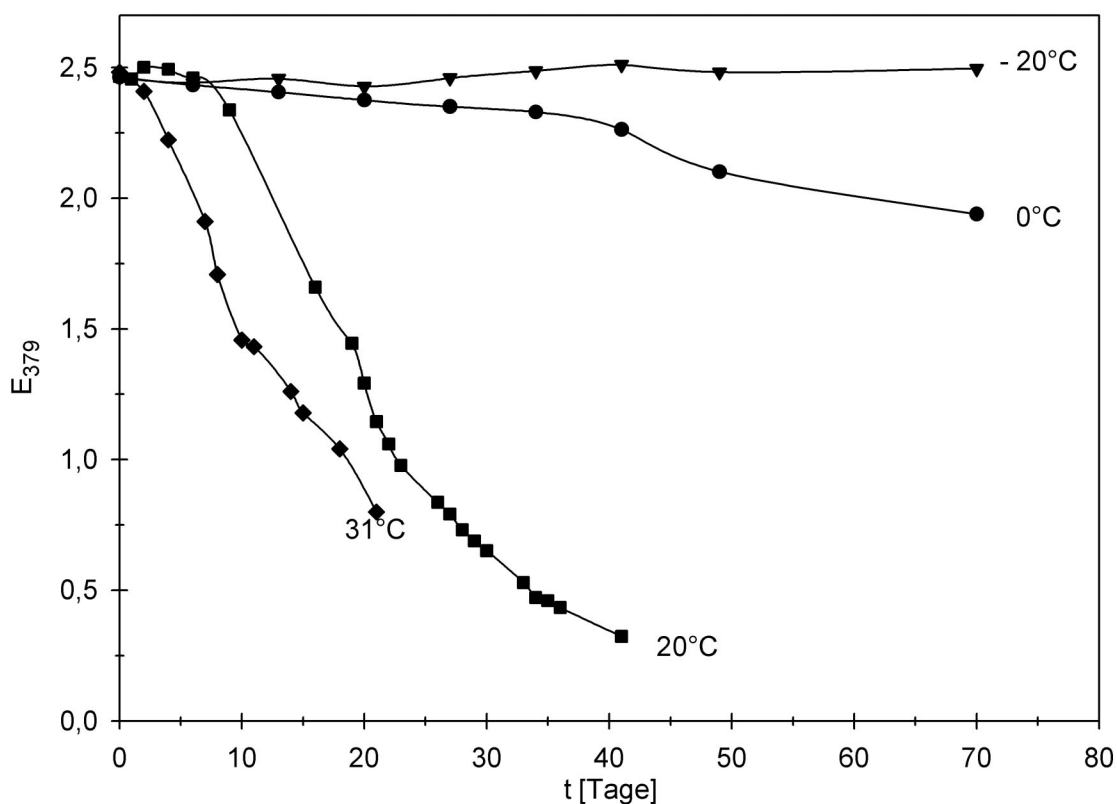


Abb. 3.21: Bestimmung der Stabilität einer 62 μM 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd-Lösung (6) bei verschiedenen Temperaturen (\blacktriangledown -20 °C, \bullet 0 °C, \blacksquare 20 °C, \blacklozenge 31 °C) durch Messung der Extinktion in Na-K-Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5).

Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass die Stabilität stark temperaturabhängig ist. Daher wurde für weitere Untersuchungen die durch Ionenaustauschchromatographie gereinigte Lösung des Ringspaltungsprodukts entweder frisch hergestellt oder bei -20 °C gelagert. In der folgenden Tabelle sind die aus den Daten berechneten Halbwertszeiten angegeben.

Tab. 3.2: Halbwertszeiten einer 62 μM 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd-Lösung (6) in Abhängigkeit von der Temperatur.

T [°C]	$t_{1/2}$ [Tage]
0	210,0
20	12,3
31	12,1

Eine Wiederholung der 4-Chlorcatecholumsetzung mit Rohextrakt des CbzE exprimierenden *Escherichia coli*-Stammes JM109 (pU2-36) lieferte dasselbe Reaktionsprodukt, wie identische NMR-Daten des Ammoniumchlorid-Derivats bewiesen. Für weitere Untersuchungen benötigte 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd-Lösungen (**6**) konnten also mit Hilfe des Expressionsstammes hergestellt werden.

Da aus der Literatur (MORRIS & BARNESLEY, 1982; WIESER et al., 1994; RIEGERT et al., 1998) bekannt ist, dass die Absorption der chlorierten wie auch der unchlorierten 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyde stark pH-abhängig ist, konnte durch Bestimmung der Extinktion bei 379 nm (1:200 verdünnt (v/v) mit verschiedenen Puffern) bei verschiedenen pH-Werten eine Titrationskurve aufgenommen werden. Der sigmoide Kurvenverlauf lässt auf eine deprotonierbare Gruppe mit einem pK_s -Wert von 4,9 schließen (Abb. 3.22).

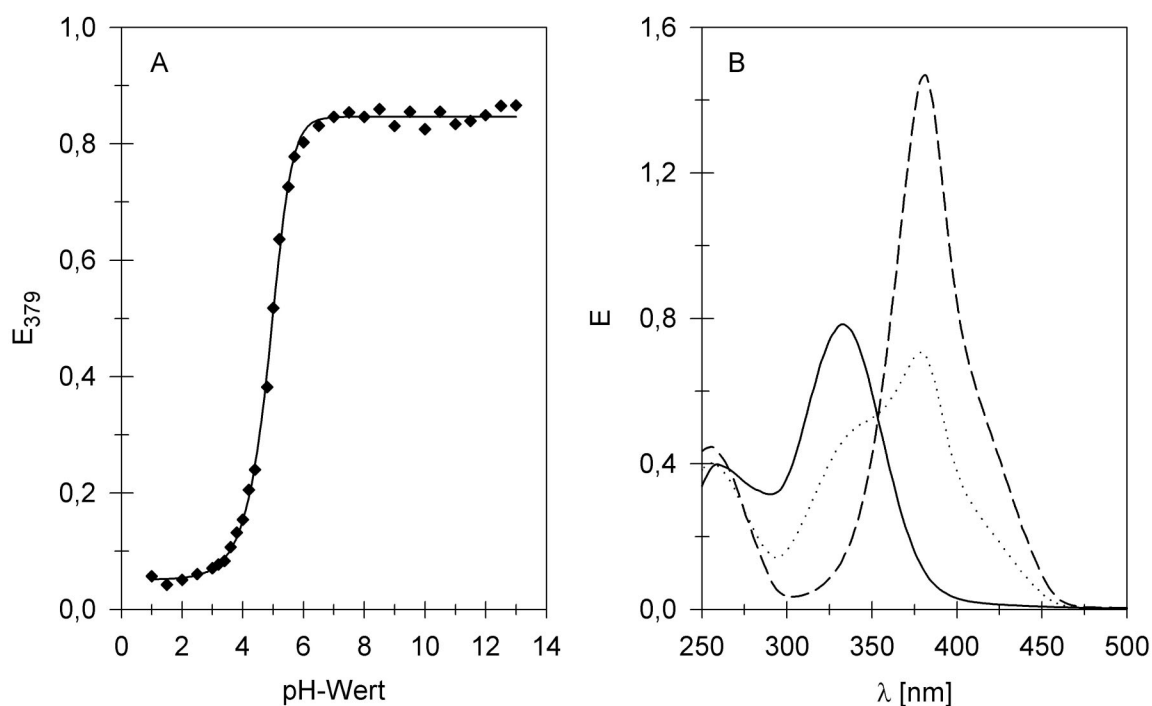


Abb. 3.22: Absorptionseigenschaften von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) bei verschiedenen pH-Werten. A: Titrationskurve einer 20 nM Lösung. B: UV-Spektrum einer 40 nM Lösung bei folgenden pH-Werten: — pH 2,pH 5, ----pH 8.

3.2.2 Isolierung und Charakterisierung des Produkts der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase

Es wurde erwartet, dass das postulierte Produkt der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase-Reaktion, die 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (7), in protischem Medium analog dem unchlorierten Kongeneren tautomerisieren würde. Daher wurde der Verlauf der Umsetzung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (6) mit Rohextrakt des CbzG-Expressionsstammes *Escherichia coli* XL1-Blue (pXPG) durch Aufnahme von UV-Spektren im Photometer beobachtet (Abb. 3.23). Hierbei zeigt sich zunächst eine Abnahme der Absorption der Ausgangsverbindung bei 379 nm. Gleichzeitig ist ein Anstieg der Produktabsorption bei 307 nm zu erkennen, die ihr Maximum 70 Minuten nach Reaktionsbeginn erreicht (Abb. 3.23 A). Hierbei tritt kein scharfer isosbestischer Punkt auf, eine deutliche Tautomerisierung zu einem neuen Produkt mit dem Absorptionsmaximum bei 245 nm setzt aber erst in den folgenden 40 Minuten ein (Abb. 3.23 B).

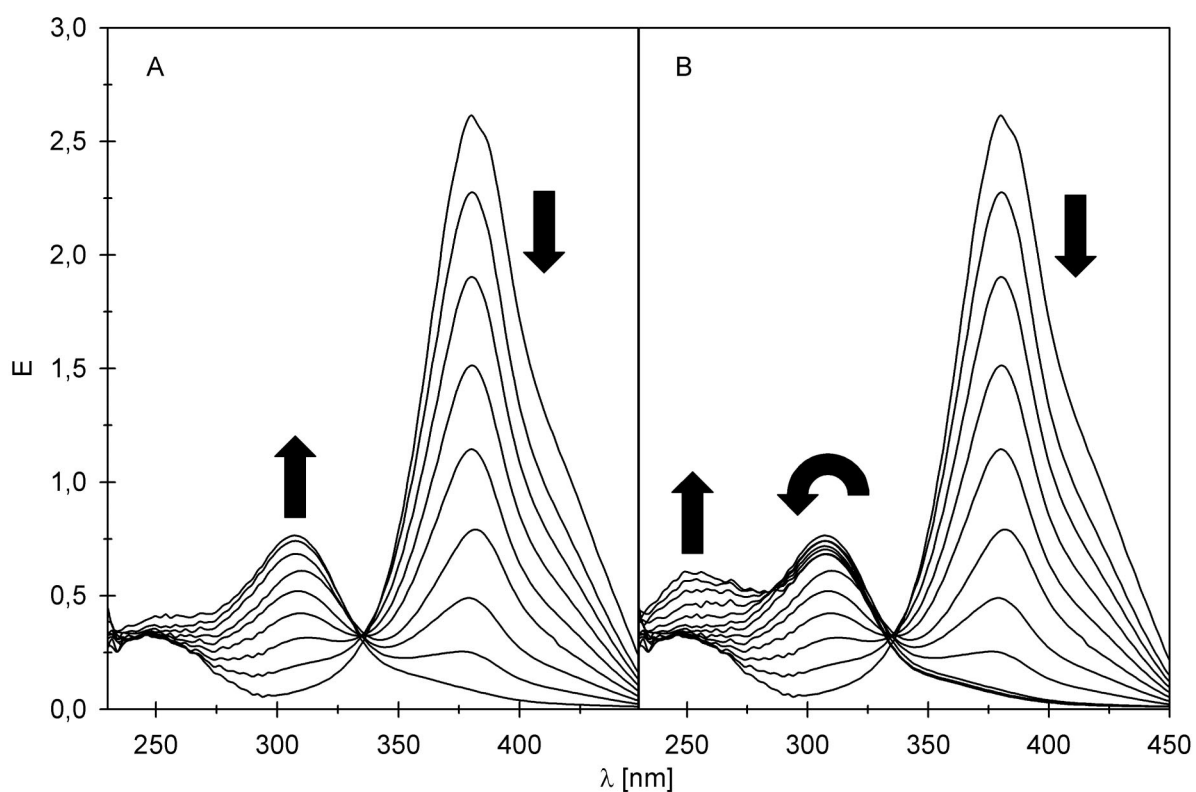


Abb. 3.23: Umsetzung von 65 nmol 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (6) mit Rohextrakt des CbzG-Expressionsstammes *Escherichia coli* XL1-Blue (pXPG) (20 μ g Protein) unter Zugabe von 100 nmol NAD^+ in Na-K-Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5). A: Aufnahme der UV-Spektren nach 0; 1,5; 7; 15; 25; 35; 45; 55 und 70 Min. B: Dieselbe Aufnahme, es sind zusätzlich die Spektren nach 80; 90; 100 und 110 Min. dargestellt.

Durch eine zügige Aufarbeitung einer Umsetzung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) mit Rohextrakt des CbzG-Expressionsstammes im präparativen Maßstab sollte also eine Isolierung des Reaktionsprodukts gelingen.

In zwei Rundkolben wurden zu jeweils 5 ml eines mit 20 mg NAD^+ versetzten Rohextrakts des *Escherichia coli*-CbzG-Expressionsstammes XL1-Blue (pXPG) (Proteingehalt: 7,3 mg/ml, Na-K-Phosphatpuffer, 100 mM, pH 7,5) unter Rühren innerhalb von 30 Minuten jeweils 33 ml einer 5-Chlor-2-hydroxysemialdehyd-Lösung ($E_{379}(1:20) = 2,59$, **6**, Darstellung siehe 3.2.1.2) getropft und 15 Minuten nachgerührt. Beide Ansätze wurden vereinigt und mit konz. Salzsäure vorsichtig auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Ausgefallenes Protein wurde bei 4 °C abzentrifugiert (10 Min., 5000 Upm) und der Überstand auf eine Festphasenextraktionssäule (200 mg) gegeben. Es wurde mit 1,5 ml deuteriertem Aceton eluiert und die dabei erhaltene Lösung kernresonanzspektroskopisch vermessen. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur und Normaldruck vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in Aceton aufgenommen und das Lösungsmittel wiederum verdampfen lassen. Der so erhaltene Rückstand wurde massenspektrometrisch vermessen.

^1H -NMR (d_6 -Aceton): δ (ppm) = 7,96 (d, 1 H, $^3J(\text{H,H}) = 11,60$ Hz); 6,54 (d, 1 H, $^3J(\text{H,H}) = 11,60$ Hz)

^{13}C -NMR (d_6 -Aceton): δ (ppm) = 166,42 (C=O); 165,31 (C=O); 150,34 (C-OH); 132,43 (C-H); 124,27 (C-Cl); 104,95 (C-H)

MS: m/z (%) = 148 (12,2) $[\text{M} - \text{CO}_2]^+$; 129 (1,5) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 113 (15,7) $[\text{M} - \text{CO}_2 - \text{Cl}]^+$; 103 (40,0) $[\text{M} - \text{CO}_2 - \text{CO}_2\text{H}]^+$; 102 (28,8) $[\text{M} - 2 \times \text{CO}_2\text{H}]^+$; 95 (3,2) $[\text{M} - \text{CO}_2 - \text{Cl} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 84 (1,0) $[\text{M} - 2 \times \text{CO}_2\text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 75 (37,5) $[\text{M} - \text{CO}_2 - \text{CO}_2\text{H} - \text{CO}]^+$; 74 (7,2) $[\text{M} - 2 \times \text{CO}_2\text{H} - \text{CO}]^+$; 69 (4,8) $[\text{M} - 2 \times \text{CO}_2 - \text{Cl}]^+$; 49 (5,7) CH_2Cl^+ ; 45 (9,6) CO_2H^+ ; 44 (100,0) CO_2^+

Aufgrund des Fehlens eines chemisch synthetisierten Standards lassen sich die erhaltenen Daten nicht vergleichen, können aber der Struktur des postulierten Metaboliten 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) zugeordnet werden.

3.2.2.1 Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml Na-K-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7,5) 200 nmol NAD^+ und Rohextrakt des CbzG exprimierenden *Escherichia coli*-Stammes XL1-Blue (pXPG) (200 - 400 μg Protein) mit verschiedenen Mengen 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (25 - 150 nmol, **6**, Darstellung siehe 3.2.1.2) versetzt. Im Photometer konnte bei 307 nm die enzymatische Bildung der 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) sowie die Abnahme deren Extinktion durch Weiterreaktion zur 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**) bzw. zum 2-Chlor-4-oxalocrotonat (**8b**) beobachtet werden.

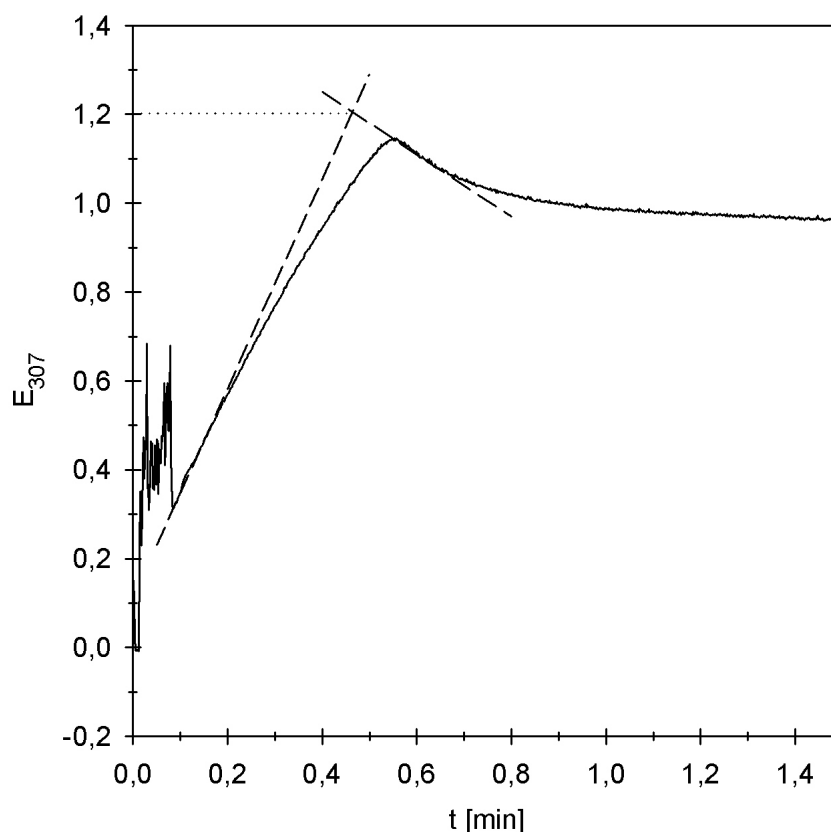


Abb. 3.24: Beispiel zur näherungsweise Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**). In einem Küvettenvolumen von 1 ml waren neben Rohextrakt des CbzG-Expressionsstammes *Escherichia coli* XL1-Blue (pXPG) 200 nmol NAD^+ und 80 nmol 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) enthalten. Es ist der Extinktionsverlauf bei 307 nm dargestellt. Die Extinktion am Schnittpunkt der beiden extrapolierten Geraden entspricht somit einer Konzentration von 80 μM .

Es wurden die anfänglichen Steigungen des ansteigenden wie auch des abfallenden Kurvenverlaufs extrapoliert (Abb. 3.24). Der Ordinatenwert des Schnittpunkts der beiden Geraden wurde als die Extinktion der 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) angenommen, die ohne Weiterreaktion erreicht worden wäre. Von der Annahme eines vollständigen Umsatzes ausgehend, wurde in einer Auftragung der Extinktionen gegen die jeweilige Konzentration an 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) in der Küvette der Extinktionskoeffizient von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) bestimmt:

$$\epsilon_{307}(\text{5-Chlor-2-hydroxymuconsäure}) = 12650 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

3.2.3 Isolierung und Charakterisierung des Produkts der protonenkatalysierten Tautomerisierung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure

Zunächst sollte die Tautomerie der 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) in protischem Medium durch Verfolgung der Änderungen der UV-Absorption im Photometer beobachtet werden. Hierzu wurde im Photometer die Extinktionsänderung von 1,2 μmol 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**, Darstellung siehe 3.2.1.2), 1,5 μmol NAD^+ und Rohextrakt des CbzG-Expressionsstammes *Escherichia coli* XL1-Blue (pXPG) (0,2 mg Protein) in 3 ml Na-K-Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5) bei 307 nm bis zum Maximum verfolgt. Nun wurde durch Ultrafiltration (Centriprep 3 (MW-Cut Off: 3000 g/mol, Amicon Inc., Beverly, MA/USA), 25 Min., 5000 Upm, 4 °C) der Großteil des Proteins aus der Lösung entfernt. In einer 1 ml-Quarzküvette wurde zwischen 220 und 400 nm zunächst die Basislinie und dann stündlich ein UV-Spektrum aufgenommen (Abb. 3.25).

Wie erwartet, ging die Extinktionsabnahme bei 307 nm mit der Ausbildung eines neuen Absorptionsmaximums bei 245 nm einher (Abb. 3.25). In Analogie zu dem unchlorierten Kongeneren (siehe auch 3.1.2) sollte dieses Signal von dem Tautomer 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**) stammen.

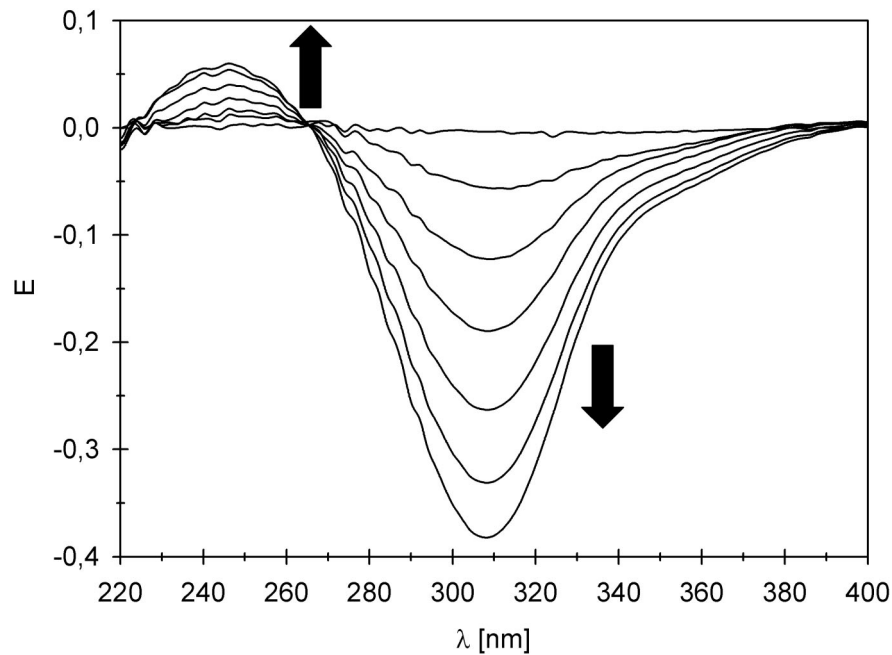


Abb. 3.25: Tautomerie von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (7) in Na-K-Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,5). Die UV-Spektren wurden nach 0 (Basislinie nach Ultrafiltration), 1, 4, 9, 17, 28 und 48 Stunden aufgenommen.

Spektroskopische Daten der Tautomerisationsprodukte sollten durch analoge Versuchsführung im präparativen Maßstab gewonnen werden. Einer frisch hergestellten 5-Chlor-2-hydroxymuconsäurelösung musste aufgrund der langsamen Reaktionsgeschwindigkeit also ausreichend Zeit zur Isomerisierung gewährt werden. Es zeigte sich jedoch, dass die NMR-Spektren mit zunehmender Reaktionsdauer in steigendem Maße Signale aufwiesen, die nicht zuzuordnen waren und wahrscheinlich von Zerfallsprodukten stammten. Hier musste also ein Kompromiss eingegangen werden, womit die relativ kurze Tautomerisationszeit von 1 Stunde in der nachfolgenden Versuchsvorschrift zu erklären ist.

Zwei Ansätze von jeweils 5 ml eines mit 20 mg NAD^+ versetzten Rohextrakts des *Escherichia coli*-CbzG-Expressionsstammes XL1-Blue (pXPG) (Proteingehalt: 6,9 mg/ml, Na-K-Phosphatpuffer, 100 mM, pH 7,5) wurden unter Rühren innerhalb von 30 Minuten mit jeweils 30 ml einer 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd-Lösung ($E_{379}(1:20) = 2,53$, **6**, Darstellung siehe 3.2.1.2) versetzt und für 1 Stunde bei RT gerührt. Die Ansätze wurden vereinigt und mit konz. Salzsäure vorsichtig auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Ausgefallenes Protein wurde bei 4 °C abzentrifugiert (10 Min., 5000 Upm) und der Überstand auf eine Festphasenextraktionssäule (200 mg) gegeben. Die Elution erfolgte mit 1,5 ml d_4 -Methanol. Die so erhaltene Lösung wurde sofort kernresonanzspektroskopisch vermessen und anschließend bei Normaldruck vom

Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und abermals bis zur Trockne einrotiert, bevor er einer massenspektrometrischen Untersuchung unterworfen wurde.

¹H-NMR (d₄-MeOH): δ (ppm) = 7,73 (1 H, dd, ³J(H,H) = 15,77 Hz, ³J(H,H) = 11,70 Hz); 6,29 (1 H, d, ³J(H,H) = 11,70 Hz); 5,99 (1 H, d, ³J(H,H) = 15,77 Hz)

MS: m/z (%) = 148 (7,4) [M -CO₂]⁺; 113 (9,8) [M -CO₂ -Cl]⁺; 103 (29,9) [M -CO₂ -CO₂H]⁺; 102 (23,5) [M -2×CO₂H]⁺; 87 (2,1) [M -CO₂ -Cl -C₂H₂]⁺; 75 (26,9) [M -CO₂ -CO₂H -CO]⁺; 69 (4,2) [M -2×CO₂ -Cl]⁺; 55 (2,5) [M -2×CO₂ -CH₂Cl]; 49 (5,5) CH₂Cl⁺; 45 (16,4) CO₂H⁺; 44 (100,0) CO₂⁺

Das Isomer 2-Chlor-4-oxalocrotonat (**8b**) konnte nicht nachgewiesen werden. Weitere Resonanzsignale stammen wahrscheinlich von Zerfallsprodukten.

Substratlösungen für Enzymtests der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase wurden auf die gleiche Weise hergestellt. Vor Aufnahme des NMR-Spektrums wurde eine definierte Menge Ethanol zugegeben und über Vergleich der Integrale die Gesamtkonzentration an 5-Chlor-2-hydroxy-muconsäure (**7**) und 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**) bestimmt.

3.2.4 Isolierung und Charakterisierung des Produkts der 4-Oxalocrotonat Decarboxylase

In zwei Kolben wurden jeweils 3,5 ml eines mit 15 mg NAD⁺ versetzten *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakts (Wachstumssubstrat: Chlorbenzol, Proteingehalt: 1,8 mg/ml, Tris/HCl-Puffer, 100 mM, pH 7,5) mit derselben Menge einer 100 mM EDTA-Lösung versetzt. Unter Rühren erfolgte innerhalb von 1 Stunde die Zugabe von jeweils 28 ml einer 5-Chlor-2-hydroxy-muconsäuresemialdehyd-Lösung (E₃₇₉(1:50) = 2,24, **6**, Darstellung siehe 3.2.1.2). Beide Ansätze wurden vereinigt und mit konz. Salzsäure vorsichtig auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert (10 Min., 5000 Upm) und der Überstand einer Festphasenextraktion unterworfen (200 mg, Elution mit d₄-Methanol). Das Eluat wurde kernresonanzspektroskopisch vermessen, bei 80 °C und Normaldruck vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in Methanol aufgenommen und das Lösungsmittel wiederum verdampft. Der so erhaltene Rückstand konnte massenspektrometrisch untersucht werden.

Im ^1H -NMR-Spektrum waren neben den Peaks von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) die folgenden Signale zu erkennen:

^1H - NMR (d_4 -MeOH): δ (ppm) = 6,79 (dd, 1 H, $^3J(\text{H,H}) = 7,12$ Hz, $^3J(\text{H,H}) = 11,19$ Hz); 6,53 (dd, 1 H, $^3J(\text{H,H}) = 11,19$ Hz, $^4J(\text{H,H}) = 1,02$ Hz); 6,21 (d, 1 H, $^3J(\text{H,H}) = 7,12$ Hz)

MS: m/z (%) = 148 (14,0) M^+ ; 113 (19,0) $[\text{M} - \text{Cl}]^+$; 103 (71,0) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H}]^+$; 102 (55,5) $[\text{M} - \text{CO} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 95 (4,9) $[\text{M} - \text{Cl} - \text{H}_2\text{O}]^+$; 75 (77,0) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - \text{CO}]^+$; 74 (17,3) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - \text{CHO}]^+$; 68 (9,8) $[\text{M} - \text{CO}_2\text{H} - \text{Cl}]^+$; 57 (4,7) $[\text{M} - 2 \times \text{CO} - \text{Cl}]^+$ 55 (5,7) $[\text{M} - \text{CO}_2 - \text{CH}_2\text{Cl}]$; 49 (19,3) CH_2Cl^+ ; 45 (38,9) CO_2H^+ ; 44 (100,0) CO_2^+

Die erhaltenen Werte stimmen mit dem unter 3.1.8.3 hergestellten Standard *cis*-Chlorvinylpyruvat (**9**) überein.

3.2.5 Isolierung und Charakterisierung des Produkts der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase

Zwei 50 mM Vinylpyruvat-Lösungen (Darstellung siehe 3.1.3) von jeweils 5 ml wurden unter Rühren innerhalb von 30 Minuten zu jeweils 2,5 ml eines mit NADase (0,5 U) behandelten und mit 20 mg MnCl_2 versetzten *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakts (Wachstumssubstrat: Chlorbenzol, 2,1 mg/ml Proteingehalt, Tris/HCl-Puffer, 100 mM, pH 7,5) getropft. Anschließend wurde die Reaktion sofort durch Zugabe von konz. Salzsäure bis zu einem pH-Wert von 2 gestoppt. Denaturiertes Protein wurde durch Zentrifugation (10 Min., 5000 Upm) sedimentiert und die Lösung einer Festphasenextraktion unterworfen (50 mg). Nach Elution mit d_4 -Methanol wurde von dieser Lösung ein NMR-Spektrum aufgenommen. Es zeigte neben weiteren Signalen das intensitätsschwache Resonanzmuster des durch Lactonisierung in saurem Medium aus 4-Hydroxy-2-oxoalerat (**5**) gebildeten 3-Hydroxy-5-methyl-5H-2-furanon (**14b**).

^1H - NMR (d_4 -MeOH): δ (ppm) = 6,24 (1 H, s); 5,03 (1 H, q, $^3J(\text{H,H}) = 6,61$ Hz); 1,39 (3 H, d, $^3J(\text{H,H}) = 6,62$ Hz)

Da mit der schwachen Intensität eine geringe Auflösung der Signale einhergeht, ist nur die auf der großen Kopplungskonstante beruhende Signalaufspaltung zu erkennen. Deren Wert und die

chemische Verschiebung der Signale stimmt jedoch gut mit den Daten der Standardverbindung 3-Hydroxy-5-methyl-5*H*-2-furanon überein (**14b**, siehe 3.1.4.5).

3.2.6 Isolierung und Charakterisierung der Produkte der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase und 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase durch Derivatisierung und HPLC-Analytik

Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, konnten die Reaktionsprodukte der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase nicht durch Festphasenextraktion aus den Proteinlösungen isoliert und charakterisiert werden. Ebenso gelang nicht der Nachweis des Produkts der Umsetzung von Chlorvinylpyruvat (**9**) durch die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase.

Aus diesem Grund wurde der Nachweis der Metabolite als Phenylhydrazon-Derivate per HPLC durchgeführt, wobei die Substrate Vinylpyruvat (**4**), 4-Hydroxy-2-oxoalerat (**5**) und *cis*- bzw. *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) eingesetzt wurden. Die jeweiligen Referenzverbindungen wurden entweder aus den käuflich erworbenen Verbindungen (Pyruvat und Acetaldehyd) hergestellt (siehe 3.1.10 und 3.1.11) oder sind als Zwischenprodukte der Metaboliten-Synthese angefallen (siehe 3.1.4.2 und 3.1.9.2): Die im folgenden beschriebene Aufarbeitung der Ansätze erfolgte unter Ansäuern des Mediums mit Schwefelsäure. Unter diesen protischen Bedingungen konnte davon ausgegangen werden, dass (5-Chlor-)4-Hydroxy-2-oxoalerat (Abb. 3.26, **10** und **5**) als postuliertem Reaktionsprodukt der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase zu 5-Chlormethyl-3-oxodihydro-2-furanon (**47**) bzw. 5-Methyl-3-oxodihydro-2-furanon (**14a**) lactonisieren würde. Die anschließende Umsetzung mit Phenylhydrazin würde also 5-Methyl-3-phenylhydrazono-dihydro-2-furanon (**16**) oder dessen chloriertes Kongener (**32**) liefern. Da im Enzymtest keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem Umsatz von (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxoalerat (**5**) festgestellt werden konnte (siehe 3.3.7), wurde für diese Untersuchung das Racemat eingesetzt.

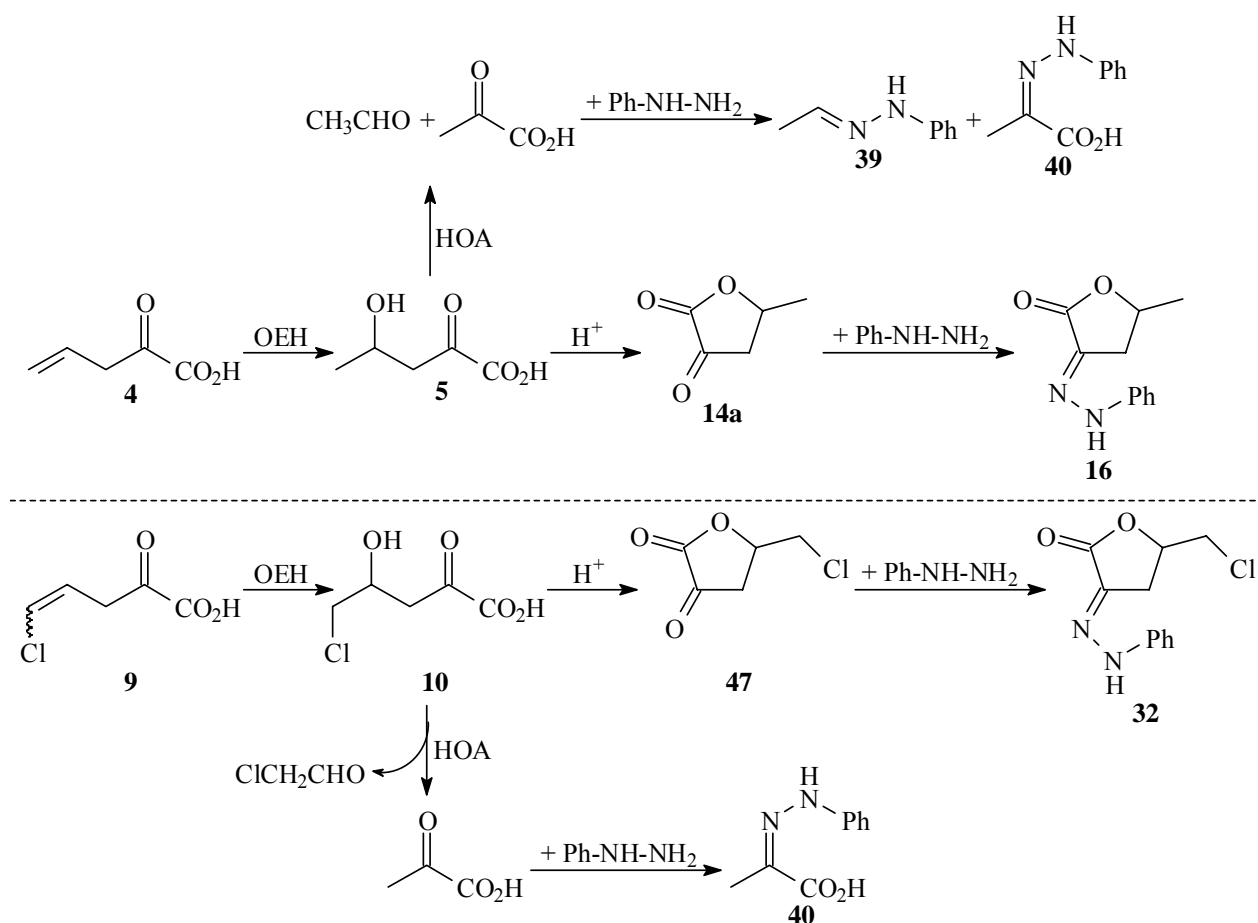


Abb. 3.26: Mögliche Produkte der Umsetzungen von Vinylpyruvat (**4**), 4-Hydroxy-2-oxovalerat (**5**) und *cis*- bzw. *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) durch NAD⁺-freien *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt und anschließender Derivatisierung mit Phenylhydrazin. Durch die saure Aufarbeitung tritt Lactonisierung von **5** und **10** zu **14a** bzw. **47** auf. OEH - 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase, HOA - 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase.

8 ml *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt (Wachstumssubstrat: Chlorbenzol, Proteingehalt: 3,5 mg/ml, Na-K-Phosphatpuffer, 100 mM, pH 7,5) wurden für 30 Minuten bei 37 °C mit NADase (0,8 U) behandelt. Jeweils 2 ml dieser Proteinlösung wurden innerhalb von 15 Minuten mit 2,5 ml einer 10 mM Lösung der folgenden Verbindungen versetzt: Vinylpyruvat (**4**), *Rac*-4-Hydroxy-2-oxovalerat (**5**), *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**). Anschließend wurde sofort mit konz. Schwefelsäure angesäuert und denaturiertes Protein durch Zentrifugation (5 Min., 5000 Upm) sedimentiert. Jede Probe wurde anschließend mit einer Lösung aus 50 µl (55,0 mg, 0,5 mmol) Phenylhydrazin in 1 ml H₂O und 50 µl konz. H₂SO₄ versetzt. Diese vier Proben wurden mit Hilfe von HPLC mit den Standardverbindungen Acetaldehydphenylhydrazon (**39**), Pyruvat-Phenylhydrazon (**40**), *Rac*-5-Methyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon (**16**) und (S)-5-Chlormethyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon (**32**) verglichen. Hierbei erfolgte neben dem Vergleich der Retentionszeiten auch eine Gegenüberstellung der jeweiligen UV-Spektren der einzelnen Peaks.

3.2.6.1 Ergebnis der Umsetzung der unchlorierten Metabolite *Rac*-4-Hydroxy-2-oxoalerat und Vinylpyruvat

Die Chromatogramme der durch Derivatisierung der Rohextrakt-Umsätze erhaltenen Proben waren sehr intensitätsschwach und sind hier in der Intensität stark gespreizt abgebildet. Es waren dennoch schwache Peaks auszumachen, die in Retentionszeit und UV-Spektrum mit den Signalen der Standardverbindungen übereinstimmen.

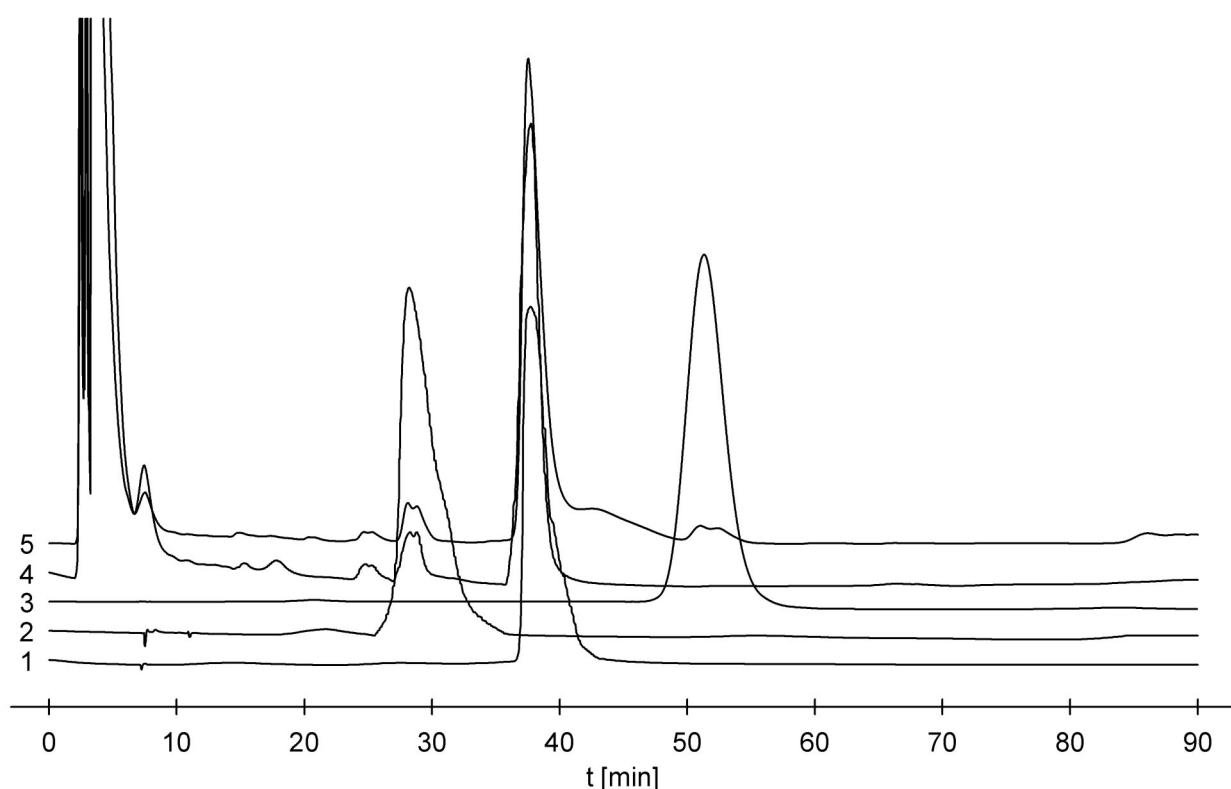


Abb. 3.27: Vergleich der HPLC-Chromatogramme (Lichrospher RP 18, 30 % Methanol, 1 g/l H₃PO₄) zum Nachweis der unchlorierten Metabolite als Phenylhydrazone. 1 - *Rac*-5-Methyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon (**16**). 2 - Pyruvat-Phenylhydrazon (**40**). 3 - Acetaldehyd-Phenylhydrazon (**39**). 4 - Umsatz von *Rac*-4-Hydroxy-2-oxoalerat (**5**) durch *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt. 5 - Umsatz von Vinylpyruvat (**4**) durch *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt. Die Proben 4 und 5 wurden mit Phenylhydrazin derivatisiert. Diese beiden Chromatogramme sind stark vergrößert.

Als intensivitätsstärkstes Signal konnte in beiden Umsetzungen der unchlorierten Metabolite das 5-Methyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanon (**16**) ausgemacht werden. Dies war bei dem eingesetzten Substrat 4-Hydroxy-2-oxoalerat (**5**) auf eine Lactonisierung des Eduktes zurückzuführen. Beide Ansätze zeigten das deutliche Signal von Pyruvat-Phenylhydrazon (**40**)

und in der aus Umsetzung von Vinylpyruvat (**4**) resultierenden Probe konnte zusätzlich Acetaldehyd-Phenylhydrazon (**39**) identifiziert werden.

Als Produkt des Umsatzes von Vinylpyruvat (**4**) durch die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase konnte also 4-Hydroxy-2-oxovalerat (**5**) nachgewiesen werden. Dessen weitere Umsetzung durch die 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase liefert als Reaktionsprodukte Pyruvat und Acetaldehyd.

3.2.6.2 Ergebnis der Umsetzung der chlorierten Metabolite *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat

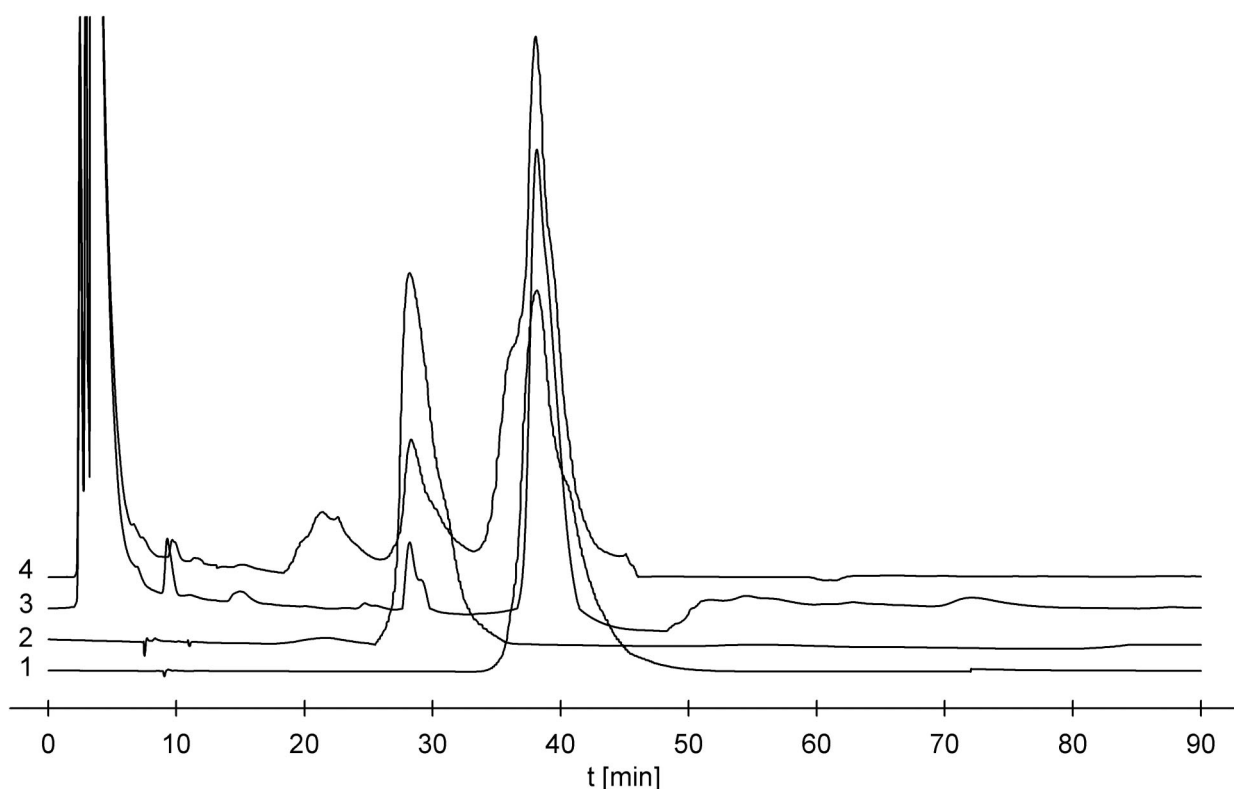


Abb. 3.28: Vergleich der HPLC-Chromatogramme (Lichrospher RP 18, 30 % Methanol, 1 g/l H_3PO_4) zum Nachweis der chlorierten Metabolite als Phenylhydrazone. 1 - (S)-5-Chlormethyl-3-phenylhydrazono-dihydro-2-furanon (**32**). 2 - Pyruvat-Phenylhydrazon (**40**). 3 - Umsatz von *cis*-Chlorvinylpyruvat (**9**) durch *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt. 4 - Umsatz von *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) durch *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt. Die Proben 3 und 4 wurden mit Phenylhydrazin derivatisiert. Diese beiden Chromatogramme sind stark vergrößert.

In Analogie zur Umsetzung des unchlorierten Vinylpyruvats zeigten auch die Untersuchungen der beiden chlorierten Kongenere das Auftreten des durch Ringschlussbildung und anschließende Derivatisierung aus dem eigentlichen Zwischenprodukt 5-Chlor-4-hydroxy-2-

oxoalderat (**10**) gebildeten 5-Chlormethyl-3-phenylhydrazonodihydro-2-furanons (**32**). Als Produkt der Umsetzung durch die 4-Hydroxy-2-oxoalderat-Aldolase wurde in beiden Fällen lediglich das Pyruvat nachgewiesen. Den gleichen Reaktionsverlauf wie bei der Umsetzung des 4-Hydroxy-2-oxoalderats (**5**) vorausgesetzt, kann neben dem Pyruvat das Chloracetaldehyd als Produkt der Aldolspaltung postuliert werden.

3.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Charakterisierung der beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31 auftretenden Metabolite

Nach den Ergebnissen der in Kapitel 3.2.1 bis 3.2.6 durchgeführten Experimente sind die in Abbildung 3.28 dargestellten Metabolite als Zwischenprodukte des Abbaus von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31 nachgewiesen.

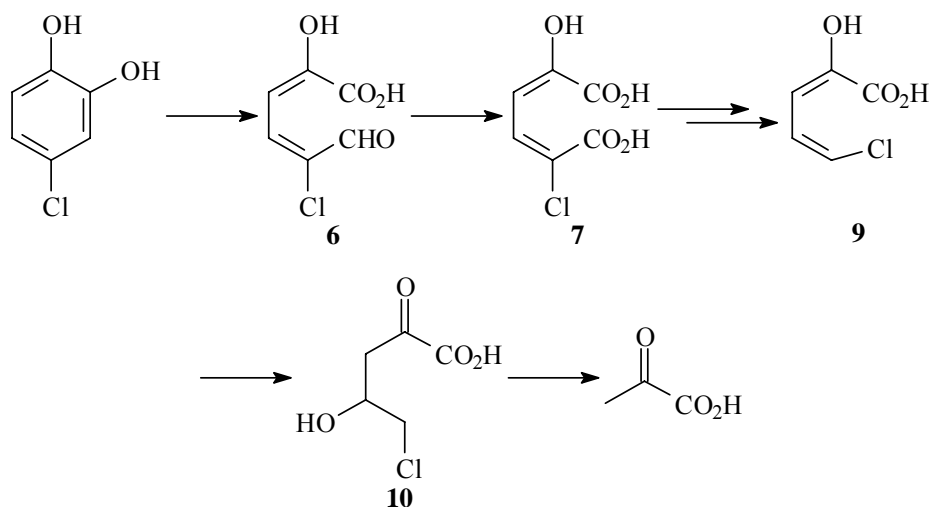


Abb. 3.29: Die bei der Umsetzung von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt (Wachstumssubstrat Chlorbenzol) *in vitro* nachgewiesenen Metaboliten.

Die Ringspaltung des 4-Chlorcatechols durch die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase erfolgt nach diesen Ergebnissen ausschließlich in proximaler Position: Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte nur die durch Derivatisierung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) entstandene 5-Chlorpicolinsäure (**21**) identifiziert werden. Der nächste postulierte Metabolit, das Chlorvinylpyruvat (**9**) als Produkt der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase konnte nicht isoliert werden. Es gelang aber die Charakterisierung

der 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) durch NMR-spektroskopische und massenspektrometrische Untersuchungen, ein Vergleich mit Referenzdaten war nicht möglich.

Der Abbau von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31 verläuft also über den dehydrogenolytischen Pfad. Unter 1.4 (siehe auch Abb. 3.17) wurde postuliert, dass die beiden Zweige des *meta*-Weges auf der Stufe des Metaboliten Chlorvinylpyruvat (**9**) wieder konvergieren. Dementsprechend gelang die Isolation dieses Metaboliten als Produkt der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase: Von den beiden denkbaren Isomeren konnte nur die Verbindung mit der *cis*-substituierten Doppelbindung nachgewiesen werden. Dies geschah eindeutig durch Vergleich der NMR-Daten des isolierten Metaboliten mit denen der chemisch synthetisierten Vergleichssubstanz.

Der vorletzte in Abbildung 3.28 dargestellte Metabolit 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerat (**10**) wurde in Form des Phenylhydrazons (**31**) des aus ihm gebildeten Lactons (**47**) per HPLC identifiziert. In dieser Untersuchung erfolgte ebenfalls der Nachweis der Bildung von Pyruvat aus *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**).

3.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der für den Abbau von 4-Chlorcatechol postulierten Enzyme des *meta*-Weges in Rohextrakten von *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311

Neben der Charakterisierung der beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31 auftretenden Metabolite wurden Untersuchungen zum Stofffluss im *meta*-Weg durchgeführt: Die Enzymaktivitäten der am *meta*-Weg beteiligten Proteine (Abb. 3.30) wurden im Rohextrakt von auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Zellen bestimmt wie unter 2.7 beschrieben. Als Substrate wurden sowohl die beim Abbau von Catechol auftretenden Metabolite als auch - soweit verfügbar - deren chlorierte Kongenere aus dem 4-Chlorcatechol-Abbau eingesetzt. War das Auftreten eines Metaboliten in Form zweier Isomere denkbar, wurden die kinetischen Daten des jeweiligen Enzyms für beide Isomere bestimmt.

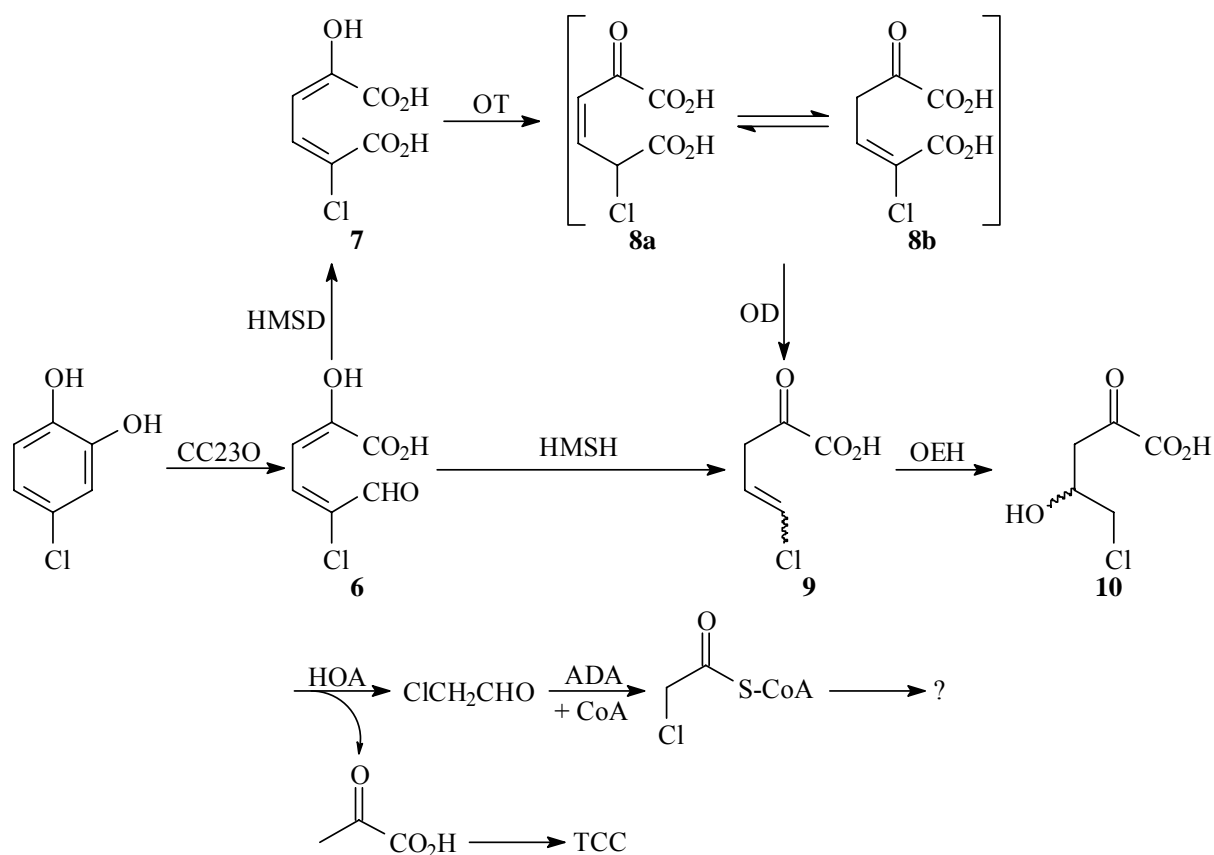


Abb. 3.30: Postulierter Abbauweg von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31. CC23O - Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase, HSMH - 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, HMSD - 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, OT - 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, OD - 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, OEH - 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase, HOA - 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase, ADA - Acetaldehyd-Dehydrogenase, TCC - Tricarbonsäure-Zyklus.

Für jedes Protein wurden die Enzymaktivitäten bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte wie unter Material und Methoden beschrieben (siehe 2.8) und lieferte Werte für die maximalen Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten.

Mit den Substrataffinitäten wurden Werte erhalten, die eine Aussage über Engstellen im Stofffluss zulassen. Weiterhin kann eine Abschätzung erfolgen, ob der hydrolytische oder der dehydrogenolytische Zweig des *meta*-Weges beim Abbau von Catechol bzw. 4-Chlorcatechol bevorzugt wird.

Die im Rohextrakt von auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Zellen bestimmten Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten sind für jeden enzymatischen Schritt des *meta*-Weges aufgeführt. Die Werte für die beim Abbau von Catechol auftretenden unchlorierten Substrate sind den Ergebnissen der Enzymtests mit chlorierten Metaboliten gegenübergestellt.

Es sind für jeden Abbauschritt ebenfalls die Ergebnisse aus den Untersuchungen von Rohextrakten von auf 3-Methylbenzoat angezogenen *Pseudomonas putida* PaW1-Zellkulturen angegeben. Dieser Organismus ist in der Lage, 4-Methylbenzoat über 4-Methylcatechol und den

meta-Weg zu verwerten, zeigt aber kein Wachstum auf 4-Chlorbenzoat und 4-Chlorcatechol. Ein Vergleich der Enzymspezifitäten der *meta*-Enzyme für die beim Abbau von 4-Chlorcatechol auftretenden Metabolite mit denen von *Pseudomonas putida* GJ31 könnte also gravierende Unterschiede aufzeigen.

Weiterhin sind die Aktivitäten und Substratspezifitäten der Enzyme des *meta*-Weges aus *Pseudomonas putida* WR311 für die chlorierten Metabolite angegeben. Dieser Stamm ist aus Kreuzungsexperimenten von *P. putida* GJ31 mit PaW1 hervorgegangen (siehe 1.6). Der Rohextrakt dieses Stammes ist der einzige, der aus Zellen gewonnen wurde, die auch über 4-Chlorcatechol gewachsen sind. Es sollte überprüft werden, inwieweit sich aufgrund der Enzymtests Parallelen oder Diskrepanzen zu *Pseudomonas putida* GJ31 und PaW1 zeigen.

3.3.1 Aktivitäten der Catechol-2,3-Dioxygenasen aus *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 für Catechol bzw. 4-Chlorcatechol

In Tabelle 3.3 sind die Ergebnisse der Catechol-2,3-Dioxygenase-Enzymtests mit den Substraten Catechol bzw. 4-Chlorcatechol zusammengefasst. Alle in dieser Tabelle aufgeführten Werte für die Enzymaktivität und Substrataffinität wurden aus den Messdaten nach dem Verfahren von Hanes und Woolf ermittelt.

Die im Rohextrakt einer *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur gemessene Aktivität der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase gegenüber dem Substrat Catechol von 420 U/g deckt sich mit Angaben von KASCHABEK et al. (1998) und MARS et al. (1997). Mit dem Substrat 4-Chlorcatechol wurde eine Reaktionsgeschwindigkeit von 79 % dieses Wertes erreicht. Eine ähnliche relative Aktivität (70 %) geben KASCHABEK et al. (1998) für die gereinigte Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase an. Trotz der guten Übereinstimmung dieser Daten befindet sich im Rohextrakt der auf Chlorbenzol angezogenen *Pseudomonas putida* GJ31-Zellkultur mindestens ein weiteres Enzym mit dioxygenolytischer Aktivität, wie die unterschiedlichen $[S]_{1/2}$ -Werte aus *P. putida* GJ31 und dem Expressionsstamm *Escherichia coli* JM109 (pU2-36) anzeigen. Im Rohextrakt des CbzE-Expressionsstammes wurde mit dem Substrat 4-Chlorcatechol 53 % der Catechol-Aktivität gemessen.

In beiden Messreihen (*P. putida* GJ31 und *E. coli* JM109 (U2-36)) wurde eine deutlich höhere Affinität der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase zu dem unchlorierten Substrat als zu Catechol festgestellt.

Tab. 3.3: Im Rohextrakt mit den Substraten Catechol bzw. 4-Chlorcatechol bestimmte maximale Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der Catechol-2,3-Dioxygenase (C23O) für die Stämme *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 sowie des CbzE-Expressionsstammes *Escherichia coli* JM109 (pU2-36).

Organismus ^a	Substrat	A _{max} [U/g] ^b	[S] _½ [µM] ^b
<i>E. coli</i> JM109 (pU2-36)	Catechol	1550	1,3
	4-Chlorcatechol	820	13,6
<i>P. putida</i> GJ31 (Chlorbenzol)	Catechol	420	0,2
	4-Chlorcatechol	330	1,4
<i>P. putida</i> PaW1 (3-Methylbenzoat)	4-Chlorcatechol	1650	0,8
<i>P. putida</i> WR311 (4-Chlorbenzoat)	4-Chlorcatechol	1040	0,7

^aDie Zellkulturen wurden auf den jeweils in Klammern angegebenen Wachstumssubstraten angezogen. ^bDiese Werte wurden rechnerisch nach Hanes und Woolf ermittelt.

Für die Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der Catechol-2,3-Dioxygenasen aus den Stämmen *Pseudomonas putida* PaW1 und WR311 existieren keine vergleichbaren Literaturwerte.

3.3.2 Aktivitäten der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolasen aus *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 für 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd bzw. 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd

Die im Rohextrakt von auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Zellen bestimmten Enzymaktivitäten für die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase unterscheiden sich deutlich für die Substrate 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**) und 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**, siehe Tab. 3.4). Für das unchlorierte Kongener wird hierbei eine ca. 6,9-fach höhere maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht, wobei die Affinität gegenüber dem 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**) um 35 % niedriger ist. Nach KUNZE (2002) besitzt die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase CbzF keine Aktivität gegenüber den an Position 5 Methyl- und Chlor-substituierten 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyden, wie der Autor anhand von Enzymtests im Rohextrakt eines CbzF-Expressionstammes

zeigen konnte. Die Tatsache, dass im *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt eine NAD⁺-unabhängige Enzymaktivität für 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) festgestellt werden konnte, deutet auf das Vorliegen eines Isoenzym hin. Eventuell wurde die Aktivität des *nahN*-Translationsproduktes aus dem *nahINLOMKJX*-Cluster (ZERLIN, pers. Mitteilung) gemessen. Über das Substratspektrum dieses Enzyms gibt es bisher keine Informationen.

Unter Umständen handelt es sich bei der hier angegebenen Enzymaktivität für das chlorierte Substrat aber auch um eine Restaktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase: Beide Enzyme konkurrieren um ein Substrat, nur die Aktivität der Dehydrogenase kann über den Cofaktor NAD⁺ reguliert werden. Die Aktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase wurde deshalb bestimmt, indem der Rohextrakt vor der Messung mit NADase behandelt wurde, um die Konkurrenzreaktion auszuschalten. Eine nicht quantitativ verlaufende Zerstörung des im Rohextrakt vorhandenen NAD⁺ wäre also eine mögliche Fehlerquelle.

Im Enzymtest unterlag die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase für beide untersuchten Substrate einer Substratinhibierung. Bei hohen Substratkonzentrationen nimmt die Reaktionsrate deutlich ab, für beide Substrate konnte im Experiment eine Abnahme bis unter die Hälfte des Maximalwertes festgestellt werden.

Tab. 3.4: Im Rohextrakt mit den Substraten 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd bzw. 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd bestimmte maximale Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase (HMSH) für die Stämme *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311.

Organismus ^a	Substrat	A _{max} [U/g]	[S] _{1/2} [μM]
<i>P. putida</i> GJ31 (Chlorbenzol)	2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd	550	13,4
	5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd	80	9,9
<i>P. putida</i> PaW1 (3-Methylbenzoat)	5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd	480	11,6
<i>P. putida</i> WR311 (4-Chlorbenzoat)	5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd	270	13,1

^aDie Zellkulturen wurden auf den jeweils in Klammern angegebenen Wachstumssubstraten angezogen.

In den Rohextrakten von *Pseudomonas putida* PaW1 und WR311 unterlag die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase gegenüber dem Substrat 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) ebenfalls einer Substratinhibierung. Bei hohen Konzentrationen von 100 μM

wurden für das Enzym aus *P. putida* PaW1 nur noch 13 % (*P. putida* WR311: 15 % bei einer Substratkonzentration von 90 μM) der maximalen Aktivität festgestellt.

3.3.3 Aktivitäten der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenasen aus *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 für 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd bzw. 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd

Wie die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase unterliegt auch die -Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* GJ31 einer Substratinhibierung. Im Enzymtest mit Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen Zellkultur durchläuft die Aktivität mit zunehmender Konzentration des unchlorierten Substrats 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**) zunächst ein Maximum (1350 U/g), um danach über einen großen Konzentrationsbereich langsam abzufallen (Abb. 8.6, siehe Anhang). MARS et al. (1997) geben eine maximale Umsatzrate von lediglich 452 U/g an, das Verhältnis der von MARS et al. angegebenen Enzymaktivitäten $A_{\max}(\text{HMSD})/A_{\max}(\text{HMSH})$ liegt mit einem Wert von 2 aber in der gleichen Größenordnung wie der hier festgestellte Quotient von 2,5.

Die durch Variation der Substratkonzentration an 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) erhaltenen Enzymaktivitäten zeigen in der graphischen Darstellung von Aktivität gegen Substratkonzentration ebenfalls den für eine Substratinhibierung typischen Verlauf (Abb. 8.7, siehe Anhang). Aus dieser Messreihe ließen sich die Werte für A_{\max} und $[S]_{1/2}$ nach dem Verfahren von Hanes und Woolf ermitteln.

Mit diesem Substrat tritt jedoch eine stärkere Inhibierung auf als mit 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**): Die Umsatzrate fällt nach Durchlaufen des Maximums schneller wieder ab. Für die Umsetzung des chlorierten Kongeners wurde mit 190 U/g eine weitaus geringere Reaktionsgeschwindigkeit gemessen als für das unsubstituierte 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**). Das Verhältnis der beiden gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten $A_{\max}(\text{HMSD})/A_{\max}(\text{HMSH})$ liegt mit 2,4 im Bereich des mit dem unchlorierten Substrat berechneten Wertes.

Dies bedeutet, dass die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase, und die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, gegenüber beiden Substraten die gleiche relative Aktivität aufweist. Durch den Chlor-Substituenten in Position 5 des Substrats 2-Hydroxy-

muconsäuresemialdehyd (**1**) erfahren beide Enzyme also die gleiche relative Erniedrigung der maximalen Aktivität (HMSH: 14 %, HMSD: 15 %).

Die im Rohextrakt gegenüber den beiden Substraten festgestellten Affinitäten zeigen eine klare Bevorzugung des 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyds (**6**) durch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase. Die halbe maximale Enzymaktivität wird mit diesem Substrat bei einer weitaus niedrigeren Konzentration erreicht als mit 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**).

Tab. 3.5: Im Rohextrakt mit den Substraten 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd bzw. 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd bestimmte maximale Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase (HMSD) für die Stämme *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311.

Organismus ^a	Substrat	A _{max} [U/g]	[S] _{1/2} [μM]
<i>P. putida</i> GJ31 (Chlorbenzol)	2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd	1350	35,7
	5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd	190 ^b	0,1 ^b
<i>P. putida</i> PaW1 (3-Methylbenzoat)	5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd	k. U. ^c	k. U. ^c
<i>P. putida</i> WR311 (4-Chlorbenzoat)	5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd	150	<4,6 ^d

^aDie Zellkulturen wurden auf den jeweils in Klammern angegebenen Wachstumssubstraten angezogen. ^bDiese Werte wurden rechnerisch nach Hanes und Woolf ermittelt. ^cNeben der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase konnte die Aktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase nicht bestimmt werden (siehe Text), die Expression des Enzyms wurde im Rohextrakt nachgewiesen. ^dDie niedrigste im Enzymtest eingesetzte Substratkonzentration ist angegeben (siehe Text). k. U. - Es konnte kein Umsatz festgestellt werden.

Die Enzymaktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase für das Substrat 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**) wurde im Rohextrakt einer auf 3-Methylbenzoat angezogenen *Pseudomonas putida* PaW1-Kultur bestimmt und somit die Expression des Enzyms nachgewiesen. Dieses Ergebnis wird durch andere Autoren (MURRAY et al., 1972; DUGGLEBY, 1979) bestätigt. Das Resultat der mit dem Substrat 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) durchgeführten Enzymtests ist nicht eindeutig: Neben der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase konnte nur für niedrige Substratkonzentrationen eine HMSD-Aktivität festgestellt werden (Abb. 8.8, siehe Anhang). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Enzymaktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase durch die schnellere hydrolytische Konkurrenzreaktion überdeckt wird und somit nicht neben der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase bestimmt werden kann. Weitere Untersuchungen mit gereinigtem Enzym oder dem Rohextrakt eines XylG-Expressionsstammes können über die Spezifität der

2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase gegenüber 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) Aufschluss geben.

Die Bestimmung der Reaktionsrate der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase mit dem Substrat 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) im Rohextrakt einer *Pseudomonas putida* WR311-Kultur ergab für den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich des Substrats eine Enzymaktivität von mindestens 150 U/g. Für Substratkonzentrationen, bei denen die Aktivität des Konkurrenzzyms (HMSH) niedrig war, wurden höhere Reaktionsgeschwindigkeiten der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase gemessen (Abb. 8.9, siehe Anhang).

Bei der Durchführung der Enzymtests stellte sich das Problem, dass bei geringen Substratmengen die Reaktion zu schnell beendet war, um eine lineare Anfangssteigung der Extinktionsänderung detektieren zu können. Als Maß für die Substrataffinität kann die Substratkonzentration, bei der die halbe maximale Enzymaktivität erreicht wird, daher nicht genauer angegeben werden als $< 4,6 \mu\text{M}$.

3.3.4 Aktivitäten der 4-Oxalocrotonat-Tautomerasen aus *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 für 2-Hydroxymuconsäure bzw. 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure

Die im *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt bestimmten 4-Oxalocrotonat-Tautomerase-Aktivität gegenüber dem Substrat 2-Hydroxymuconsäure (**2**) ist um den Faktor 70 größer als für 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**). Die Substrataffinitäten zeigen jedoch eine Bevorzugung des chlorierten Substrats.

In den Rohextrakten der beiden Organismen *Pseudomonas putida* PaW1 und WR311 konnte keine Enzymaktivität für 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) festgestellt werden. Für den Stamm *P. putida* PaW1 ist von anderen Arbeitsgruppen mit 2-Hydroxymuconsäure (**2**) Aktivität und somit auch die Expression des Enzyms im Rohextrakt nachgewiesen worden (MURRAY et al., 1972; DUGGLEBY, 1979). Überprüfungen der 4-Oxalocrotonat-Tautomerase-Aktivitäten in den hier verwendeten Rohextrakten mit 2-Hydroxymuconsäure (**2**) bestätigten die Expression des Enzyms sowohl für *Pseudomonas putida* PaW1 als auch WR311. Die 4-Oxalocrotonat-Tautomerasen der beiden Organismen besitzen also keine Aktivität für das Substrat 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**).

Tab. 3.6: Im Rohextrakt mit den Substraten 2-Hydroxyumuconsäure bzw. 5-Chlor-2-hydroxyumuconsäure bestimmte maximale Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der 4-Oxalocrotonat-Tautomerase (OT) für die Stämme *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311.

Organismus ^a	Substrat	A _{max} [U/g]	[S] _{1/2} [μM]
<i>P. putida</i> GJ31 (Chlorbenzol)	2-Hydroxyumuconsäure	10500	62,5
	5-Chlor-2-Hydroxyumuconsäure	150	36,8
<i>P. putida</i> PaW1 (3-Methylbenzoat)	5-Chlor-2-Hydroxyumuconsäure	k. U.	k. U.
<i>P. putida</i> WR311 (4-Chlorbenzoat)	5-Chlor-2-Hydroxyumuconsäure	k. U.	k. U.

^aDie Zellkulturen wurden auf den jeweils in Klammern angegebenen Wachstumssubstraten angezogen. k. U. - Es konnte kein Umsatz festgestellt werden.

3.3.5 Aktivitäten der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylasen aus *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 für 4-Oxalocrotonat bzw. 2-Chlor-4-oxalocrotonat

Die im Rohextrakt von *Pseudomonas putida* GJ31-Zellen bestimmten 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase-Aktivitäten zeigen für 4-Oxalocrotonat (**3**) eine deutlich höhere Umsatzgeschwindigkeit als für dessen chloriertes Kongener. Der [S]_{1/2}-Wert des 2-Chlor-4-oxalocrotonats (**8**) lag um den Faktor 4,8 höher als mit dem unsubstituierten Subst.

Tab. 3.7: Im Rohextrakt mit den Substraten 4-Oxalocrotonat bzw. 2-Chlor-4-oxalocrotonat bestimmte maximale Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase (OD) für die Stämme *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311.

Organismus ^a	Substrat	A _{max} [U/g]	[S] _{1/2} [μM]
<i>P. putida</i> GJ31 (Chlorbenzol)	4-Oxalocrotonat	31650 ^b	60,0 ^b
	2-Chlor-4-oxalocrotonat	2880	285
<i>P. putida</i> PaW1 (3-Methylbenzoat)	2-Chlor-4-oxalocrotonat	6460	0,4
<i>P. putida</i> WR311 (4-Chlorbenzoat)	2-Chlor-4-oxalocrotonat	4500	0,2

^aDie Zellkulturen wurden auf den jeweils in Klammern angegebenen Wachstumssubstraten angezogen. ^bDiese Werte wurden rechnerisch nach Hanes und Woolf ermittelt.

Im Gegensatz zu der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase aus *Pseudomonas putida* GJ31 unterliegen die Enzyme aus den Stämmen PaW1 und WR311 bei hohen Substratkonzentrationen einer Substratinhibierung.

3.3.6 Aktivitäten der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase aus *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 für Vinylpyruvat bzw. *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat

Die im Rohextrakt der auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Zellen festgestellte maximale Enzymaktivität der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase für das Substrat Vinylpyruvat (**4**) liegt um ein Vielfaches über den Aktivitäten, die mit den beiden Isomeren *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) gemessen wurden (Tab. 3.8). Gleichzeitig zeigte das Enzym für das unchlorierte Substrat die niedrigste Affinität. Die Werte für $[S]_{1/2}$ sind um den Faktor 5,4 (*cis*-) bzw. 4,2 (*trans*-Chlorvinylpyruvat, **9**) kleiner.

Die Unterschiede in den Aktivitäten und Substrataffinitäten bezüglich der beiden chlorierten Isomere sind vergleichsweise gering, so dass keine eindeutige Bevorzugung der *cis*- bzw. *trans*-Substitution der Doppelbindung des Substrats durch das Enzym festgestellt werden kann.

Tab. 3.8: Im Rohextrakt mit den Substraten Vinylpyruvat bzw. *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat bestimmte maximale Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase (OEH) für die Stämme *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311.

Organismus ^a	Substrat	A _{max} [U/g]	[S] _{1/2} [μM]
<i>P. putida</i> GJ31 (Chlorbenzol)	Vinylpyruvat	19000	92,4
	<i>cis</i> -Chlorvinylpyruvat	620	17,2
	<i>trans</i> -Chlorvinylpyruvat	500	22,2
<i>P. putida</i> PaW1 (3-Methylbenzoat)	<i>cis</i> -Chlorvinylpyruvat	14270	16,1
	<i>trans</i> -Chlorvinylpyruvat	5890	16,6
<i>P. putida</i> WR311 (4-Chlorbenzoat)	<i>cis</i> -Chlorvinylpyruvat	2370	18,6
	<i>trans</i> -Chlorvinylpyruvat	1200	20,3

^aDie Zellkulturen wurden auf den jeweils in Klammern angegebenen Wachstumssubstraten angezogen.

Im Rohextrakt einer *Pseudomonas putida* PaW1-Zellkultur wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase-Aktivitäten gegenüber den Substraten *cis*- und

trans-Chlorvinylpyruvat (**9**) festgestellt: Obwohl die Substrataffinitäten annähernd gleich sind, ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für die Umsetzung des *cis*-Isomers mehr als doppelt so groß wie für das *trans*-Isomer. Weiterhin konnte in dem untersuchten Konzentrationsbereich nur für die Verbindung mit der *cis*-substituierten Doppelbindung eine Substratinhibierung festgestellt werden. Im Enzymtest zeigte sich *in vitro*, dass bei einer Substratkonzentration des *cis*-Isomers, bei der für die *trans*-Verbindung die maximale Umsatzrate noch nicht erreicht ist, durch die Substratinhibierung fast keine Reaktion mehr stattfindet (Abb. 8.18, siehe Anhang).

Die Enzymtests, die mit Rohextrakt von auf 4-Chlorbenzoat gewachsenen *Pseudomonas putida* WR311-Zellen und den Substraten *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) durchgeführt wurden, lieferten das folgende Ergebnis: Bei vergleichbaren Substrataffinitäten wurde für das *cis*-Isomer eine doppelt so große 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase-Aktivität gemessen wie für die *trans*-substituierte Verbindung. Die maximale Umsatzrate des *cis*-Chlorvinylpyruvats (**9**) von 2370 U/g wurde bei einer Substratkonzentration von 44 $\mu\text{mol/l}$ gemessen. Bei Substratkonzentrationen von mindestens 46 $\mu\text{mol/l}$ konnten nur noch geringe Enzymaktivität von weniger als 100 U/g festgestellt werden (Abb. 8.19, siehe Anhang). Eine Abnahme der Enzymaktivität innerhalb eines so kleinen Bereichs der Substratkonzentration ist für eine Substratinhibierung äußerst untypisch. In der Regel sinkt die Reaktionsrate mit steigender Substratkonzentration nach Durchlaufen eines Maximums langsam ab.

Die maximale Reaktionsrate für das *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) wird erst in einem Konzentrationsbereich erreicht, in dem das *cis*-Isomer bereits nicht mehr umgesetzt wird.

3.3.7 Aktivitäten der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolasen aus *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 für (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxoalerat

Das chlorierte Substrat 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxoalerat (**10**) stand nicht zur Verfügung, so dass die Enzymaktivitäten der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolasen nur mit dem Metabolit des Catechol-Abbaus, 4-Hydroxy-2-oxoalerat (**5**) gemessen werden konnten. Für alle drei untersuchten Organismen wurden bei den Untersuchungen in Rohextrakten der jeweiligen Zellkulturen keine auffallenden Unterschiede in den Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten für die beiden möglichen Stereoisomere (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxoalerat (**5**) festgestellt (Tab. 3.9).

Tab. 3.9: Im Rohextrakt mit den Substraten (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat bestimmte maximale Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase (HOA) für die Stämme *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311.

Organismus ^a	Substrat	A _{max} [U/g]	[S] _½ [mM]
<i>P. putida</i> GJ31 (Chlorbenzol)	(S)-4-Hydroxy-2-oxovalerat	51790	0,9
	(R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat	48160	0,8
<i>P. putida</i> PaW1 (3-Methylbenzoat)	(S)-4-Hydroxy-2-oxovalerat	14350	2,4
	(R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat	16620	2,3
<i>P. putida</i> WR311 (4-Chlorbenzoat)	(S)-4-Hydroxy-2-oxovalerat	27380	2,7
	(R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat	23720	2,2

^aDie Zellkulturen wurden auf den jeweils in Klammern angegebenen Wachstumssubstraten angezogen.

Die maximalen Enzymaktivitäten der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolasen aller drei *Pseudomonas putida*-Stämme sind für jeweils beide Stereoisomere auffallend groß. Diese hohe Umsatzgeschwindigkeit wird jedoch erst bei sehr hohen Substratkonzentrationen erreicht, wie anhand der hohen Werte der Substrataffinitäten deutlich wird. Möglicherweise wird von MURRAY et al. (1972) für *P. putida* PaW1 eine Enzymaktivität von 19 U/g angegeben, da bei einer entsprechend niedrigen Substratkonzentration gemessen wurde.

3.3.8 Aktivitäten der Acetaldehyd-Dehydrogenasen aus *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 für Acetaldehyd und Chloracetaldehyd

Die Untersuchung der Aktivitäten der Acetaldehyd-Dehydrogenasen zeigt große Unterschiede zwischen den Enzymen der drei *Pseudomonas putida*-Stämme auf. Aus diesem Grund wurden die Enzymtests für alle Organismen mit den Substraten Acetaldehyd und Chloracetaldehyd durchgeführt. Eine Gemeinsamkeit, die hierbei gefunden wurde, ist die Inhibierung der Enzyme bei hohen Substratkonzentrationen.

Im Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *P. putida* GJ31-Zellkultur wurde für das unchlorierte Substrat eine weitaus höhere Umsatzrate sowie auch bessere Affinität festgestellt als für Chloracetaldehyd (Tab. 3.10). Überraschend fand ein Umsatz auch bei Abwesenheit von Coenzym A statt und der Zusatz von CoA bewirkte keine Aktivitätssteigerung. KUNZE (2002) berichtet über das Gen CbzQ einer Coenzym A-abhängigen Acetaldehyd-Dehydrogenase, welches für die Bildung von Acetyl-CoA aus Acetaldehyd von entscheidender Bedeutung ist.

ZERLIN (pers. Mitteilung) konnte im Enzymtest für die Acetaldehyd-Dehydrogenase NahO ebenfalls nur einen Coenzym A-abhängigen Umsatz feststellen. Dieses Enzym zeigte keine Aktivität für Chloracetaldehyd.

Im Rohextrakt von *Pseudomonas putida* PaW1-Zellen konnte keine Coenzym A-unabhängige Enzymaktivität nachgewiesen werden. Das Substrat Acetaldehyd wurde nur in Gegenwart des Cofaktors umgesetzt. Eine Umsetzung von Chloracetaldehyd erfolgte weder in An- noch in Abwesenheit des Coenzym A.

Tab. 3.10: Im Rohextrakt mit den Substraten Acetaldehyd und Chloracetaldehyd bestimmte maximale Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der Acetaldehyd-Dehydrogenase (ADA) für die Stämme *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311.

Organismus	Substrat	A _{max} [U/g]	[S] _{1/2} [μM]
<i>P. putida</i> GJ31 ^b (Chlorbenzol)	Acetaldehyd	370	6,1
	Chloracetaldehyd	170	16,4
<i>P. putida</i> PaW1 ^c (3-Methylbenzoat)	Acetaldehyd	19340	19500
	Chloracetaldehyd	k. U.	k. U.
<i>P. putida</i> WR311 ^b (4-Chlorbenzoat)	Acetaldehyd	1470	24650
	Chloracetaldehyd	1650	24400

^aDie Zellkulturen wurden auf den jeweils in Klammern angegebenen Wachstumssubstraten angezogen. ^bFür diesen Stamm wurde nur eine Coenzym A-unabhängige Enzymaktivität festgestellt. ^cFür diesen Stamm wurde nur eine Coenzym A-abhängige Enzymaktivität festgestellt. k. U. - Es konnte kein Umsatz festgestellt werden

Die Untersuchung der Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivität im Rohextrakt einer auf 4-Chlorbenzoat gewachsenen Zellkultur von *Pseudomonas putida* WR311 lieferte folgendes Ergebnis: Sowohl für das chlorierte wie auch das unchlorierte Substrat konnte nur eine Coenzym A-unabhängige Enzymaktivität festgestellt werden. Die Substrataffinitäten des Enzyms sind gegenüber beiden Verbindungen äußerst schlecht. Chloracetaldehyd wird etwas schneller umgesetzt als das nicht chlorierte Substrat. Das Enzym unterliegt gegenüber beiden Substraten einer Substratinhibierung, die für das Chloracetaldehyd macht sich aber bereits bei geringeren Substratkonzentrationen bemerkbar (Abb. 8.25, siehe Anhang)

Die in diesen Experimenten festgestellten Unterschiede in der Cofaktor-Abhängigkeit der Acetaldehyd-Dehydrogenasen für die Stämme *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 haben Folgen für die Reaktionsprodukte der von dem Enzym katalysierten Umsetzung. Da nur für den Stamm *P. putida* PaW1 eine Coenzym-A-Abhängigkeit beobachtet wurde, kann auch nur hier die Bildung von Acetyl-CoA erwartet werden. Für die Enzyme aus den beiden anderen

Organismen ist hingegen (Chlor-)Essigsäure als Produkt der Umsetzung von (Chlor-) Acetaldehyd zu erwarten. Das Vorkommen einer diese Reaktion katalysierenden Acetaldehyd-Dehydrogenase wird von ARENSDORF & FOCHT (1995) für den 4-Chlorbiphenyl abbauenden Stamm *Pseudomonas cepacia* P166 behauptet, wurde aber nicht nachgewiesen.

3.4 Wachstumverhalten von *Pseudomonas putida* WR311 auf 4-Chlorbenzoat

Die Mineralisierung von 4-Chlorbenzoat verläuft bei *Pseudomonas putida* WR311 über den zentralen Metaboliten 4-Chlorcatechol. Um mögliche Korrelationen zwischen dem Verlauf des Zellwachstums und den Ergebnissen der Enzymtests feststellen zu können, wurde der Verlauf des Wachstums einer Flüssigkultur mit 4-Chlorbenzoat als alleiniger Kohlenstoffquelle genauer untersucht.

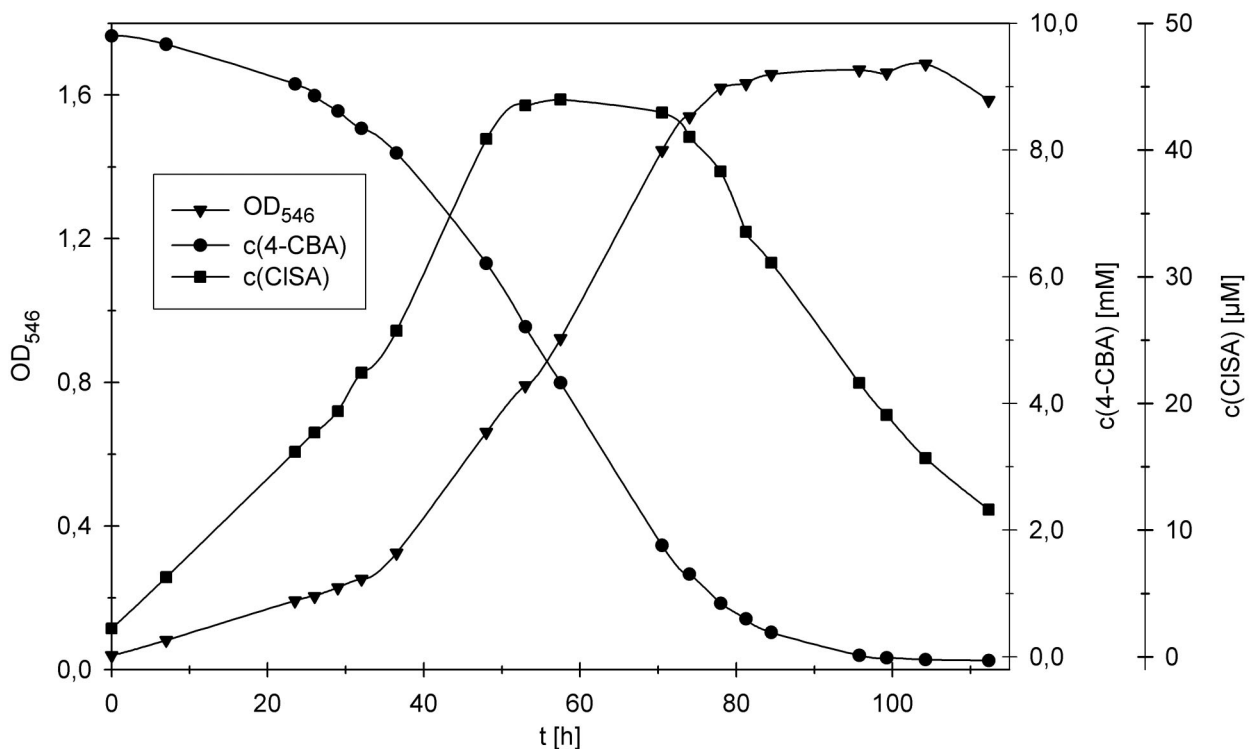


Abb. 3.31: Wachstumskurve einer *Pseudomonas putida* WR311-Flüssigkultur mit 10 mM 4-Chlorbenzoat (4-CBA) als Kohlenstoffquelle (OD₅₄₆ ▼). Es ist zusätzlich der Verlauf der Substrat- (c(4-CBA) [mM] ●) und 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd-Konzentration (c(CISA) [µM] ■) angegeben. Die maximale Konzentration des Metaboliten beträgt 44 µM.

Das Wachstum von *Pseudomonas putida* WR311 auf 4-Chlorbenzoat wurde durch Trübungsmessung bei 546 nm verfolgt. 100 ml Mineralmedium mit einer Substratkonzentration von 10 mM 4-Chlorbenzoat wurden mit 1,5 ml einer Vorkultur (OD = 1,4) angeimpft.

Da eine Zellkultur dieses Stammes während der Wachstumsphase eine klare Gelbfärbung erkennen ließ, wurden parallel zur Zelldichte die Substrat-, 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd- und 4-Chlorcatechol-Konzentration bestimmt: Bei jeder Probennahme wurden Volumina von jeweils 500 µl aliquotiert und die optische Dichte der Zellsuspension bestimmt. Die Probe wurde 1 Minute bei 13500 Upm zentrifugiert und die Extinktion der Lösung bei 379 nm ermittelt. Die Konzentrationen an 4-Chlorbenzoat und 4-Chlorcatechol wurden nach vorheriger Aufnahme von Eichgeraden durch HPLC bestimmt. 4-Chlorcatechol konnte in der Zellsuspension zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

Die Zelldichte der Kultur zeigt den erwarteten sigmoiden Kurvenverlauf. In gleichem Maße, wie die Dichte der Zellsuspension zunahm, sank die Konzentration an 4-Chlorbenzoat. Wie vermutet, stieg während des exponentiellen Wachstums die Konzentration an 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) an, nahm aber mit Eintreten der stationären Phase wieder ab. Es wurde eine maximale Konzentration von 44 µM festgestellt. Als Verdopplungszeit wurden 14,8 Stunden bestimmt.

4. Diskussion

4.1 Chemische Darstellung der beim Abbau von Catechol und 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg auftretenden Metabolite

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Synthesen verliefen mit guten bis befriedigenden Gesamtausbeuten. Die über mehrere Stufen verlaufenden Synthesen von 2-Amino-4-hydroxypentansäure (**17**) und 2-Amino-5-chlor-4-hydroxypentansäure (**33**) lieferten die jeweiligen Produkte mit nur sehr niedrigen Gesamtausbeuten von 3 bzw. 5 %. Die Tatsache, dass die Substanzen zur Untersuchung von Enzymreaktionen dienen sollten und hierfür nur geringe Mengen notwendig sind, macht auch diese Ergebnisse durchaus zufriedenstellend.

Es konnte für die unchlorierten - und auch für einige der chlorierten - Substrate der untersuchten metabolischen Sequenz ein einfacher Zugang durch über wenige Stufen verlaufende chemische Synthesen bestätigt oder etabliert werden.

Die Einzelschritte der dreistufigen Synthese von 2-Hydroxymuconsäure (**2**) waren aus der Literatur bekannt. Es wurde mit einer Gesamtausbeute von 26 % ein besseres Ergebnis erzielt und reineres Rohprodukt erhalten als für die alternative einstufige Darstellung. Der letzte Schritt der Demethylierung der Hydroxyfunktion erwies sich als nicht auf das chlorierte Kongener übertragbar. Mit klassischen Demethylierungsreagenzien fand hierbei keine Reaktion statt, für extremere Reaktionsbedingungen ist das gesamte System jedoch zu empfindlich. Hier ist bei der Anwendung nucleophiler Reagenzien als ungewünschte Nebenreaktion die Substitution des Chlors in Betracht zu ziehen. Die enzymatisch isolierte 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) zeigte zumindest in Lösung geringe Stabilität. Möglicherweise ist die Zielverbindung über die hier angewandten Synthesemethoden aufgrund ihrer Labilität nicht darstellbar.

Bei der durchgeführten Alternativsynthese über die Maskierung der OH-Gruppe als Methylsulfonsäureester erwies sich bereits die Ringspaltung des aromatischen Systems unter den gewählten Bedingungen als nicht durchführbar. Auf weitere Versuche einer Darstellung der 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) wurde verzichtet und eine Methode zur Anreicherung in Lösung nach enzymatischer Darstellung erarbeitet (siehe 3.2.2).

Säurekatalysierte Tautomerisierung der 2-Hydroxymuconsäure (**2**) führte zu einem Gemisch von 2-Oxo-3-hexendisäure (**3a**) und 4-Oxalocrotonat (**3b**). Für die in dieser Arbeit durchgeführten

enzymkinetischen Untersuchungen war dieses Tautomerengemisch als Substrat ausreichend. Auch im Fall der chlorierten Metabolite wurde die Substratlösung für die Enzymtests durch protonenkatalysierte Tautomerie erhalten. Aufgrund der Instabilität der hierbei ausschließlich gebildeten 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**) musste die Reaktion jedoch vor Erreichen des Gleichgewichts abgebrochen werden, so dass in den Enzymtests ein Gemisch der Keto-Verbindung mit dem Edukt 5-Chlor-2-Hydroxymuconsäure (**7**) eingesetzt wurde.

Die Darstellung von Vinylpyruvat (**4**) erfolgte durch thermische Decarboxylierung von 2-Hydroxymuconsäure (**2**) nach einer Vorschrift von LIAN & WHITMAN (1993) mit einer befriedigenden Ausbeute von 60 %. Für die beiden chlorierten Kongenere konnte der folgende Syntheseweg etabliert werden: Die bereits in der Literatur beschriebene Darstellung von 5-Chlor-2-amino-4-pentensäure (**30**) bot die Möglichkeit, durch Wahl der Edukte stereoisomerenreine Produkte in 28 bzw. 30%iger Ausbeute zu erhalten. Durch Umsetzung mit einem Gemisch aus D- und L-Aminosäureoxidase konnte hieraus jeweils *cis*- bzw. *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) hergestellt werden.

Auch bei der geplanten enantiomerenreinen Synthese von 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerat (**10**) konnte die Konfiguration des Stereozentrums durch Wahl der eingesetzten Edukte gesteuert werden: Durch Einsatz der käuflich erhältlichen chiralen Epichlorhydrine konnte unter Erhalt der Konfiguration am chiralen Zentrum (4R)- bzw. (4S)-2-Amino-5-chlor-4-hydroxypentensäure (**33**) dargestellt werden. Zur Abtrennung von anorganischen Verunreinigungen wurde eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt, bei der die Elution mit 1 M NH₃-Lösung erfolgte. Hier hätte vorhergesehen werden müssen, dass unter diesen Bedingungen eine Eliminierung des Chlorsubstituenten durch die benachbarte Hydroxyfunktion zu erwarten war. Eine Aufreinigung der isolierten Rohprodukte unter neutralen bis sauren Bedingungen wäre hier angebracht gewesen. Aus zeitlichen Gründen konnte eine modifizierte Aufarbeitung nicht mehr durchgeführt werden.

Die Alternativsynthese über das Isoxazolinsystem lieferte ein Enantiomerenpaar der 2-Amino-5-chlor-4-hydroxypentensäure (**33**) mit einer Gesamtausbeute von 10 %. Wie bei der Synthese des unchlorierten Analogons sollte nun die Darstellung der enantiomerenreinen Zielverbindung durch Umsetzung mit einer geeigneten Aminosäureoxidase erfolgen. Eine Umsetzung des chlorierten Substrats durch die stereoselektiven Enzyme wurde jedoch nur ansatzweise festgestellt, so dass das Ziel der Darstellung von enantiomerenreinem 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerat (**10**) nicht erreicht wurde.

Im Fall der Synthese von 4-Hydroxy-2-oxovalerat (**5**) wurde als Vorstufe die diastereomerenreine Aminosäure mit 7 % Gesamtausbeute erhalten. Die enzymatische Oxidation

zur Ketoverbindung war hier durch Umsetzung mit D- bzw. L-Aminosäureoxidase ohne Probleme möglich.

Die für die HPLC-Analytik als Standard benötigten Phenylhydrazone des Pyruvats und Acetaldehyds konnten nach etablierten Synthesen problemlos in guten Ausbeuten dargestellt werden.

4.2 Charakterisierung der beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31 auftretenden Metabolite

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurde der in Abbildung 4.1 postulierte Abbauweg für 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31 nach Wachstum auf Chlorbenzol *in vitro* bestätigt. Die für den Abbau postulierten Zwischenstufen 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**), 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**), *cis*-Chlorvinylpyruvat (**9**), 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxoalerat (**10**) und Pyruvat konnten durch Umsetzungen mit Rohextrakt nachgewiesen werden. Die Umsetzung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) durch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase wurde in dieser Darstellung nicht berücksichtigt, weil der hydrolytische Weg im Vergleich zum dehydrogenolytischen Pfad in *Pseudomonas putida* GJ31 eine untergeordnete Rolle spielt (siehe 4.4.2).

Der Nachweis des Metaboliten 5-Chlor-2-oxo-4-hexendisäure (**8a**) gelang nicht. Aufgrund von in Abschnitt 4.2.3 dargelegten Überlegungen kann jedoch davon ausgegangen werden, dass der Abbau über diese Zwischenstufe erfolgt. Das Auftreten des Metaboliten Chloracetaldehyd konnte ebenfalls nicht bewiesen werden. Durch den Nachweis von Pyruvat als Produkt der Umsetzung von *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) durch *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt (siehe 3.2.6.2) und die im Rohextrakt festgestellten Aktivitäten der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase und der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase aber kann auch diese Verbindung als Zwischenprodukt des Abbauweges angesehen werden.

Das Produkt der Umsetzung von Chloracetaldehyd durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase wurde nicht isoliert und nachgewiesen. Im Rohextrakt konnte jedoch durch Enzymtests (siehe 3.3.8) ein Coenzym A-unabhängiges Enzym festgestellt werden, das dieses Substrat umsetzt. In Analogie zu dem vorgeschlagenen Abbauweg von 4-Chlorbiphenyl durch *Pseudomonas cepacia* P166

(ARENSDORF & FOCHT, 1995) kann Chloressigsäure als Reaktionsprodukt dieser Umsetzung postuliert werden.

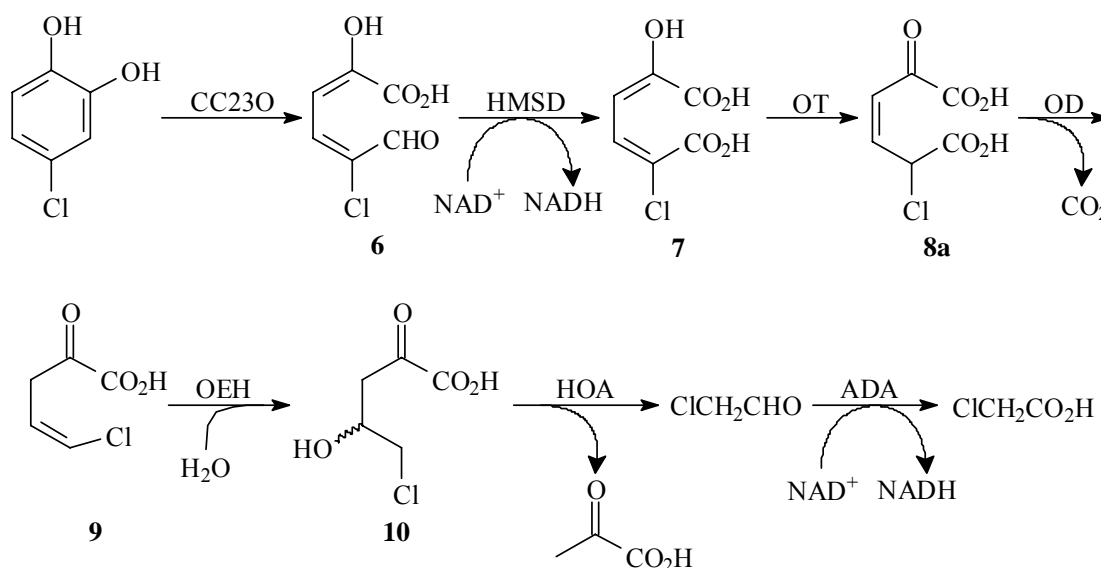


Abb. 4.1: Der in dieser Arbeit nachgewiesene Abbau von 4-Chlorcatechol in *Pseudomonas putida* GJ31 nach Wachstum auf Chlorbenzol. Die Bildung von Chloressigsäure wird postuliert (siehe Text). C23O - Catechol-2,3-Dioxygenase, HMSD - 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, OT - 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, OD - 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, OEH - 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase, HOA - 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase, ADA - Acetaldehyd-Dehydrogenase.

4.2.1 Charakterisierung des Spaltprodukts der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase

Die oxidative Ringöffnung des aromatischen Systems 4-Chlorcatechol durch die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase erfolgt nach den im experimentellen Teil dargelegten Daten ausschließlich proximal, d. h. zwischen den Positionen 2 und 3 (siehe Abb. 1.5). Das hierbei gebildete 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) konnte durch Derivatisierung zu 5-Chlorpicolinsäure (**21**) nachgewiesen werden. Der Nachweis erfolgte durch Vergleich der kernresonanzspektroskopischen Daten mit denen der chemisch synthetisierten Referenzverbindungen 4- und 5-Chlorpicolinsäure (**19**, **21**) sowie durch HPLC-Untersuchungen.

Im Gegensatz zu Hinweisen aus der Literatur (WIESER et al., 1994) gelang die Aufkonzentration des Metaboliten zur Gewinnung von NMR- und massenspektrometrischen Daten nicht. Er erwies sich als hierfür zu instabil, was sich auch in der starken Temperaturabhängigkeit seiner Halbwertszeit zeigte.

Die Lösung des Ringspaltungsprodukts zeigte aber mit Literaturangaben übereinstimmende Absorptionscharakteristika (WIESER et al., 1994). Durch Experimente zur pH-Abhängigkeit des UV-Spektrums des Metaboliten konnte ein pK_s -Wert von 4,9 bestimmt werden, der geringfügig kleiner ist als ein von MORRIS & BARNSLEY (1982) angegebener Wert (5,2).

4.2.2 Charakterisierung des Produkts der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase

Das Produkt der Umsetzung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) durch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase wurde in Lösung angereichert und spektroskopisch charakterisiert. Da keine Referenzverbindung zur Verfügung stand, konnten die aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren gewonnenen Daten nicht verglichen werden. Sie korrelieren aber gut mit der postulierten Struktur der 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**). Weiterhin gelang die Aufnahme eines Massenspektrums, das die Identität der isolierten Verbindung ebenfalls bestätigt.

4.2.3 Charakterisierung der Produkte der 4-Oxalocrotonat-Tautomerase und der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase

Das Produkt des sich im *meta*-Weg anschließenden Enzyms 4-Oxalocrotonat-Tautomerase konnte nicht durch Umsetzungen mit *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt (Wachstums-substrat: Chlorbenzol) isoliert oder angereichert werden. Der Versuch der Inhibierung der Mg^{2+} -abhängigen 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase mit EDTA gelang nicht: 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) oder 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) wurde unter Zusatz von EDTA mit *P. putida* GJ31-Rohextrakt versetzt und die Reaktionslösung einer Festphasenextraktion unterworfen. Es wurde eine Lösung erhalten, deren ^1H - und ^{13}C -Spektren keine Signale aufwiesen, die mit denen der durch protonenkatalysierten Tautomerie des 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) erhaltenen Verbindung 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**, siehe 3.2.3) übereinstimmten oder dessen Tautomer 2-Chlor-4-oxalocrotonat (**8b**) zugeordnet werden konnten.

Bei diesen Experimenten wurde immer nur das Produkt der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase, *cis*-Chlorvinylpyruvat (**9**) nachgewiesen. Die Aktivität der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase konnte durch Komplexierung der zweiwertigen Ionen nicht so weit herabgesetzt werden, dass ihr Substrat isoliert werden konnte. Stattdessen wurde das Folgeenzym, die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase, effektiv durch EDTA inhibiert.

Als Produkt der Umsetzung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) durch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase und anschließend die 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase konnte, wie bereits erwähnt, ausschließlich *cis*-Chlorvinylpyruvat (**9**) nachgewiesen werden. Von diesem Metaboliten gelang die Aufnahme eines Protonenresonanz- und Massenspektrums. Da die Spektren mit den Daten der chemisch synthetisierten Referenzverbindung übereinstimmen, kann die Identität der Verbindung als ausreichend charakterisiert betrachtet werden.

Es kann davon ausgegangen werden, dass durch die oxidative Ringspaltung des aromatischen 4-Chlorcatecholsystems auf der Stufe des 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyds (**6**) und somit auch bei der 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) eine E-Substitution der Doppelbindung an C-4 vorgelegen hat. Es findet also auf dem Weg von der 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) zum Chlorvinylpyruvat (**9**) eine Konfigurationsumkehr an C-5 statt. Dies ist nur möglich, wenn die enzymkatalysierte Reaktionsfolge über die Zwischenstufe der 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**) verläuft, da nur hier eine freie Drehbarkeit der C-C-Bindung zwischen C-4 und C-5 gegeben ist (Abb. 4.2).

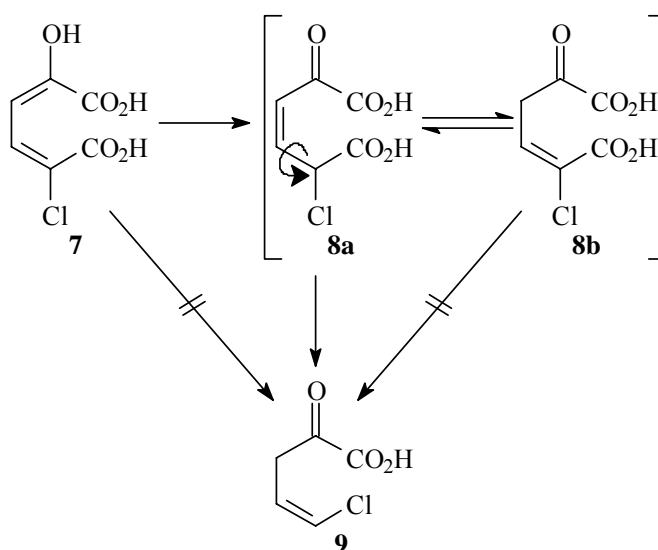


Abb. 4.2: Ausschließliche Bildung von *cis*-Chlorvinylpyruvat (**9**) aus 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) über 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**) durch Drehung um die C-C-Bindung zwischen C-4 und C-5.

Diese zwischen der 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) und dem *cis*-Chlorvinylpyruvat (**9**) stattfindende *cis-trans*-Isomerisierung muss durch den Reaktionsmechanismus der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase gegeben sein, da nur so erklärt werden kann, dass kein *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) isoliert werden konnte.

Diese Schlussfolgerung stimmt mit Ergebnissen überein, die bei Untersuchungen der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase aus *Pseudomonas putida* PaW1 gemacht wurden: HARAYAMA et al. (1989) identifizierten 2-Oxo-3-hexendisäure (**3a**) als Substrat. Wie SPARNIS et al. (1974) betonen, handelt es sich bei diesem Isomer um die Struktur, bei der eine Decarboxylierung bevorzugt stattfindet. Anhand von Markierungsexperimenten konnte von LIAN & WHITMAN (1994) bei Umsetzungen mit 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase aus *Pseudomonas putida* PaW1 eine hohe Stereoselektivität festgestellt werden. Die Ergebnisse legen einen Reaktionsmechanismus nahe, der, übertragen auf das chlorierte Substrat, ebenfalls ausschließlich *cis*-Chlorvinylpyruvat (**9**) als Produkt liefern würde.

Durch die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase wird also aus 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) das selbe Produkt gebildet wie durch die protonenkatalysierte Tautomerie in wässriger Lösung (siehe 3.2.3). Dies korreliert mit Daten, die WHITMAN et al. (1991) für die unchlorierte 2-Hydroxymuconsäure (**2**) und die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase aus *Pseudomonas putida* PaW1 gefunden haben.

4.2.4 Charakterisierung der Produkte der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase und 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase

Eine Isolierung und Charakterisierung des Produkts der Umsetzung von *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) durch die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase gelang nicht. Dies lag zum einen sicherlich an der Instabilität des gebildeten Metaboliten, andererseits auch an der hohen Enzymaktivität - zumindest den unchlorierten Substraten gegenüber - der nachfolgenden 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase. Erschwert wurde eine Identifikation durch das Fehlen einer Referenzverbindung und somit auch spektroskopischer Daten. Denn durch Umsetzung von Vinylpyruvat (**4**) mit *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt und saurer Aufarbeitung konnte im ¹H-NMR-Spektrum der Elutionslösung der Festphasenextraktion ein Hinweis auf den Metaboliten gefunden werden: Es waren Signale vorhanden, deren chemische Verschiebungen mit denen der Referenzverbindung 3-Hydroxy-5-methyl-5*H*-2-furanon (**14b**), die durch

Lactonisierung aus 4-Hydroxy-2-oxovalerat (**5**) gebildet wird, übereinstimmen. Wegen der geringen Intensität und schlechten Auflösung der Peaks war eine Bestimmung der Kopplungskonstanten nicht möglich.

Um einen eindeutigeren Nachweis der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase-Metabolite zu erhalten, wurden verschiedene Metabolite mit *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt umgesetzt und nach Derivatisierung der Reaktionslösung mit Phenylhydrazin eine HPLC-Analyse durchgeführt. Neben dem Lacton des 4-Hydroxy-2-oxovalerats (**14a**) konnten Spuren weiterer Metabolite identifiziert und somit die entsprechenden Umsetzungen bestätigt werden:

Beide Isomere des Chlorvinylpyruvats (**9**) werden von *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt über 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerat (**10**) zum Pyruvat metabolisiert. Chloracetaldehyd als weiteres Spaltungsprodukt der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase konnte nicht nachgewiesen werden. Die analoge Umsetzung von Vinylpyruvat (**4**) zum 4-Hydroxy-2-oxovalerat (**5**), welches ebenfalls weiter zum Pyruvat abgebaut wird, wurde nachgewiesen. In diesem Experiment wurde auch die Bildung von Acetaldehyd bestätigt. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass auch das chlorierte Kongener 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerat (**10**) durch die 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase in Pyruvat und das hier nicht nachgewiesene Chloracetaldehyd gespalten wird.

4.3 Bestimmung der maximalen Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten der für den Abbau von 4-Chlorcatechol postulierten Enzyme des *meta*-Weges in Rohextrakten von *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311

Die Enzyme des *meta*-Weges der *Pseudomonas putida*-Stämme GJ31, PaW1 und WR311 sollten auf ihre Substratspezifität hin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Enzymtests in Rohextrakten von Zellkulturen dieser drei Organismen durchgeführt. Als Substrate wurden für den Stamm GJ31 sowohl Metabolite von Catechol als auch Metabolite von 4-Chlorcatechol eingesetzt. Die Enzymaktivitäten in den Rohextrakten von *P. putida* PaW1 und WR311 wurden nur mit den chlorierten Substraten bestimmt.

Da alle Enzymaktivitäten in Rohextrakten von Zellkulturen gemessen wurden, erfolgte keine Differenzierung zwischen eventuell vorhandenen Isoenzymen. Vergleichbare Literaturwerte sind

daher nur in wenigen Fällen verfügbar: So ergibt sich für die mit den Substraten Catechol bzw. 4-Chlorcatechol ermittelten Enzymaktivitäten der Catechol-2,3-Dioxygenasen aus *Pseudomonas putida* GJ31 eine gute Übereinstimmung mit Daten des gereinigten Enzyms (KASCHABEK et al., 1998, siehe 3.3.1). Die unterschiedlichen Substrataffinitäten für *Pseudomonas putida* GJ31 und den CbzE-Expressionsstamm *Escherichia coli* JM109 (pU2-36) sprechen jedoch dafür, dass im GJ31-Rohextrakt ein weiteres dioxygenolytisches Enzym aktiv ist. KUNZE (2002) konnte innerhalb des *meta*-Operons des Plasmids pKW1 aus *P. putida* GJ31 ein Gen einer weiteren Catechol-2,3-Dioxygenase CbzE(2) nachweisen.

Die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* GJ31 sowie die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolasen aller drei untersuchten Organismen unterliegen einer Substratinhibierung. Obwohl die maximalen Aktivitäten und Substrataffinitäten der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenasen aus *Pseudomonas putida* PaW1 und WR311 (siehe 3.3.3) neben den Hydrolasen nicht bestimmt werden konnten, wurde auch in den Rohextrakten dieser Stämme mit hohen Substratkonzentrationen eine abnehmende HMSD-Aktivität festgestellt (siehe Abb. 8.8 und 8.9, Anhang). Zusätzlich unterscheiden sich die Substrataffinitäten der beiden Enzyme, die das Ringspaltungsprodukt umsetzen, für jeden untersuchten Stamm beträchtlich. Es handelt sich bei dieser Verzweigungsstelle des Abbauweges also um einen für den Stofffluss entscheidenden Punkt. Welcher Pfad des *meta*-Weges für welchen Metaboliten jeweils eingeschlagen wird, ist nur schwer abzuschätzen, da hier die Substratkonzentration eine erhebliche Rolle spielt. Eine detaillierte Diskussion dieser Fragestellung erfolgt später (Abschnitt 4.4).

Die maximale Enzymaktivität der 4-Oxalocrotonat-Tautomerase aus *Pseudomonas putida* GJ31 unterscheidet sich stark für die beiden Substrate 2-Hydroxymuconsäure (**2**) und 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**). Für das Substrat mit dem Chlorsubstituenten an Position 5 wird nur noch 1,4 % der Aktivität gegenüber der unsubstituierten Verbindung erreicht. In den Rohextrakten der Stämme *P. putida* PaW1 und WR311 konnte mit dem chlorierten Substrat keine Aktivität gemessen werden. Da die Geschwindigkeit der spontanen, protonenkatalysierten Tautomerie der 2-Hydroxymuconsäure (**2**) nach HARAYAMA et al. (1987) für ein Zellwachstum unter ausschließlicher Verwendung des dehydrogenolytischen Zweiges nicht ausreicht, ist in diesen Organismen beim Abbau von 4-Chlorcatechol dieser Pfad des *meta*-Weges versperrt.

Für die 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase aus *Pseudomonas putida* GJ31 wurde ein großer Unterschied zwischen den Substraten Oxalocrotonat (**3**) und 2-Chlor-4-oxalocrotonat (**8**) festgestellt: Das unchlorierte Substrat wird sehr viel schneller umgesetzt als das chlorierte Kongener. Für 4-Oxalocrotonat (**3**) wurde auch eine um den Faktor 4,8 bessere Substrataffinität

bestimmt. Die in den Rohextrakten der Stämme *P. putida* PaW1 und WR311 vorhandenen 4-Oxalocrotonat-Decarboxylasen unterscheiden sich von dem Enzym aus *Pseudomonas putida* GJ31, da sie bei hohen Konzentrationen von 2-Chlor-4-oxalocrotonat (**8**) einer Substratinhibierung unterliegen.

Die Untersuchung der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase aus *Pseudomonas putida* GJ31 zeigte einen deutlichen Unterschied für die Substrate Vinylpyruvat (**4**) und die beiden isomeren Chlorvinylpyruvate (**9**). Für die chlorierten Kongenere werden maximal 3 % der Enzymaktivität des Vinylpyruvats (**4**) erreicht. Es wurde jedoch in beiden Fällen eine deutlich höhere Affinität des Enzyms zu diesen Substraten festgestellt. Die mit den Substraten *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) ermittelten Daten zeigen keine Bevorzugung einer der Verbindungen durch das Enzym.

Hierin zeigt sich eine Diskrepanz zu den Stämmen *P. putida* PaW1 und WR311: In den Rohextrakten beider Organismen wurde ein abweichendes Verhalten der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase gegenüber den beiden Isomeren des Chlorvinylpyruvats (**9**) festgestellt: Die Enzyme beider Organismen zeigten für das *cis*-Isomer eine bedeutend höhere maximale Enzymaktivität als für die *trans*-substituierte Verbindung. Auch wurde nur für das *cis*-Chlorvinylpyruvat eine Substratinhibierung festgestellt (Abb. 8.18 und 8.19, siehe Anhang).

Die 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase-Aktivitäten konnten nur mit den beiden Stereoisomeren des unchlorierten Substrats gemessen werden, da die Verbindung 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxoalerat (**10**) nicht zur Verfügung stand. Das Verhalten der Enzyme aller drei *Pseudomonas putida*-Stämme GJ31, PaW1 und WR311 gegenüber den Substraten war sehr ähnlich: Es konnten mit beiden Stereoisomeren für keinen Organismus wesentliche Unterschiede bezüglich der Aktivitäten und Substrataffinitäten festgestellt werden. Die 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolasen der untersuchten Organismen besitzen also keine Stereoselektivität.

In der Literatur wird von stereoselektiven 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolasen aus verschiedenen Organismen berichtet (DAGLEY & GIBSON (1965) - *Pseudomonas putida* U und L, SALA-TREPAT & EVANS (1971) - *Azotobacter vinelandii* 206, COLLINSWORTH et al. (1973) - *Pseudomonas putida* U, POLLARD et al. (1998) - *Escherichia coli* W3110). Die Stereoselektivität wurde jedoch immer in teilweise gereinigten Zellextrakten nachgewiesen. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Expression isofunktioneller Enzyme im nicht-fraktionierten Rohextrakt keine Stereoselektivität beobachtet werden kann. Es existieren aber auch Hinweise auf nicht stereoselektive 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolasen. So berichten BURLINGAME & CHAPMAN (1983) von einem teilweise gereinigten, beide Enantiomere des 4-Hydroxy-2-oxoalerats (**5**)

umsetzenden Enzym, welches aus einem Rohextrakt einer *Escherichia coli* K-12-Zellkultur isoliert wurde.

Die Acetaldehyd-Dehydrogenase stellt offenbar ein Schlüsselenzym für die Fähigkeit dar, 4-Chlorcatechol mineralisieren zu können. Das Enzym des Stammes *Pseudomonas putida* PaW1, der nicht in der Lage ist, 4-Chlorcatechol als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen, besitzt keine Aktivität für Chloracetaldehyd. Für Acetaldehyd wurde eine Coenzym A- und NAD⁺-abhängige Aktivität festgestellt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Produkt dieser Reaktion Acetyl-CoA ist. Wie in Abbildung 1.6 dargestellt, wird Catechol durch *P. putida* PaW1 zu den zentralen Stoffwechsel-Metaboliten Pyruvat und Acetyl-CoA abgebaut.

Der Abbau des Substrats 4-Chlorcatechol scheitert an der Umsetzung des letzten Metaboliten des *meta*-Weges, dem Chloracetaldehyd. Dies wird beim Vergleich der Ergebnisse der Enzymtests der Stämme PaW1 und WR311 deutlich: Die Substratverwertungsmuster der Enzyme des *meta*-Weges beider Organismen zeigten große Übereinstimmungen. Die 4-Oxalocrotonat-Tautomerasen besitzen keine Aktivität für 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (7), die 4-Oxalocrotonat-Decarboxylasen unterliegen einer Substratinhibierung gegenüber 2-Chlor-4-oxalocrotonat (8). Das Verhalten der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratasen gegenüber den beiden Isomeren des Chlorvinylpyruvats (9) ist ähnlich und in den Rohextrakten beider Stämme konnten die maximalen Aktivitäten und Substrataffinitäten der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenasen neben den 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolasen nicht bestimmt werden. Ein gravierender Unterschied zwischen den Eigenschaften der Enzyme der Organismen konnte nur bezüglich der Acetaldehyd-Dehydrogenase festgestellt werden. Im Rohextrakt einer *Pseudomonas putida* WR311-Kultur wurde Aktivität für das Substrat Chloracetaldehyd nachgewiesen. Im Unterschied zu *P. putida* PaW1 ist der Stamm WR311 jedoch in der Lage, 4-Chlorbenzoat über die Zwischenstufe 4-Chlorcatechol zu mineralisieren. Die in *Pseudomonas putida* WR311 exprimierte Acetaldehyd-Dehydrogenase besitzt auch eine vom Enzym aus *P. putida* PaW1 unterschiedliche Coenzym-Abhängigkeit: Die Enzymaktivität zeigte sich von Coenzym A unabhängig. Die Anwesenheit des Cofaktors in der Reaktionsküvette hatte keinerlei Einfluss auf die Aktivität.

Auch die Acetaldehyd-Dehydrogenase aus dem Stamm *Pseudomonas putida* GJ31 ist nur auf den Cofaktor NAD⁺ angewiesen. Bei der Bestimmung der Aktivitäten für die Substrate Acetaldehyd und Chloracetaldehyd wurde keine Coenzym A-Abhängigkeit festgestellt. Und auch GJ31 ist wie WR311 in der Lage, 4-Chlorcatechol zu metabolisieren.

KUNZE (2002) konnte lediglich ein Gen *cbzQ* identifizieren, dessen in die Aminosäuresequenz übersetzte Sequenz ein Motiv beinhaltet, welches in vielen Acetaldehyd-Dehydrogenasen, auch

XylQ aus *P. putida* PaW1, vorhanden ist. Diesem Motiv kommt für die Bildung von Acetyl-CoA aus Acetaldehyd eine entscheidende Bedeutung zu. Bei der hier nachgewiesenen Acetaldehyd-Dehydrogenase handelt es sich offensichtlich um ein weiteres, im Rohextrakt dominierendes Enzym. Das Gen dieses Coenzym A-unabhängigen Enzyms wurde bisher noch nicht lokalisiert. Aufgrund des von der Acetaldehyd-Dehydrogenase benötigten Cofaktors wird an dieser Stelle für diese beiden Organismen Chloressigsäure als Produkt des Abbaus von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg postuliert. Dieses Ergebnis ist bereits in die Darstellung des Abbauweges in Abbildung 4.1 eingeflossen. Bisher wurde allgemein angenommen, dass - wie auch in der Einleitung unter 1.3 beschrieben - durch die Acetaldehyd Dehydrogenase (Chlor-)Acetaldehyd zu (Chlor-)Acetyl-CoA umgesetzt wird.

4.3.1 Rückschlüsse aus den Ergebnissen der Enzymtests auf die in *Pseudomonas putida* WR311 exprimierten Enzyme

Pseudomonas putida WR311 ist ein Konjugationsprodukt aus den Stämmen *P. putida* GJ31 und PaW1, welches nach mehrwöchiger Selektion auf 4-Chlorbenzoat isoliert werden konnte. Aus den Ergebnissen der mit den chlorierten Substraten durchgeführten Enzymtests können teilweise Rückschlüsse über die in dem Hybrid-Stamm *P. putida* WR311 bei Wachstum auf 4-Chlorbenzoat exprimierten Enzyme gewonnen werden:

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erläutert, zeigen die Resultate der Enzymtests Analogien in den Eigenschaften der Enzyme 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase und 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase der Organismen *Pseudomonas putida* PaW1 und WR311 auf. Die Unterschiede zum Verhalten der entsprechenden Enzyme aus *P. putida* GJ31 ist sehr auffällig. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Gene in *P. putida* WR311, die für diese im Rohextrakt dominierenden aktiven Enzyme kodieren, aus dem Stamm PaW1 stammen. Als Ergebnis der Enzymtests ist weiterhin wahrscheinlich, dass es sich bei der in *Pseudomonas putida* WR311 exprimierten Acetaldehyd-Dehydrogenase um das Enzym aus dem Stamm GJ31 handelt.

Wie KUNZE (2002) durch Polymorphismen-Untersuchungen zeigen konnte, besitzt *Pseudomonas putida* WR311 den Stamm GJ31 als genetischen Hintergrund und trägt zusätzlich das TOL-Plasmid aus *P. putida* PaW1. Dementsprechend sollten alle am *meta*-Weg beteiligten Proteine

auf genetischer Ebene dreifach vorhanden sein. Die Regulation der Genexpression in *P. putida* WR311 ist jedoch bisher nicht untersucht worden.

Durch die Ergebnisse der Enzymtests wird deutlich, dass der Gen-Cluster *xylXYZLTEGFJQKIH* des TOL-Plasmids exprimiert wird. Dieser Cluster beinhaltet die Gene aller am *meta*-Weg beteiligten Enzyme aus *Pseudomonas putida* PaW1. Die Ergebnisse der Bestimmung der Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivität in den Rohextrakten der drei Organismen sprechen weiterhin dafür, dass das *meta*-Operon *cbzE(2)FJ(2)QK* des Plasmids pKW1 aus *Pseudomonas putida* GJ31 ebenfalls exprimiert wird. Dieser Gen-Cluster enthält das Gen der Acetaldehyd-Dehydrogenase CbzQ. Es konnte nicht geklärt werden, ob XylQ inaktiv ist, oder neben CbzQ im Rohextrakt nicht nachgewiesen werden konnte.

Für die Expression des *nahINLOMKJX*-Gen-Clusters wurden keine eindeutigen Hinweise gefunden. Die NAD⁺-unabhängige Aktivität für 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (6) im Rohextrakt von *Pseudomonas putida* GJ31 deutet darauf hin, dass neben CbzF und XylF noch eine weitere 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase exprimiert wird.

4.4 Abschätzung des beim Abbau von 4-Chlorcatechol in *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 auftretenden Stoffflusses

Aufgrund der Ergebnisse der Enzymtests soll eine Abschätzung der beim Abbau von Catechol bzw. 4-Chlorcatechol in *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311 stattfindenden Stoffflüsse erfolgen. Neben der Aufdeckung von Engstellen in den Abbauwegen soll hierbei die Frage geklärt werden, welcher Zweig des *meta*-Weges (der hydrolytische oder der dehydrogenolytische) bevorzugt eingeschlagen wird.

Bei dieser Diskussion stellt sich für die Stämme *P. putida* GJ31 und PaW1 das Problem, dass die Zellkulturen, aus denen die Rohextrakte gewonnen wurden, nicht über 4-Chlorcatechol gewachsen sind. Der Stamm GJ31 wurde auf Chlorbenzol angezogen und metabolisiert dieses Substrat über die Zwischenstufe 3-Chlorcatechol (siehe Abb. 1.4). Die Anzucht einer Zellkultur auf 4-Chlorcatechol gestaltet sich schwierig: Gelöst im Flüssigmedium neigt es zur Autoxidation und wirkt in der notwendigen Konzentration toxisch auf die Zellen. MARS et al. (1997) konnten zeigen, dass *P. putida* GJ31 in der Lage ist, 4-Chlorcatechol zu verwerten, die Anzucht einer

Zellkultur auf diesem Substrat ist jedoch bisher nicht gelungen. Der Stamm PaW1 ist mit 3-Methylbenzoat als alleiniger Kohlenstoffquelle gewachsen.

Da die Stärke der Induktion von Enzymen von dem Wachstumssubstrat der Zellen abhängt, kann die Enzymaktivität für die Diskussion des Stoffflusses in *Pseudomonas putida* GJ31 und PaW1 nicht herangezogen werden. Die Abschätzung von Engstellen kann für diese beiden Stämme daher nur auf Grundlage der Substrataffinität $[S]_{1/2}$ erfolgen.

Eine zuverlässige Aussage über den Stofffluss innerhalb des Stoffwechsels ist auch für *Pseudomonas putida* WR311 nur schwer zu treffen, da die Konzentration der Metabolite in den Zellen nicht bekannt ist. Aus diesem Grund wurden für jedes Enzym die Umsatzgeschwindigkeit für drei verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Substrats aus dem Substratkonzentrations-Aktivitäts-Diagramm (siehe Abbildungen in Kapitel 8.1) bestimmt. Das hierbei durchgeführte Verfahren ist unter Material und Methoden beschrieben (2.8). Für die exemplarisch angenommenen Metabolitenkonzentrationen 10, 50 und 100 μM wurden die Enzymaktivitäten der am *meta*-Weg beteiligten Proteine berechnet, um beurteilen zu können, ob und wie sich der Stofffluss in Abhängigkeit von der Metabolitenkonzentration ändert. Höhere Metabolitenkonzentrationen wurden nicht angenommen, da einige Enzyme (2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase und -Dehydrogenase) im Enzymtest aufgrund ihrer Substratinhibierung bei diesen Konzentrationen keine oder nur noch geringe Aktivität zeigten.

4.4.1 Der Stofffluss beim Abbau von Catechol durch *Pseudomonas putida* GJ31 über den *meta*-Weg

Die dioxygenolytische Spaltung des aromatischen Systems leitet den Abbau von Catechol über den *meta*-Weg ein. Für die Substrataffinität der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase aus *Pseudomonas putida* GJ31 wurde ein Wert von 0,2 μM festgestellt. Dieses Enzym besitzt somit die höchste Substrataffinität der am Abbau von Catechol über den *meta*-Weg beteiligten Enzyme. Nach den in Tabelle 4.1 dargestellten Daten ist auf fast jeder Stufe eine Metabolitenakkumulation zu erwarten: Die Affinität jedes Enzyms zu seinem Substrat ist – abgesehen von der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase und der Acetaldehyd-Dehydrogenase – schlechter als die des Vorgängerenzym.

So kann von einer Akkumulation des ersten Metaboliten im Catecholabbau, dem 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (**1**) ausgegangen werden. Die beiden um dieses Substrat konkurrieren-

den Enzyme 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase und -Dehydrogenase unterscheiden sich deutlich in ihrer Substrataffinität (13,4 und 35,7 μM). Hier kann eine eindeutige Bevorzugung des hydrolytischen Zweiges des *meta*-Weges festgestellt werden.

Auch das Produkt der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase wird akkumuliert, da der Wert der Substrataffinität der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase um den Faktor 6,9 höher liegt als der des Vorgängerenzym.

Im dehydrogenolytischen Zweig wird die 2-Hydroxymuconsäure (**2**) akkumuliert, eine Anhäufung des Folgemetaboliten ist jedoch nicht zu erwarten. Die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase stellt auch für den über diesen Zweig verlaufenden Stofffluss eine Engstelle dar.

Die 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase besitzt für beide Enantiomere des 4-Hydroxy-2-oxovalerats (**5**) die schlechteste Substrataffinität aller bisher aufgetretenen Enzyme. Dieses Enzym stellt die größte Engstelle und somit auch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Abbau von Catechol über den *meta*-Weg in *Pseudomonas putida* GJ31 (Wachstumssubstrat: Chlorbenzol) dar. Das Folgeenzym Acetaldehyd-Dehydrogenase stellt also im Abbau von Catechol keine Engstelle dar.

Tab. 4.1: Substrataffinitäten der Enzyme des *meta*-Weges aus *Pseudomonas putida* GJ31 (Wachstumssubstrat Chlorbenzol) für die beim Abbau von Catechol auftretenden Metabolite.

<i>Pseudomonas putida</i> GJ31 (Wachstumssubstrat: Chlorbenzol)	[S] _{1/2} [μM]
Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase	0,2
2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase	13,4
2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase	35,7
4-Oxalocrotonat-Tautomerase	62,5
4-Oxalocrotonat-Decarboxylase	60
2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase	92,4
4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase	R: 800 S: 900
Acetaldehyd-Dehydrogenase	6,1

R - R-Stereoisomer. S - S-Stereoisomer.

4.4.2 Der Stofffluss beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31 über den *meta*-Weg

Die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase weist für die Substrataffinität gegenüber 4-Chlorcatechol einen Wert von 1,4 μM auf. Für die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase wurde $[S]_{1/2}$ auf 9,9 μM bestimmt. Es ist an dieser Stelle dennoch keine Akkumulation des 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyds (**6**) zu erwarten, da das Konkurrenz-Enzym der HMSH eine deutlich bessere Affinität zu dem Substrat aufweist als die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase (0,1 μM).

Hier zeigt sich ein Widerspruch zu MARS et al. (1997), die beim Wachstum von *Pseudomonas putida* GJ31 auf 4-Chlorcatechol eine Ausscheidung des stark gelb gefärbten Ringspaltungsprodukts ins Kulturmedium beobachteten. Diese Unstimmigkeit kann darauf zurückgeführt werden, dass beide Enzyme, die diesen Metaboliten weiter umsetzen, einer Substratinhibierung unterliegen. Dieser Effekt wird bei einer nur auf Substrataffinitäten beruhenden Diskussion jedoch nicht erfasst.

Der Stofffluss beim Abbau von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg verläuft bevorzugt über den dehydrogenolytischen Pfad. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Metaboliten-Charakterisierung (siehe 3.2.7): Durch Umsetzung einer Lösung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) durch Rohextrakt auf Chlorbenzol angezogener *P. putida* GJ31-Zellen, konnte kein Chlorvinylpyruvat isoliert werden. Statt dessen wurde der erste Metabolit des dehydrogenolytischen Zweiges, die 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) erhalten.

Tab. 4.2: Substrataffinitäten der Enzyme des *meta*-Weges aus *Pseudomonas putida* GJ31 (Wachstumssubstrat Chlorbenzol) für die beim Abbau von 4-Chlorcatechol auftretenden Metabolite.

<i>Pseudomonas putida</i> GJ31 (Wachstumssubstrat: Chlorbenzol)	$[S]_{1/2}$ [μM]
Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase	1,4
2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase	9,9
2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase	0,1
4-Oxalocrotonat-Tautomerase	36,8
4-Oxalocrotonat-Decarboxylase	285
2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase	c: 17,2 t: 22,2
Acetaldehyd-Dehydrogenase	16,4

c - *cis*-Isomer. t - *trans*-Isomer.

Aufgrund der Werte der Substrataffinitäten der Enzyme im dehydrogenolytischen Zweig werden beide hier auftretenden Metabolite akkumuliert. Die Werte für $[S]_{1/2}$ für die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase und die 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase sind jeweils deutlich größer als die des Vorgänger-Enzyms. Die Oxalocrotonat-Decarboxylase weist von allen Enzymen des *meta*-Weges die schlechteste Substrataffinität auf, so dass die von ihr katalysierte Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Dementsprechend tritt bei den weiteren Abbauschritten keine weitere Metabolitenakkumulation auf.

Die 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase kann aufgrund des fehlenden chlorierten Substrats in dieser Diskussion nicht berücksichtigt werden.

4.4.3 Vergleich des Stoffflusses beim Abbau von Catechol und 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg durch *Pseudomonas putida* GJ31

Der Vergleich der in den Tabellen 4.1 und 4.2 zusammengefassten Daten führt zu dem folgenden Ergebnis: Beim Abbau von Catechol erfolgt eine Akkumulation fast jedes auftretenden Metaboliten. So wird auch das Ringspaltungsprodukt des Catechols angehäuft, da die Substrataffinitäten der beiden Enzyme 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase und -Dehydrogenase schlechter sind als die der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase. Die Substrataffinitäten der HMSH und der HMSD unterscheiden sich jedoch deutlich, so dass von einer klaren Bevorzugung des hydrolytischen Zweiges ausgegangen werden kann. Mit der im gesamten *meta*-Weg schlechtesten Substrataffinität für beide möglichen Stereoisomere ihres Substrats stellt die 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar.

Nach der unter 4.4.2 nur auf Grundlage der Substrataffinität geführten Diskussion wird das Reaktionsprodukt der Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase beim Abbau von 4-Chlorcatechol nicht akkumuliert. Hier zeigt sich jedoch ein Widerspruch zu MARS et al. (1997), die beim Wachstum einer *Pseudomonas putida* GJ31-Zellkultur auf 4-Chlorcatechol die Ausscheidung des Metaboliten ins Medium beobachteten.

Aufgrund der $[S]_{1/2}$ -Werte der beiden Enzyme, die für die Umsetzung dieses Substrats verantwortlich sind, wird deutlich, dass für den Abbau der dehydrogenolytische Zweig des *meta*-Weges bevorzugt wird. Für beide auf diesem Pfad folgenden Metabolite, 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) und 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**), kann eine Akkumulation erwartet

werden. Die 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase stellt für den Abbau von 4-Chlorcatechol die größte Engstelle dar, so dass die folgenden Metabolite nicht akkumuliert werden.

Es kann zusammenfassend festgehalten werden, dass sowohl beim Abbau von Catechol als auch 4-Chlorcatechol durch eine auf Chlorbenzol angezogene *Pseudomonas putida* GJ31-Zellkultur das dioxygenolytische Ringspaltungsprodukt akkumuliert wird. Die unchlorierte Verbindung wird in der Folge über den hydrolytischen Zweig abgebaut, während das 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (6) bevorzugt über den dehydrogenolytischen Zweig metabolisiert wird.

4.4.4 Der Stofffluss beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* PaW1 über den *meta*-Weg

Die in diesem Abschnitt geführte Diskussion des Abbaus von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* PaW1 versucht zu erklären, warum dieser Stamm nicht in der Lage ist, dieses Substrat zu verwerten.

Das Ringspaltungsprodukt der Catechol-2,3-Dioxygenase wird akkumuliert, da das Folgeenzym, die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase eine weitaus schlechtere Substrataffinität aufweist. Die Substrataffinität deren Konkurrenzenzym konnte nicht bestimmt werden (siehe 3.3.3 und Abb. 8.8, siehe Anhang), weswegen die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase bei dieser Diskussion nicht berücksichtigt werden kann. Sie hat für den Stofffluss beim Abbau von 4-Chlorcatechol aber keine Bedeutung, da ihr Folgeenzym, die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase keine Aktivität für das Substrat 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (7) zeigt. Der dehydrogenolytische Pfad des *meta*-Weges ist aus diesem Grund versperrt.

Die Substrataffinität der im hydrolytischen Pfad folgenden 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase ist für beide möglichen Isomere des Chlorvinylpyruvats (9) etwas schlechter als die der HMSH. Da die 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase nicht vermessen wurde, kann über dessen Beitrag zum Stofffluss keine Aussage gemacht werden. Nach den hier aufgeführten Daten ist die Acetaldehyd-Dehydrogenase ein Grund dafür, dass *Pseudomonas putida* PaW1 4-Chlorcatechol nicht als Kohlenstoffquelle nutzen kann, da es für Chloracetaldehyd keine Aktivität zeigt. Vorausgesetzt, die 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase setzt (R/S)-5-Chlor-4-hydroxy-2-oxoalerat (10) um, so wird nur ein Teil des metabolisierten Ausgangssubstrats 4-Chlorcatechol in Form von Pyruvat in den Primärstoffwechsel überführt. Chloracetaldehyd wird akkumuliert

und somit eine vollständige Mineralisierung des Wachstumssubstrats verhindert. Zusätzlich besitzt diese Substanz mutagene Eigenschaften, so dass deren Akkumulation zu einem Absterben der Zellen führen kann.

Tab. 4.3: Substrataffinitäten der Enzyme des *meta*-Weges aus *Pseudomonas putida* PaW1 (Wachstumssubstrat 3-Methylbenzoat) für die beim Abbau von 4-Chlorcatechol auftretenden Metabolite.

<i>Pseudomonas putida</i> PaW1 (Wachstumssubstrat: 3-Methylbenzoat)	[S] _{1/2} [μM]
Catechol-2,3-Dioxygenase	0,8
2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase	11,6
2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase	k. U. ^a
4-Oxalocrotonat-Tautomerase	k. U.
4-Oxalocrotonat-Decarboxylase	0,4
2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase	c: 16,1 t: 16,6
Acetaldehyd-Dehydrogenase	k. U.

^aDie Aktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase konnte nicht eindeutig bestimmt werden (siehe 3.3.3). k. U. - Es konnte kein Umsatz festgestellt werden. c - *cis*-Isomer. t - *trans*-Isomer.

4.4.5 Der Stofffluss beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* WR311 über den *meta*-Weg

In dem Stamm *Pseudomonas putida* WR311 wird für die dioxygenolytische Ringspaltung des 4-Chlorcatechols bei den hier betrachteten Substratkonzentrationen in allen Fällen annähernd maximale Enzymaktivität erreicht. Nach der unter 4.3.1 geführten Diskussion ist es möglich, dass mehrere Isoenzyme mit Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivität im Rohextrakt aktiv sind. Da die folgenden Enzyme, 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase und -Dehydrogenase, weitaus niedrigere Umsatzgeschwindigkeiten und schlechtere Substrataffinitäten für ihr Substrat aufweisen, kommt es zu einer Akkumulation von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (6). Diese Anhäufung des intensiv gefärbten Metaboliten zeigt sich auch beim Wachstum einer *P. putida* WR311-Kultur in flüssigem Mineralmedium mit 4-Chlorbenzoat als alleiniger Kohlenstoffquelle (siehe 3.4). Der Organismus betreibt den Abbau dieses Wachstumssubstrats über die Stufe des 4-Chlorcatechols. Es kommt während der exponentiellen Wachstumsphase zu einer Gelbfärbung des Mediums. Bei einer Ausgangskonzentration von 10 mM an 4-Chlor-

benzoat wurde eine maximale Konzentration des Metaboliten von 44 μM gemessen. Diese geringe Konzentration an 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) ist im Medium optisch wahrnehmbar, da diese Substanz über einen sehr großen Extinktionskoeffizienten verfügt (siehe 2.7).

Tab. 4.4: Aktivitäten der Enzyme des *meta*-Weges aus *Pseudomonas putida* WR311 (Wachstumssubstrat 4-Chlorbenzoat) in Abhängigkeit von der Konzentration der beim Abbau von 4-Chlorcatechol auftretenden Metabolite.

Enzymaktivitäten [U/g]	Substratkonzentration [μM]		
	10	50	100
Catechol-2,3-Dioxygenase	1020	1040	1040 ^a
2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase	130	270	20 ^a
2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase	k. U. ^b	k. U. ^b	k. U. ^b
4-Oxalocrotonat-Tautomerase	k. U.	k. U.	k. U.
4-Oxalocrotonat-Decarboxylase	250 ^a	1130	1650
2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase	c: 730 t: 350	c: 90 t: 1200	c: 0 ^a t: 1200 ^a
Acetaldehyd-Dehydrogenase	$0,2 \cdot 10^{-3}$	$0,8 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$

^aDie Werte wurden durch Extrapolation ermittelt. ^bDie Aktivität der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase konnte nicht eindeutig bestimmt werden (siehe 3.3.3). k. U. - Es konnte kein Umsatz festgestellt werden. c - *cis*-Isomer. t - *trans*-Isomer.

Das Konkurrenz-Enzym der HMSH, die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase kann hier nicht beurteilt werden, da die Ergebnisse des Enzymtests nicht eindeutig waren (siehe 3.3.3). Für den Stofffluss durch den *meta*-Weg steht nur der hydrolytische Zweig zur Verfügung, da die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase nicht in der Lage ist, 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) umzusetzen.

Für die weitere Umsetzung ist von Bedeutung, welches Isomer des Chlorvinylpyruvats (**9**) durch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase gebildet wird: Die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase setzt das *cis*-Isomer nur bei niedrigen Substratkonzentrationen effektiv um. Bei einer Konzentration von mehr als 46 μM tritt eine sehr starke Substratinhibierung auf (siehe Abb. 8.19, siehe Anhang). Für das *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) wurde eine solche Inhibierung nicht

festgestellt. Diese Verbindung wird nicht akkumuliert, da die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms höher ist als die der HMSH.

Der Stofffluss auf der Stufe der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase kann nicht beurteilt werden, da das Substrat nicht zur Verfügung stand.

Die Acetaldehyd-Dehydrogenase stellt eine dramatische Engstelle im Abbau von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* WR311 dar. Die für die drei Metabolitenkonzentrationen ermittelten Enzymaktivitäten liegen mehr als den Faktor 10^3 unter denen der anderen Enzyme des *meta*-Weges. Es wurde eine maximale Aktivität von 1650 U/g festgestellt, allerdings wird sie erst bei einer Substratkonzentration von 60 mM erreicht (siehe 3.3.8). Die schlechte Substrataffinität des Enzyms verursacht wahrscheinlich eine Akkumulation des Chloracetaldehyds. Die geringe Umsatzgeschwindigkeit bei niedrigen Metabolitenkonzentrationen reicht jedoch aus, um Zellwachstum mit einer Verdopplungszeit von 14,8 Stunden (siehe 3.4) zu ermöglichen. Hierbei ist zu beachten, dass der Anstieg der Chloracetaldehyd-Konzentration zu einer Erhöhung der Enzymaktivität führt.

4.4.6 Vergleich des Stoffflusses beim Abbau von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg bei *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311

Nach den hier aufgeführten Daten, die durch Enzymtests in Rohextrakten der beiden Organismen *Pseudomonas putida* PaW1 und WR311 erhalten wurden, findet beim Abbau von 4-Chlorcatechol in beiden Stämmen zunächst eine Akkumulation des Metaboliten 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) statt. Die Bildung dieser Zwischenstufe durch Ringspaltung des 4-Chlorcatechols erfolgt schneller als der Abbau durch die beiden Enzyme 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase und -Dehydrogenase. Allein aufgrund der Substrataffinität kann eine solche Akkumulation für *P. putida* GJ31 nicht vermutet werden. Beobachtungen von MARS et al. (1997) bestätigen dieses Verhalten aber auch für diesen Stamm.

Die Mineralisierung von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* GJ31 läuft bevorzugt über den dehydrogenolytischen Zweig des *meta*-Weges: Von den beiden um das Substrat konkurrierenden Enzymen 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase und -Dehydrogenase hat letztere die höhere Affinität zum 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**). Das Folgeenzym der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase, die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase, stellt unter Umständen eine weitere Engstelle im Stofffluss dar.

Die 4-Oxalocrotonat-Tautomerasen der Stämme *Pseudomonas putida* PaW1 und WR311 sind dafür verantwortlich, dass der dehydrogenolytische Zweig für den Abbau von 4-Chlorcatechol von diesen Organismen nicht benutzt werden kann. Da die induzierten Enzyme beider Stämme nicht in der Lage sind, 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) umzusetzen, muss der Stofffluss über den hydrolytischen Pfad erfolgen.

Für *P. putida* PaW1 und WR311 ist die Isomerie des HMSH-Produkts von entscheidender Bedeutung, da die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratasen beider Organismen durch höhere Konzentrationen an *cis*-Chlorvinylpyruvat (**9**) schnell vollständig inhibiert werden (siehe 3.3.6). Die 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase aus *Pseudomonas putida* GJ31 unterscheidet nicht zwischen den isomeren Substraten.

Den entscheidenden Unterschied zeigten die drei untersuchten Organismen auf der Stufe der Acetaldehyd-Dehydrogenasen: *Pseudomonas putida* PaW1 ist der einzige Stamm, dessen Enzym eine Coenzym A-Abhängigkeit aufweist wie in der Literatur beschrieben (AEMPRAPA & WILLIAMS, 1998; EATON, 1996; GÖBEL, 2003; KUNZE, 2002; POWLOWSKI et al., 1993). Im Rohextrakt konnte keine Aktivität gegenüber Chloracetaldehyd festgestellt werden. Die Enzyme der beiden anderen Stämme, *Pseudomonas putida* GJ31 und WR311, zeigen keine CoA-Abhängigkeit, sind aber in der Lage, Chloracetaldehyd umzusetzen. Als Produkt dieser unter NAD⁺-Verbrauch ablaufenden Reaktion kann dementsprechend Chloressigsäure erwartet werden. Eine solche Reaktion ist aus Halogenaliphaten-verwertenden Pseudomonaden bekannt (VAN DER PLOEG et al., 1996), wurde bisher aber nicht mit dem Abbau halogenaromatischer Substanzen in Verbindung gebracht.

Die Stämme *Pseudomonas putida* GJ31 und WR311 einerseits und *Pseudomonas putida* PaW1 andererseits verfügen also offenbar über unterschiedliche Acetaldehyd-Dehydrogenasen, deren Eigenschaften für die Fähigkeit, 4-Chlorcatechol zu verwerten und zu mineralisieren, ausschlaggebend sind.

4.5 Fazit und Ausblick

Im Rohextrakt von *Pseudomonas putida* GJ31 (Wachstumssubstrat Chlorbenzol) konnte eine NAD⁺-unabhängige Enzymaktivität für das Substrat 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) festgestellt werden. Ein Vergleich mit Daten von KUNZE (2002) führt zu dem Schluss, dass in dem Organismus neben der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase CbzF und der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase CbzG ein weiteres Enzym exprimiert wird, welches dieses Substrat umzusetzen in der Lage ist. Möglicherweise handelt es sich hierbei um die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase NahN, deren kodierendes Gen von ZERLIN (mündl. Mitteilung) auf dem Plasmid pKW1 lokalisiert wurde. Über das Substratspektrum dieses Enzyms gibt es bisher keine Erkenntnisse. Eine Klonierung des Gens würde die enzymatische Untersuchung sowie die Charakterisierung des Reaktionsprodukts erleichtern, da störende Nebenreaktionen im Rohextrakt eines Expressionsstammes ausgeschlossen wären.

Vorausgesetzt, NahN ist in der Lage, 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) umzusetzen, so ist in *Pseudomonas putida* GJ31 nach Wachstum auf Chlorbenzol sowohl der hydrolytische wie auch der dehydrogenolytische Abbauweg aktiv. Die NAD⁺-unabhängige Aktivität ist für das chlorierte Substrat geringer und unterliegt ebenfalls einer Substratinhibierung. Da es beim Abbau von 4-Chlorcatechol zu einer Akkumulation des Metaboliten 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) kommt, verliert der hydrolytische Pfad für den Stofffluss weiter an Bedeutung; der Abbau von 4-Chlorcatechol erfolgt also hauptsächlich über den dehydrogenolytischen Zweig des *meta*-Weges.

In den beiden Stämmen *Pseudomonas putida* PaW1 und WR311 erfolgt der Abbau von 4-Chlorcatechol ausschließlich über den hydrolytischen Weg: In den Rohextrakten beider Organismen konnte keine 4-Oxalocrotonat-Tautomerase-Aktivität für 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) festgestellt werden.

Es konnte nicht geklärt werden, inwieweit die von der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase katalysierte H₂O-Addition an die Doppelbindung des Chlorvinylpyruvats stereospezifisch verläuft. Schließlich scheint das Nachfolgeenzym entgegen Literaturhinweisen keine Stereoselektivität zu besitzen. Da die Synthese des 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxoalerats (**10**) nicht gelang und somit kein Substrat zur Verfügung stand, fehlen für dieses Substrat noch die enzymkinetischen Werte der 4-Hydroxy-2-oxoalerat-Aldolase aller untersuchten Organismen.

Letztendlich konnte auch keine Antwort auf die Frage des Verbleibs bzw. der Eliminierung des Chlorsubstituenten gefunden werden. Klärungsbedarf besteht in diesem Zusammenhang noch

bezüglich der Acetaldehyd-Dehydrogenase. Für die Umsetzung des (Chlor-)Acetaldehyds konnten in den untersuchten *Pseudomonas*-Stämmen unterschiedliche Enzyme nachgewiesen werden, deren Eigenschaften und Substratspezifität für die Mineralisierung von 4-Chlorcatechol ausschlaggebend sind. Sowohl für *Pseudomonas putida* GJ31 als auch für WR311 konnte entgegen der in der Literatur bezüglich aromatischer Verbindungen abbauenden *P. putida*-Stämmen vorherrschenden Meinung keine Coenzym A-Abhängigkeit des Enzyms festgestellt werden (AEMPRAPA & WILLIAMS, 1998; EATON, 1996; GÖBEL, 2003; KUNZE, 2002; POWLOWSKI et al., 1993). Es erfolgt also nicht die Bildung von Chloracetyl-CoA, welches dann dem weiteren Stoffwechsel zur Verfügung steht. Die Aktivität einer CoA-unabhängigen Dehydrogenase lässt vielmehr auf die Bildung von Chloressigsäure schließen.

Da das Einfließen von Chloressigsäure in den Tricarbonsäurezyklus diesen laut KAWASAKI et al. (1981) und FOCHT (1996) durch Inhibierung der *cis*-Aconitase unterbrechen würde, muss die Eliminierung des Halogens auf dieser Stufe erfolgen. Hierfür kommen zwei von anderen Autoren beschriebene Dehalogenasen in Frage, deren Vorkommen in den beiden *P. putida*-Stämmen GJ31 und WR311 noch nicht nachgewiesen wurde. Die 2-Halocarbonsäure-Dehalogenase und die Haloacetat-Dehalogenase katalysieren die zur Hydroxycarbonsäure führende Substitution des Halogensubstituenten der Carbonsäure durch H₂O (Abb. 4.3). Diese Reaktion ist aus vielen halogenaliphatischen Verbindungen verwertenden Bakterienstämmen bekannt, darunter auch einige *Pseudomonas putida* (FETZNER & LINGENS, 1994; JANSSEN et al., 1994; COPLEY, 1998; JANSSEN et al., 2001).

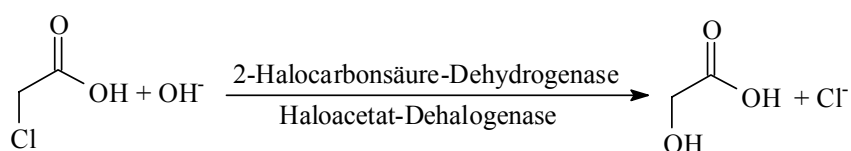


Abb. 4.3: Durch die Enzyme 2-Halocarbonsäure-Dehydrogenase bzw. Haloacetat-Dehalogenase katalysierte Reaktion von Chloressigsäure zu Glykolsäure.

Es fällt die schlechte Substrataffinität der Acetaldehyd-Dehydrogenase aus *P. putida* WR311 für Chloracetaldehyd auf. Dennoch ist der Organismus in der Lage, 4-Chlorbenzoat über die Zwischenstufe 4-Chlorcatechol abzubauen und als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Dieses Enzym ist also für den Abbau von 4-Chlorcatechol geschwindigkeitsbestimmend und somit für die geringe Wachstumsgeschwindigkeit vom *Pseudomonas putida* WR311 auf 4-Chlorbenzoat verantwortlich.

Mit dieser Arbeit gelang erstmals eine Abschätzung von Engstellen beim Abbau von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg durch die Organismen *Pseudomonas putida* GJ31 und WR311. Für *P. putida* GJ31 beruhen diese Ergebnisse nur auf den Substrataffinitäten der beteiligten Enzyme, wurden aber teilweise durch Resultate der Metaboliten-Isolierung gestützt. Alle hier diskutierten Ergebnisse wurden durch *in vitro*-Messungen erhalten. Einen Blick auf die wirklich während der exponentiellen Wachstumsphase einer Zellkultur auftretenden Stoffflüsse können nur andere Messverfahren liefern, die es ermöglichen, von außen Metabolitenkonzentrationen in den Zellen zu bestimmen und deren Änderung zu verfolgen. Da solche Untersuchungen zum Beispiel durch kernresonanzspektroskopische Messverfahren möglich sind, wurde durch die Charakterisierung der Metabolite per NMR-Spektroskopie eine Grundlage für weitere Experimente geschaffen.

So wäre es denkbar, eine *Pseudomonas putida* WR311-Kultur mit ^{13}C -markiertem 4-Chlorbenzoat als alleiniger Kohlenstoffquelle anzuziehen, und über die Resonanzsignale der Metaboliten deren Auftreten zu verfolgen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung des Abbaus von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg.

Durch Vergleich der analytischen Daten chemisch synthetisierter Metabolite mit denen von isolierten Intermediaten wurde deren Identität überprüft. Die Metabolite wurden benutzt, um die Substrataffinitäten und Aktivitäten der am Abbauweg beteiligten Enzyme dreier *Pseudomonas putida*-Stämme zu bestimmen.

1. Postulierte Metabolite des Catechol- bzw. 4-Chlorcatechol-Abbaus oder deren Derivate wurden durch chemische Synthese dargestellt. Erwies sich die synthetische Darstellung als nicht möglich, wurden Metabolite durch schrittweise Umsetzung mit Enzymen im Rohextrakt oder mittels klonierter Enzyme (CbzE und CbzG aus *Pseudomonas putida* GJ31) hergestellt.

- 2-Hydroxymuconsäure (**2**), 4-Oxalocrotonat (**3**), Vinylpyruvat (**4**) sowie 4- und 5-Chlorpicolinsäure (**19**, **21**) wurden nach Vorschriften anderer Autoren synthetisiert. Ebenfalls bereits beschrieben waren die Synthesen von Acetaldehydphenylhydrazon (**39**) und Pyruvat-Phenylhydrazon (**40**).
- (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxoalerat (**5**) sowie *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) konnten stereoisomerenrein dargestellt werden. Die Synthese von (S)- und (R)-5-Chlor-4-hydroxy-2-oxoalerat (**10**) scheiterte im letzten Schritt, der enzymatischen Umsetzung von 2-Amino-5-chlor-4-hydroxypentansäure (**33**) durch Aminosäureoxidase.
- Das Ringspaltungsprodukt 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) konnte durch Umsetzung von 4-Chlorcatechol mit *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt oder dem Rohextrakt eines CbzE-Expressionsstammes in Lösung angereichert werden. Die Umsetzung einer 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd-Lösung mit dem Rohextrakt eines CbzG-Expressionsstammes lieferte 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**).
- 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**) bzw. 2-Chlor-4-oxalocrotonat (**8b**) konnte nicht durch chemische Synthese dargestellt werden. Die Darstellung einer wässrigen Gleichgewichtslösung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) und 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**) gelang durch protonenkatalysierte Tautomerie von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**).

2. Die beim Abbau von 4-Chlorcatechol über den *meta*-Weg auftretenden Metabolite wurden isoliert und charakterisiert. Hierzu wurde 4-Chlorcatechol oder ein bereits identifiziertes Intermediat mit Rohextrakt einer *Pseudomonas putida* GJ31-Zellkultur umgesetzt. In dem Rohextrakt wurde das dem zu untersuchenden Reaktionsschritt folgende Enzym inhibiert, um den jeweiligen Metabolit anzureichern.
 - Durch Derivatisierung zu 5-Chlorpicolinsäure (**21**) wurde 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) als alleiniges Produkt der dioxygenolytischen Spaltung von 4-Chlorcatechol durch die Chlorcatechol-2,3-Dioxygenase nachgewiesen. Der Angriff des Enzyms auf das 4-Chlorcatechol erfolgte also ausschließlich in proximaler Position.
 - 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) konnte als Produkt der Umsetzung von 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) durch die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase in Lösung isoliert werden.
 - *cis*-Chlorvinylpyruvat (**9**) wurde als alleiniges Produkt der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase nachgewiesen. Hieraus folgt, dass 5-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure (**8a**) als Metabolit im dehydrogenolytischen Zweig auftritt.
 - Durch Umsetzung von *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (**9**) mit *Pseudomonas putida* GJ31-Rohextrakt konnten 5-Chlor-4-hydroxy-2-oxoalerat (**10**) und Pyruvat in Form ihrer Phenylhydrazon-Derivate nachgewiesen werden.

3. Die einzelnen Schritte des *meta*-Weges in *Pseudomonas putida* GJ31 und PaW1 wurden bezüglich der Substrataffinität und maximalen Enzymaktivität untersucht und so auf mögliche Engpässe analysiert. Zur Gewinnung von Rohextrakten wurde *P. putida* GJ31 auf Chlorbenzol und *P. putida* PaW1 auf 3-Methylbenzoat als alleiniger Kohlenstoffquelle angezogen.
 - Alle im Rohextrakt untersuchten Enzyme aus *Pseudomonas putida* GJ31 sind in der Lage, die Metabolite des 4-Chlorcatechol-Abbaus umzusetzen.
 - Die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase aus *Pseudomonas putida* GJ31 zeigte eine geringere Substrataffinität für 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) als die 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Dehydrogenase. Es muss daher eine Bevorzugung des dehydrogenolytischen Zweiges des *meta*-Weges angenommen werden.

- Im Rohextrakt von *Pseudomonas putida* PaW1 konnte keine 4-Oxalocrotonat-Tautomerase-Aktivität für 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) festgestellt werden. Der Abbau von 4-Chlorcatechol würde also ausschließlich über den hydrolytischen Zweig erfolgen.
 - Die 4-Oxalocrotonat-Tautomerase und die Acetaldehyd-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* PaW1 sind nicht in der Lage, die chlorierten Substrate umzusetzen. Alle weiteren untersuchten Enzyme des *meta*-Weges zeigten Aktivität für die Intermediate des 4-Chlorcatechol-Abbaus.
4. Der beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* WR311 auftretende Stofffluss wurde untersucht. Dieser Stamm verfügt über die für den *meta*-Weg kodierenden Gene aus *P. putida* GJ31 und PaW1. Er baut 4-Chlorbenzoat über die Zwischenstufe 4-Chlorcatechol ab.
- Beim Abbau von 4-Chlorcatechol durch *Pseudomonas putida* WR311 trat eine Akkumulation des Ringspaltungsprodukts 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (**6**) auf.
 - Es wurde eine 4-Oxalocrotonat-Tautomerase nachgewiesen, die keine Aktivität für 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (**7**) besitzt. Es muss daher angenommen werden, dass beim Wachstum von *Pseudomonas putida* WR311 auf 4-Chlorbenzoat das Enzym aus *P. putida* PaW1 induziert wird. Für den Metabolismus von 4-Chlorcatechol steht daher nur der hydrolytische Zweig des *meta*-Weges zur Verfügung.
 - Zusammengefasst wird deutlich, dass in *Pseudomonas putida* WR311 nach Wachstum auf 4-Chlorbenzoat der Gen-Cluster *xyWXYZLTEGFJQKIH* des TOL-Plasmids aus *P. putida* PaW1 sowie das *meta*-Operon *cbzE(2)FJ(2)QK* des Plasmids pKW1 aus *P. putida* GJ31 exprimiert sind.
5. Die Acetaldehyd-Dehydrogenase konnte als Schlüsselenzym für den 4-Chlorcatecholabbau über den *meta*-Weg identifiziert werden. In den Rohextrakten von *Pseudomonas putida* GJ31 und WR311 findet ein Umsatz von Chloracetaldehyd und Acetaldehyd durch ein Coenzym A-unabhängiges Enzym statt. Beide Stämme können 4-Chlorcatechol metabolisieren. *Pseudomonas putida* PaW1 besitzt eine Coenzym A-abhängige Acetaldehyd Dehydrogenase, die keine Aktivität für Chloracetaldehyd zeigt. Dieser Stamm ist daher nicht in der Lage, 4-Chlorcatechol zu mineralisieren.

6. Literaturverzeichnis

- Abril, M.-A., Michan, C., Timmis, K. N. & Ramos, J. L. (1989):
Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway.
J. Bacteriol. **171**, 6782 - 3790
- Aemprapa, S. A. & Williams, P. A. (1998):
Implications of the *xylQ* gene of TOL plasmid pWW102 for the evolution of aromatic catabolic pathways.
Microbiol. **144**, 1387 - 1396
- Albertson, N. F. (1946):
The synthesis of amino acids from ethyl acetamidomalonate and ethyl acetamidocyanoacetate. III. The use of primary halides.
J. Am. Chem. Soc. **68**, 450 - 453
- Albertson, N. F. (1951):
Asymmetric enzymatic synthesis of amino acid anilides.
J. Am. Chem. Soc. **73**, 452 - 454
- Ajithkumar, P. V. & Kunhi, A. A. (2000):
Pathways for 3-chloro- and 4-chlorobenzoate degradation in *Pseudomonas aeruginosa* 3mT.
Biodegradation. **11**, 247-61
- Arensdorf, J. J. & Focht, D. D. (1995):
A *meta* cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166.
Appl. Environ. Microbiol. **61**, 443 - 447
- Barchiesi, E., Bradamante, S., Carfagna, C. & Ferraccioli, R. (1988):
Transmission of substituent effects through the methyleneamino group N=CH: aldehyde phenylhydrazones and conjugate anions.
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1565 - 1572
- Bartels, I., Knackmuss, H.-J. & Reineke, W. (1984):
Suicide inactivation of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols.
Appl. Environ. Microbiol. **47**, 500-505
- Bayly, R. C. & Barbour, M. G. (1984):
The degradation of aromatic compounds by the *meta* and gentisate pathways.
In Microbial degradation of organic compounds, D. T. Gibson (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York. 253-294

- Bellamy, A. J. & Guthrie, R. D. (1965):
The possible interconversion of phenylhydrazones and phenylazoalkanes. II.
J. Chem. Soc., 3528 - 3533
- Bergmeyer, H. U., Ed. (1978):
Principles of enzymatic analysis.
Verlag Chemie, Weinheim
- Bradford, M. M. (1976):
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein
utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. **72**, 248 - 254
- Burlingame, R. & Chapman, P. J. (1983):
Stereospecificity in *meta*-fission catabolic pathways.
J. Bacteriol. **155**, 424 - 426
- Chapman, P. J. & Ribbons, D. W. (1976):
Metabolism of resorcinolic compounds by bacteria: orcinol pathway in *Pseudomonas
putida*.
J. Bac. **125**, 975 - 984
- Collinsworth, W. L., Chapman, P. J. & Dagley, S. (1973):
Stereospecific enzymes in the degradation of aromatic compounds by *Pseudomonas
putida*.
J. Bacteriol. **113**, 922 - 931
- Copley, S. D. (1998):
Microbial dehalogenases: enzymes recruited to convert xenobiotic substrates.
Curr. Opin. Chem. Biol. **2**, 613 - 617
- Cornish-Bowden, A. (1984):
Enzyme specificity: its meaning in the general case.
J. Theor. Biol. **108**, 451 - 457
- Dagley, S. & Gibson, D. T. (1964):
The bacterial degradation of catechol.
Biochem. J. **95**, 466 - 477
- Dagley, S. & Gibson, D. T. (1965):
The bacterial degradation of catechol.
Biochem. J. **95**, 466 - 477
- Davey, J. F. & Ribbons, D. W. (1975):
Metabolism of resorcinolic compounds by bacteria: purification and properties of
acetylpyruvate hydrolase from *Pseudomonas putida* O1.
J. Biol. Chem. **250**, 3826 - 3830
- Dorn, E., Hellwig, M., Reineke, W. & Knackmuss, H.-J. (1974):
Isolation and characterization of a 3-chlorobenzoate degrading pseudomonad.
Arch. Microbiol. **99**, 61 - 71

- Drefahl, G. & Hörlund, H.-H. (1964):
Synthese von α -Amino- γ -hydroxysäuren über Isoxazolin-carbonsäuren-(3).
Chem. Ber. **97**, 159 - 164
- Duffin, G. F. & Kendall, J. D. (1955):
The reaction of diazonium salts with α -aceto- γ -lactones.
J. Chem. Soc. **107**, 3470 - 3474
- Duggleby, C. J. (1979):
Studies on some enzymes involved in the *meta* cleavage of catechol.
Dissertation. University College of North Wales, Bangor
- Dyker, G. & Thöne, A. (2000):
Reactions of glycidyl derivatives with ambident nucleophiles. Part 1: ethyl acetoacetate.
Tetrahedron **56**, 8669 - 8672
- Eaton, R. W. (1996):
p-Cumate catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: cloning and characterization of DNA carrying the *cmt* operon.
J. Bacteriol. **178**, 1351 - 1362
- Eichacker, S. & Koller, U. (1996):
Muttermilch - Säuglingsnahrung Nummer Eins oder Fremdstoffcocktail.
GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg
- Eltis, L. D. & Bolin, J. T. (1996):
Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases.
J. Bacteriol. **178**, 5930-5937
- Feist, C. F. & Hegemann, G. D. (1969):
Regulation of the *meta*-cleavage pathway for benzoate oxidation by *Pseudomonas putida*.
J. Bacteriol. **100**, 1121 - 1123
- Feofilaktow, W. W. & Onischtschenko, A. S. (1939):
Über die Einwirkung von Phenyl diazoniumchlorid auf α -substituierte Butyrolactone.
(Russ.).
Zh. Obshch. Khim. (J. Chim. Gen.) **9**, 314 - 24; *Chem. Zentralbl.* 110 (II) (1939) 3080
- Fetzner, S. & Lingens, F. (1994):
Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnical applications.
Microbiol. Rev. **58**, 641 - 685
- Focht, D. D. (1996):
Biodegradation of chlorobenzoates.
In *Molecular biology of pseudomonads*, T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas & S. Silver (Ed.), ASM Press, Washington, D. C.: 71 - 80
- Gabbai, A. & Posternak, T. (1971):
Elimination reactions of polyhydroxy adipic acid.
Helv. Chim. Acta **54**, 1531 - 1543

- Gilheany, D. G., Walsh, J. G., Furlong, P. J. & Byrne, L. A. (1999):
Studies in the oxidative ring-opening of catechols and *o*-benzoquinones. Lead tetraacetate versus the copper(I) chloride/pyridine/methanol system.
Tetrahedron **55**, 11519 - 11536
- Göbel, M. (2003):
Mikrobieller Abbau von Chloraromaten: Gene des *ortho*- und *meta*-Weges.
Dissertation. Bergische Universität Wuppertal
- Graf, R. (1932):
4,6-Dichloro- and 4,5,6-trichloropicolinic acid.
J. Prakt. Chem., 36 - 49
- Greated, A., Lambertsen, L., Williams, P. A. & Thomas, C. M. (2002):
Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*.
Environ. Microbiol. **4**, 856 - 871
- Hanes, C. S. (1932):
The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley.
Biochem. J. **26**, 1406 - 1421
- Harayama, S., Lehrbach, P. L. & Timmis, K. N. (1984):
Transposon mutagenesis analysis of *meta*-cleavage pathway operon genes of the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2.
J. Bacteriol. **160**, 251 - 255
- Harayama, S., Mermod, N., Rekik, M., Lehrbach, P. R. & Timmis, K. N. (1987):
Roles of the divergent branches of the *meta*-cleavage pathway in the degradation of benzoate and substituted benzoates.
J. Bacteriol. **169**, 558 - 564
- Harayama, S. & Rekik, M. (1990):
The *meta* cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes.
Mol. Gen. Genet. **221**, 113 - 120
- Harayama, S., Rekik, M., Wubbolts, M., Rose, K., Leppik, R. A. & Timmis, K. N. (1989):
Characterization of five genes in the upper-pathway operon of TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida* and identification of the gene products.
J. Bacteriol. **171**, 5048 - 5055
- Hartmann, J., Reineke, W. & Knackmuss, H. J. (1979):
Metabolism of 3-chloro-, 4-chloro- and 3,5-dichlorobenzoate by a pseudomonad.
Appl. Environ. Microbiol. **37**, 421 - 428
- Harwood, C. S. & Parales, R. E. (1996):
The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity.
Ann. Rev. Microbiol. **50**, 553 - 590
- Hollender, J., Dott, W. & Hopp, J. (1994):
Regulation of chloro- and methylphenol degradation in *Comamonas testosteroni* JH5.
Appl. Environ. Microbiol. **60**, 2330 - 2338

- Horvath, R. S. (1970):
Co-metabolism of methyl- and chloro-substituted catechols by an *Achromobacter* sp. possessing a new *meta*-cleaving oxygenase.
Biochem. J. **119**, 871-876
- Janssen, D. B., Oppentocht, J. E. & Poelards, G. J. (2001):
Microbial dehalogenation.
Curr. Opin. Biotechnol. **12**, 254 - 258
- Janssen, D. B., Pries, F. & van der Ploeg, J. R. (1994):
Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes.
Ann. Rev. Microbiol. **48**, 163 - 191
- Kampouris, E. M. (1965):
The partial hydrolysis of benzenesulphonic esters of polyhydric phenols.
J. Chem. Soc., 2651
- Kaschabek, S. R. (1995):
Chemische Synthese von Metaboliten des mikrobiellen Chloraromatenabbaus und Untersuchung der Substratspezifität der Maleylacetat-Reduktase aus *Pseudomonas* sp. Stamm B13.
Dissertation. Bergische Universität Wuppertal
- Kaschabek, S. R., Kasberg, T., Müller, D., Mars, A. E., Janssen, D. B. & Reineke, W. (1998):
Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31.
J. Bacteriol. **180**, 296 - 302
- Kawasaki, H., Tone, N. & Tonomura, K. (1981):
Plasmid-determined dehalogenation of haloacetates in *Moraxella* species.
Agric. Biol. Chem. **45**, 29 - 34
- Klecka, G. M. & Gibson, D. T. (1981):
Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol.
Appl. Environ. Microbiol. **41**, 1159-1165
- Knackmuss, H.-J. (1981):
Degradation of halogenated and sulfonated hydrocarbons.
In Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds,
T. Leisinger, A. M. Cook, R. Hütter & J. Nüesch (Ed.), Academic Press, London.
189-212
- Kunze, M. (2002):
Abbau von Chlorbenzol in *Pseudomonas putida* GJ31: das Plasmid pKW1.
Dissertation. Bergische Universität Wuppertal
- Lantos, I. & Loev, B. (1975):
The total synthesis of (±)-decinine.
Tetrahedron Lett., 2011 - 2012

- Lian, H. & Whitman, C. P. (1993):
Ketonization of 2-hydroxy-2,4-pentadienoate by 4-oxalocrotonate tautomerase:
implications for the stereochemical course and the mechanism.
J. Am. Chem. Soc. **115**, 7978 - 7984
- Lian, H. & Whitman, C. P. (1994):
Stereochemical and isotopic labeling studies of 4-oxalocrotonate decarboxylase and
vinylpyruvate hydratase: analysis and mechanistic implications.
J. Am. Chem. Soc. **116**, 10403 - 10411
- Major, R. T. & Boese, A. B. (1934):
An investigation of certain derivatives of alkyl γ -oxalocrotonates.
J. Am. Chem. Soc. **56**, 949 - 952
- Marcotte, P. & Walsh, C. (1978):
Sequence of reactions which follows enzymatic oxidation of allylglycine.
Biochemistry **17**, 5620 - 5626
- Mars, A. E., Kasberg, T., Kaschabek, S. R., van Agteren, M. H., Janssen, D. B. & Reineke, W.
(1997):
Microbial degradation of chloroaromatics: use of the *meta*-cleavage pathway for
mineralization of chlorobenzene.
J. Bacteriol. **179**, 4530 - 4537
- Mars, A. E., Kingma, J., Kaschabek, S. R., Reineke, W. & Janssen, D. B. (1999):
Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenases and sequence
analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31.
J. Bacteriol. **181**, 1309 - 1318
- Matthews, C., Rossiter, J. T. & Ribbons, D. W. (1995):
Production of pyridine synthons by biotransformations of benzene precursors and their
cyclization with nitrogen nucleophiles.
Biocatal. Biotransform. **12**, 241 - 254
- Matzinger, P., Catalfomo, Ph. & Eugster, C. H. (1972):
Isolierung von (2*S*, 4*S*)-(+)- γ -Hydroxynorvalin und (2*S*, 4*R*)-(-)- γ -Hydroxynorvalin aus
Boletus satanas Lenz.
Helv. Chim. Acta **55**, 1478 - 1489
- McKague, A. B. (1999):
Synthesis of muconic acids by peracetic acid oxidation of catechols.
Synth. Commun. **29**, 1463 - 1475
- Miller, J. H. (1972):
Experiments in molecular genetics.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 433
- Mori, K. & Ikunaka, M. (1984):
Synthesis of all of the four energetically possible stereoisomers of 7-ethyl-2-methyl-1,6-
dioxaspiro[4.5]decane.
Tetrahedron **40**, 3471 - 3479

- Morris, C. M. & Barnsley, E. A. (1982):
The cometabolism of 1- and 2-chloronaphthalene by pseudomonads.
Can. J. Microbiol. **28**, 73 - 79
- Mosher, H. S. & Look, M. (1955):
Heterocyclic basic compounds. XVI. 4-Chloropicolinic acid and some of its derivatives.
J. Org. Chem. **20**, 283 - 285
- Murray, K., Duggleby, C. J., Sala-Trepat, M. & Williams, P. A. (1972):
The metabolism of benzoate and methylbenzoates via the *meta*-cleavage pathway by
Pseudomonas arvilla mt-2.
Eur. J. Biochem. **28**, 301 - 310
- Nakazawa, T. (2002):
Travels of a Pseudomonas, from Japan around the world.
Environ. Microbiol. **4**, 782
- NC-IUB (1982):
Symbolism and terminology in enzyme kinetics.
Eur. J. Biochem. **128**, 281 - 291
- Nishizuka, Y., Ichiyama, A., Nakamura, S. & Hayaishi, O. (1962):
A new metabolic pathway of catechol.
J. Biol. Chem. **237**, 269 - 270
- Nozaki, M., Kagamiyama, H. & Hayaishi, O. (1963a):
Crystallization and some properties of metapyrocatechase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **11**, 65 - 70
- Nozaki, M., Kagamiyama, H. & Hayaishi, O. (1963b):
Metapyrocatechase. I. Purification, crystallization and some properties.
Biochem. Z. **338**, 582 - 590
- Nozaki, M., Kotani, S., Ono, K. & Senoh, S. (1970):
Metapyrocatechase. III. Substrate specificity and mode of ring fission.
Biochim. Biophys. Acta **220**, 213 - 223
- Oldenhuis, R., Kuijk, L., Lammers, A., Janssen, D. B. & Witholt, B. (1989):
Degradation of chlorinated and non-chlorinated aromatic solvents in soil suspensions by
pure bacterial cultures.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **30**, 211 - 217
- Pandell, A. J. (1983):
Mechanism of the Fe(III)-catalyzed peracetic acid oxidation of catechol. A biomimetic
reaction for pyrocatechase.
J. Org. Chem. **48**, 3908 - 3912
- Panetta, C. A. & Miller, A. L. (1978):
Examples of amino acid transaminations with *o*-formylbenzoic acid.
J. Org. Chem. **43**, 2113

- Pettigrew, C. A., Haigler, B. E. & Spain, J. C. (1991):
Simultaneous biodegradation of chlorobenzene and toluene by a *Pseudomonas* strain.
Appl. Environ. Microbiol. **57**, 157-162
- Pfennig, N. & Lippert, K. D. (1966):
Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien.
Arch. Mikrobiol. **55**, 245 - 256
- Pieken, W. A. & Kozarich, J. W. (1989):
Selective synthesis and hydrolysis of dimethyl *cis,cis*-3-halomuconates.
J. Org. Chem. **54**, 510 - 512
- Pokorny, D., Brecker, L., Pogorevc, M., Steiner, W., Griengl, H., Kappe, T. & Ribbons, D. W.:
Proton-nuclear magnetic resonance analyses of the substrate specificity of a β -ketolase
from *Pseudomonas putida*, acetopyruvate hydrolase.
J. Bac. **181**, 5051 - 5059
- Pollard, J. R. & Bugg, D. H. (1998):
Purification, characterisation and reaction mechanism of monofunctional 2-hydroxy-
pentadienoic acid hydratase from *Escherichia coli*.
Eur. J. Biochem. **251**, 98 - 106
- Pollard, J. R., Rialland, D. & Bugg, T. D. H. (1998):
Substrate selectivity and biochemical properties of 4-hydroxy-2-keto-pentanoic acid
aldolase from *Escherichia coli*.
Appl. Environ. Microbiol. **64**, 4093 - 4094
- Powlowski, J., Sahlman, L. & Shingler, V. (1993):
Purification and properties of the physically associated *meta*-cleavage pathway enzymes
4-hydroxy-2-oxovalerate aldolase and aldehyde dehydrogenase (acylating) from
Pseudomonas sp. strain CF600.
J. Bacteriol. **175**, 377 - 385
- Prager, B. (1905):
Über Azoderivate des Oxalcrotonsäureesters.
Liebigs Ann. Chem. **338**, 360 - 392
- Ramos, J. L., Mermod, N. & Timmis, K. N. (1987):
Regulatory circuits controlling transcription of TOL plasmid operon encoding *meta*-
cleavage.
Mol. Microbiol. **1**, 297 - 300
- Reineke, W. (2001):
Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of microorganisms.
In The Handbook of Environmental Chemistry. Vol. 2 Part K, B. Beek (Ed.), Springer
Verlag, Berlin. 1 - 161
- Riegert, U., Heiss, G., Fischer, P. & Stolz, A. (1998):
Distal cleavage of 3-chlorocatechol by an extradiol dioxygenase to 3-chloro-2-
hydroxymuconic semialdehyde.
J. Bacteriol. **180**, 2849 - 2853

- Rajo, F., Pieper, D. H., Engesser, K. H., Knackmuss, H.-J. & Timmis, K. N. (1987):
Assemblage of *ortho* cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics.
Science **238**, 1395-1398
- Rossi, A. & Schinz, H. (1948):
Alcuni α -cheto- γ -lattoni con sostituenti alchilici in posizione γ .
Helv. Chim. Acta **31**, 473 - 492
- Sala-Trepat, M. & Evans, W. C. (1971):
The *meta*-cleavage of catechol by *Azotobacter* species. 4-oxalocrotonate pathway.
Eur. J. Biochem. **20**, 400 - 413
- Salat-Trepat, J. M., Murray, K. & Williams, P. A. (1972):
The metabolic divergence in the *meta* cleavage of catechols by *Pseudomonas putida* NCIB 10015.
Eur. J. Biochem. **28**, 347 - 356
- Schlosser, M. & Cottet, F. (2002):
Silyl-mediated halogen/halogen displacement in pyridines and other heterocycles.
Eur. J. Org. Chem. **24**, 4181 - 4184
- Shapira, J. & Dittmer, K. (1960):
Unsaturated amino acids. IV. Synthesis of halogen substituted allylglycines.
J. Am. Chem. Soc. **82**, 1495 - 1497
- Shingler, V., Powlowski, J. & Marklund, U. (1992):
Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol/3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600.
J. Bacteriol. **174**, 711 - 724
- Sparnis, V. L., Chapman, P. J. & Dagley, S. (1974):
Bacterial degradation of 4-hydroxyphenylacetic acid and homoprotocatechuic acid.
J. Bacteriol. **120**, 159 - 167
- van der Ploeg, J. R., Kingma, J., de Vries, E. J., van der Ven, J. G. M. & Janssen, D. B. (1996):
Adaption of *Pseudomonas* sp. GJ1 to 2-bromoethanol caused by overexpression of an NAD-dependent aldehyde dehydrogenase with low affinity for halogenated aldehydes.
Arch. Microbiol. **165**, 258 - 264
- Whitman, C. P., Aird, B. A., Gillespie, W. R. & Stolowich, N. J. (1991):
Chemical and enzymatic ketonization of 2-hydroxymuconate, a conjugated enol.
J. Am. Chem. Soc. **113**, 3154 - 3162
- Whitman, C. P., Lian, H., Czerwinski, R. M., Stanley, M. S., W. H. Johnson, Jr. & Watson, R. J. (1998):
The contribution of the substrate's carboxylate group to the mechanism of 4-oxalocrotonate tautomerase.
Bioorg. Chem. **26**, 141 - 156

- Wieser, M., Eberspächer, J., Vogler, B. & Lingens, F. (1994):
Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP1: structure of the *meta* cleavage product of 4-chlorocatechol.
FEMS Microbiol. Lett. **116**, 73 - 78
- Wieser, M., Eberspächer, J., Vogler, B. & Lingens, F. (1994):
Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP1: structure of the *meta* cleavage product of 4-chlorocatechol.
FEMS Microbiology Letters **116**, 73 - 78
- Williams, P. A. & Murray, K. (1974):
Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid.
J. Bacteriol. **120**, 416 - 423
- Winneke, G. (2002):
Aufnahme polychlorierter Biphenyle vor und nach der Geburt: Auswirkungen auf die frühkindliche Entwicklung.
Internistische Praxis **42**, 919 - 922
- Wong, C. L. & Dunn, N. W. (1974):
Transmissible plasmid coding for the degradation of benzoate and *m*-toluate in *Pseudomonas arvilla* mt-2.
Genet. Res. **23**, 227 - 232
- Worsey, M. J., Franklin, F. C. H. & Williams, P. A. (1978):
Regulation of the degradative pathway enzymes coded for by the TOL plasmid (pWW0) from *Pseudomonas putida* mt-2.
J. Bacteriol. **134**, 757 - 764
- Worsey, M. J. & Williams, P. A. (1975):
Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for a new function of the TOL plasmid.
J. Bacteriol. **124**, 7 - 13
- Zuidema, G. D., Tamelen, E. van & Zyl, G. van (1963):
 α -Acetyl- δ -chloro- γ -valerolactone.
Org. Synth. **4**, 10 - 12

7. Abkürzungen

A_{\max}	maximale spezifische Aktivität
bidest.	zweifach destilliert
BSA	Rinderserumalbumin
CI	chemische Ionisation
CoA	Coenzym A
δ	chemische Verschiebung
d	Tag/Dublett
dd	Dublett von Dubletts
ddd	Dublett von Dubletts von Dubletts
dt	Dublett von Tripletts
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAse	Desoxyribonuklease
EA	Elementaranalyse
ϵ_M	molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eV	Elektronenvolt
g	Erdbeschleunigung
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
h	Stunde
J	Kopplungskonstante
kbp	Kilobasenpaare
λ	Wellenlänge
LB	Luria Bertani
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	Stoffmengenkonzentration (mol/l)
M^+	Massenpeak

m	Multipllett
mesh	Partikelgröße
MHz	Megahertz
min	Minute
MPa	Megapascal
MS	Massenspektrometrie
NADase	Nicotinamidadenindinukleotid-Glycohydrolase
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (red.)
NMR	magnetische Kernresonanz
OD	optische Dichte
p. a.	pro analysi
pers. Mit.	persönliche Mitteilungen
ppm	parts per million
R _f	ratio of fronts
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
sek	Sekunde
[S] _½	Substratkonzentration, bei der die halbe maximale spezifische Enzymaktivität erreicht wird
Sdp.	Siedepunkt
Smp	Schmelzpunkt
t	Tripllett
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TCC	Tricarbonsäure-Cyclus
U	internationale Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Ø	Durchmesser
% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent

8. Anhang

8.1 Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen in Rohextrakten von *Pseudomonas putida* GJ31, PaW1 und WR311

8.1.1 Bestimmung der Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitäten

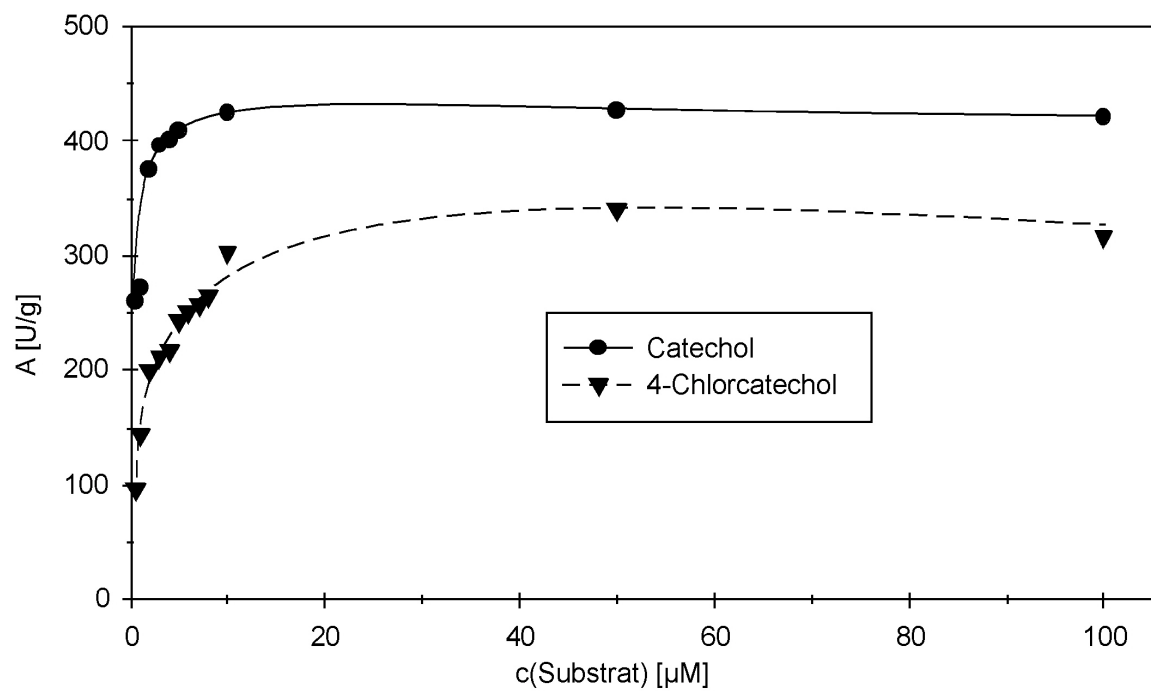


Abb. 8.1: Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentrationen der Substrate Catechol und 4-Chlorcatechol, bestimmt im Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur.

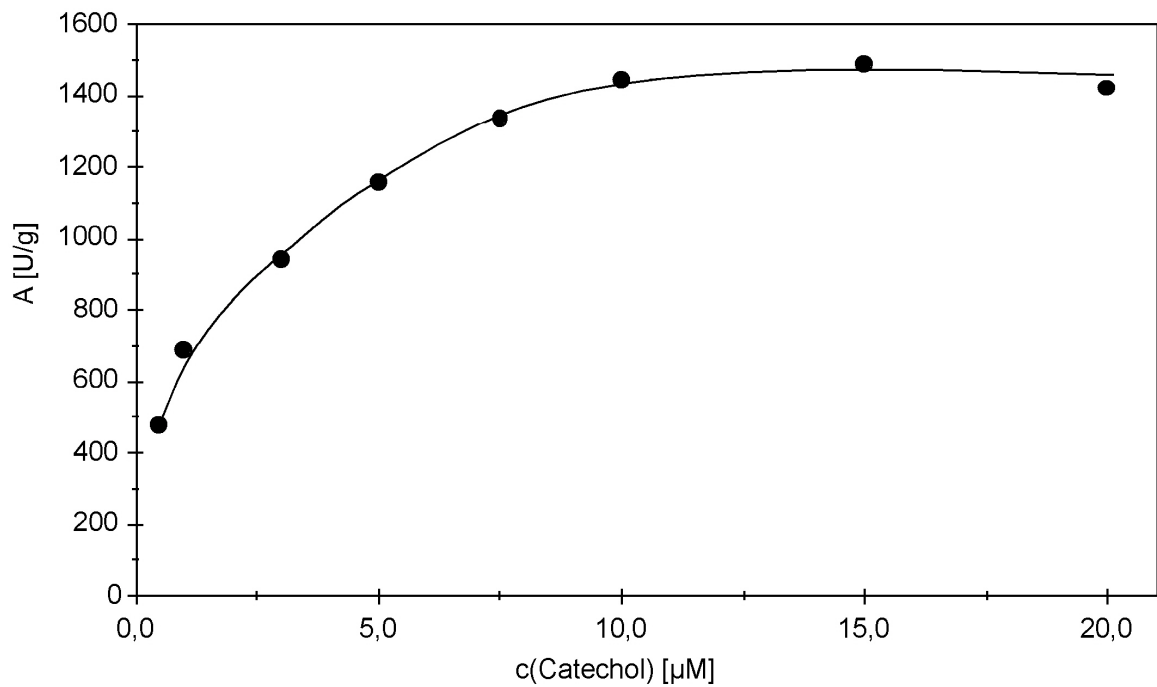


Abb. 8.2: Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats Catechol, bestimmt im Rohextrakt des CbzE-Expressionsstammes *Escherichia coli* JM109 (pU2-36).

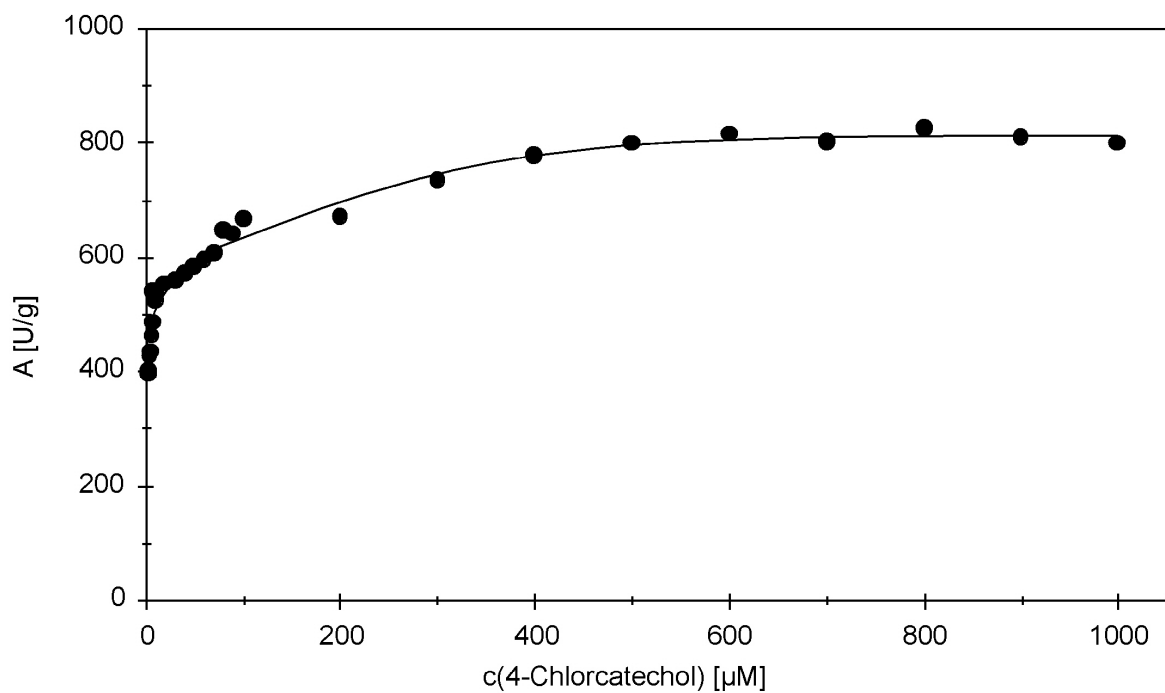


Abb. 8.3: Chlorocatechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 4-Chlorocatechol, bestimmt im Rohextrakt des CbzE-Expressionsstammes *Escherichia coli* JM109 (pU2-36).

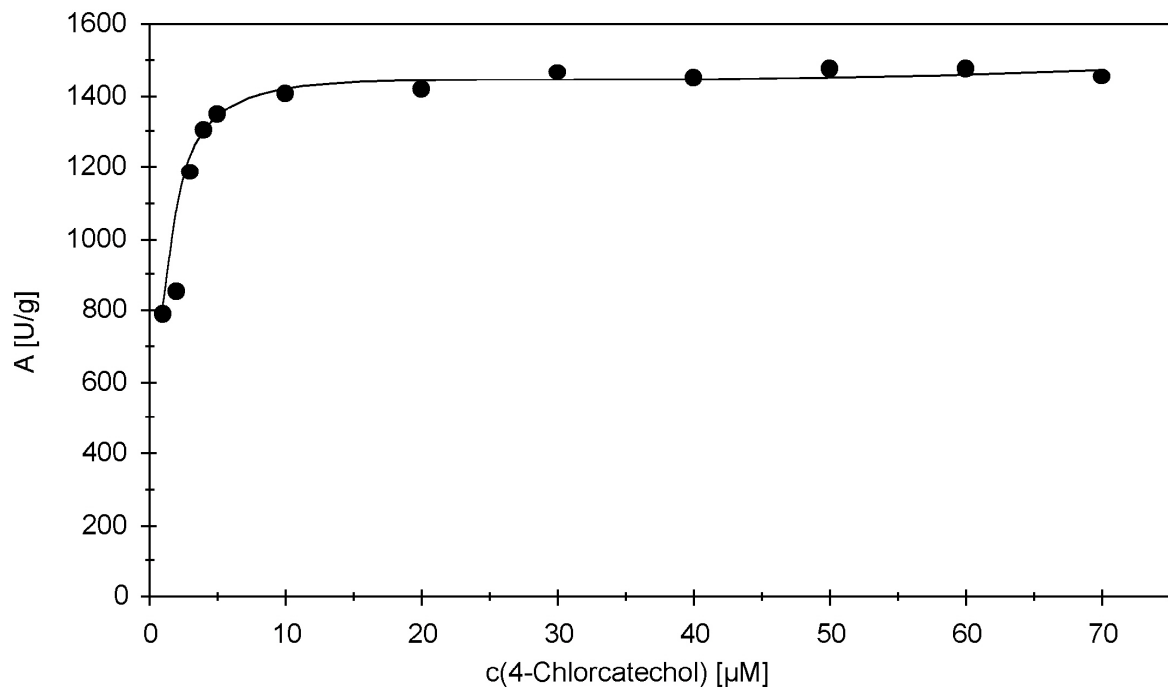


Abb. 8.4: Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 4-Chlorcatechol, bestimmt im Rohextrakt einer auf 3-Methylbenzoat gewachsenen *Pseudomonas putida* PaW1-Kultur.

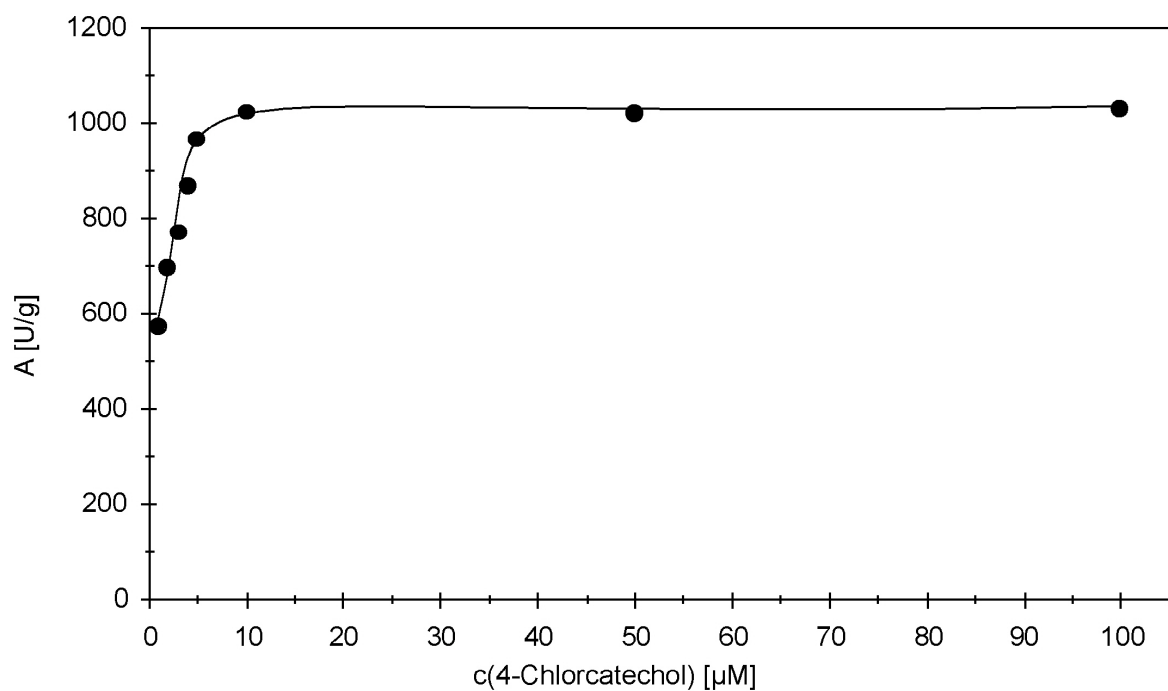


Abb. 8.5: Catechol-2,3-Dioxygenase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 4-Chlorcatechol, bestimmt im Rohextrakt einer auf 4-Chlorbenzoat gewachsenen *Pseudomonas putida* WR311-Kultur.

8.1.2 Bestimmung der 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase- und Dehydrogenase-Aktivitäten

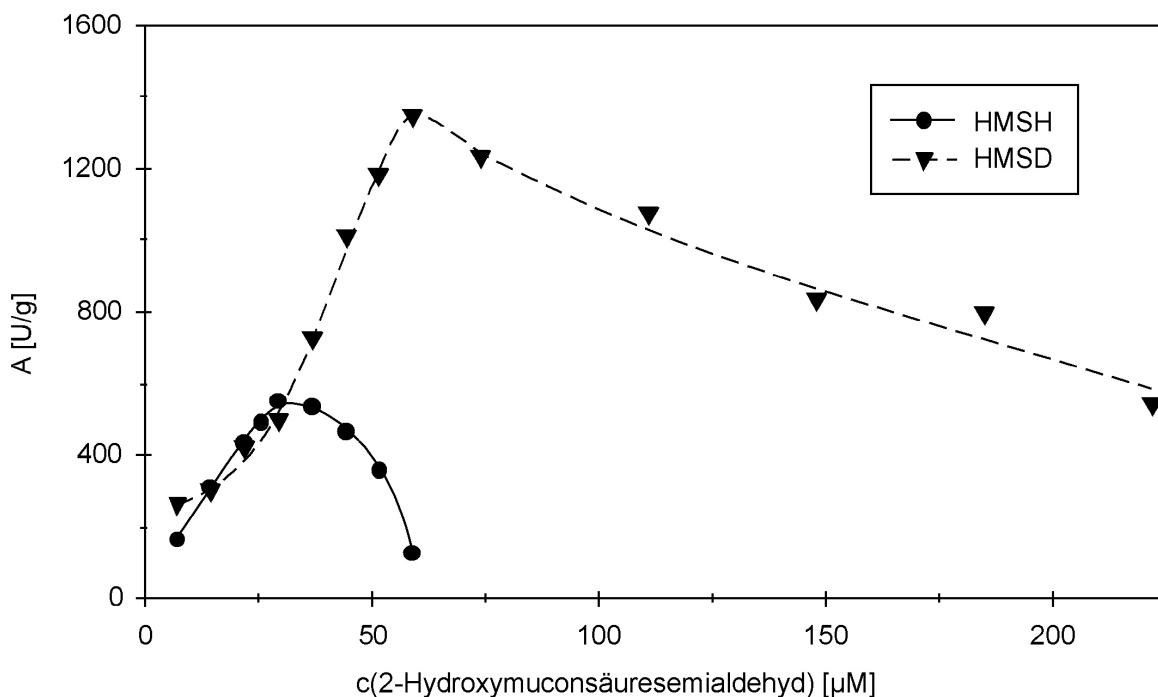


Abb. 8.6: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase (HMSH) und -Dehydrogenase (HMSD)-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd (1), bestimmt im Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur.

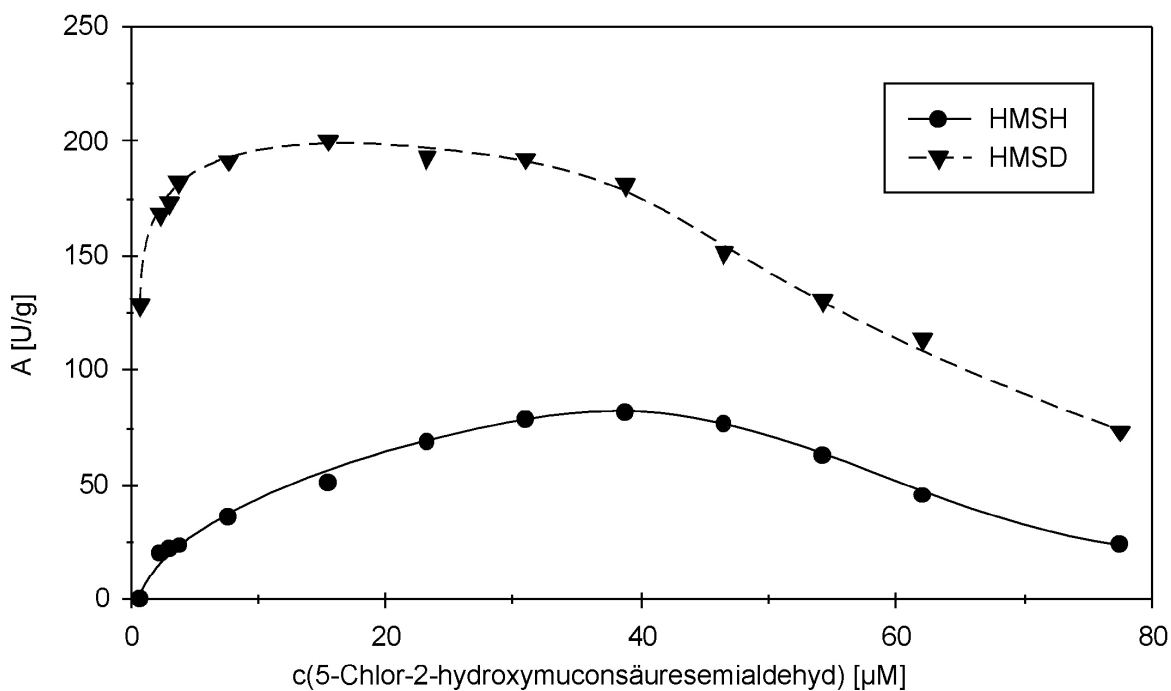


Abb. 8.7: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase (HMSH) und -Dehydrogenase (HMSD)-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (6), bestimmt im Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur.

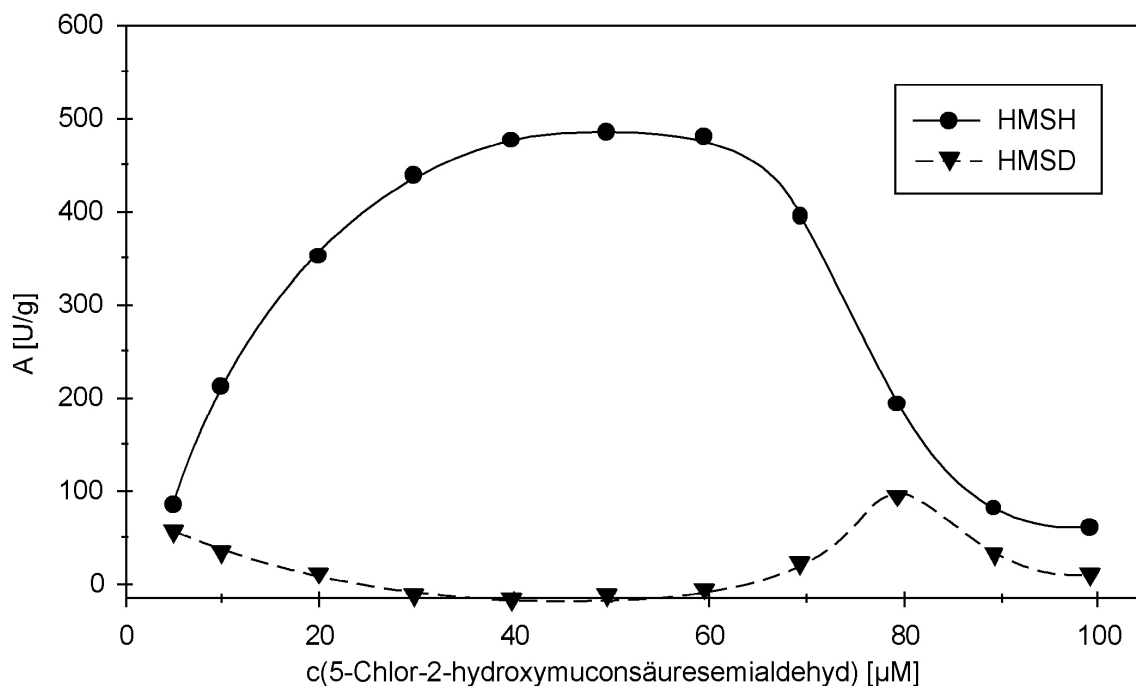


Abb. 8.8: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase (HMSH) und -Dehydrogenase (HMSD)-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (6), bestimmt im Rohextrakt einer auf 3-Methylbenzoat gewachsenen *Pseudomonas putida* PaW1-Kultur.

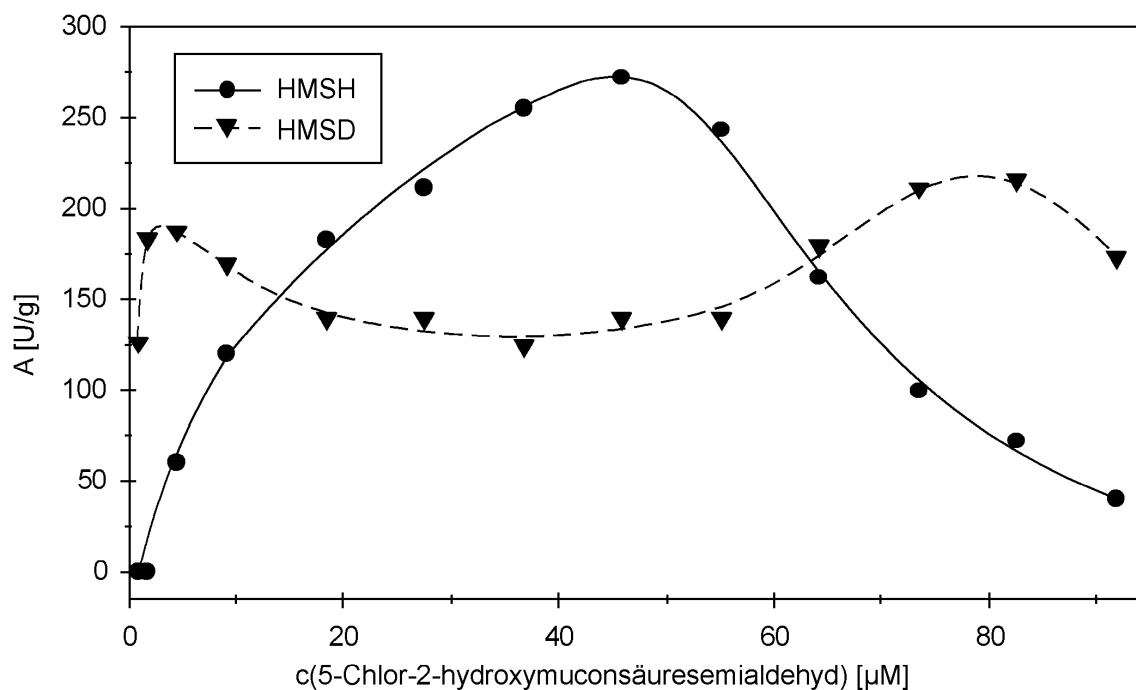


Abb. 8.9: 2-Hydroxymuconsäuresemialdehyd-Hydrolase (HMSH) und -Dehydrogenase (HMSD)-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 5-Chlor-2-hydroxymuconsäuresemialdehyd (6), bestimmt im Rohextrakt einer auf 4-Chlorbenzoat gewachsenen *Pseudomonas putida* WR311-Kultur.

8.1.3 Bestimmung der 4-Oxalocrotonat-Tautomerase-Aktivitäten

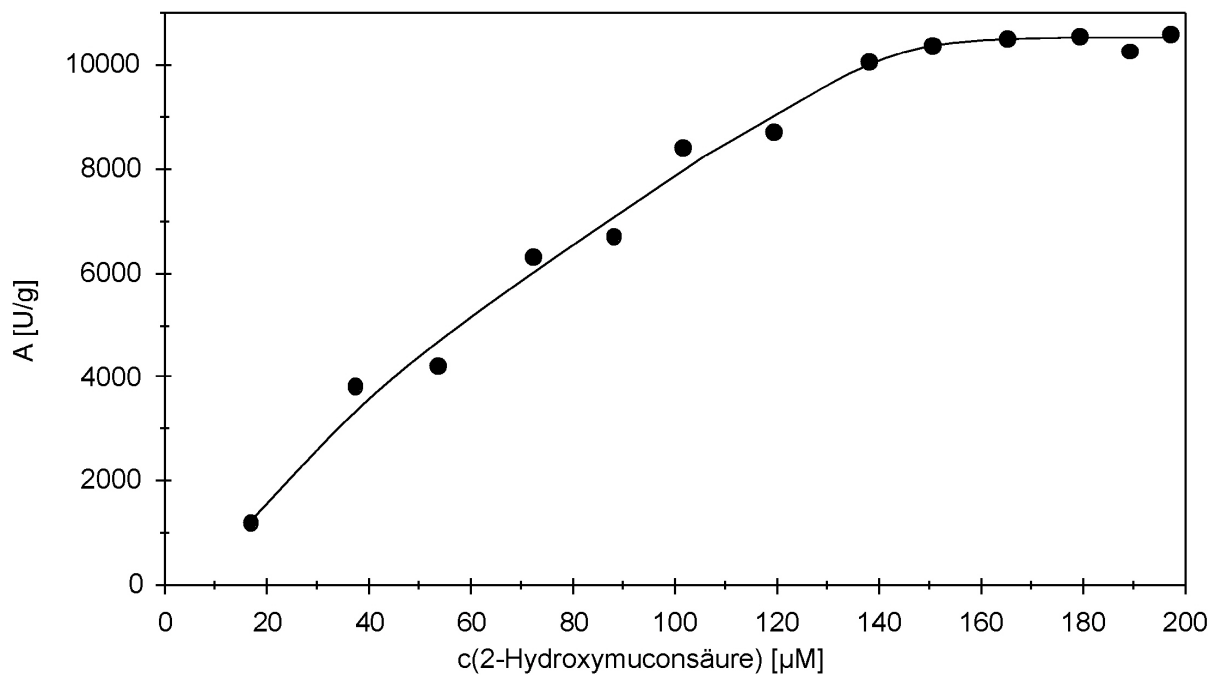


Abb. 8.10: 4-Oxalocrotonat-Tautomerase Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 2-Hydroxymuconsäure (2), bestimmt im Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur.

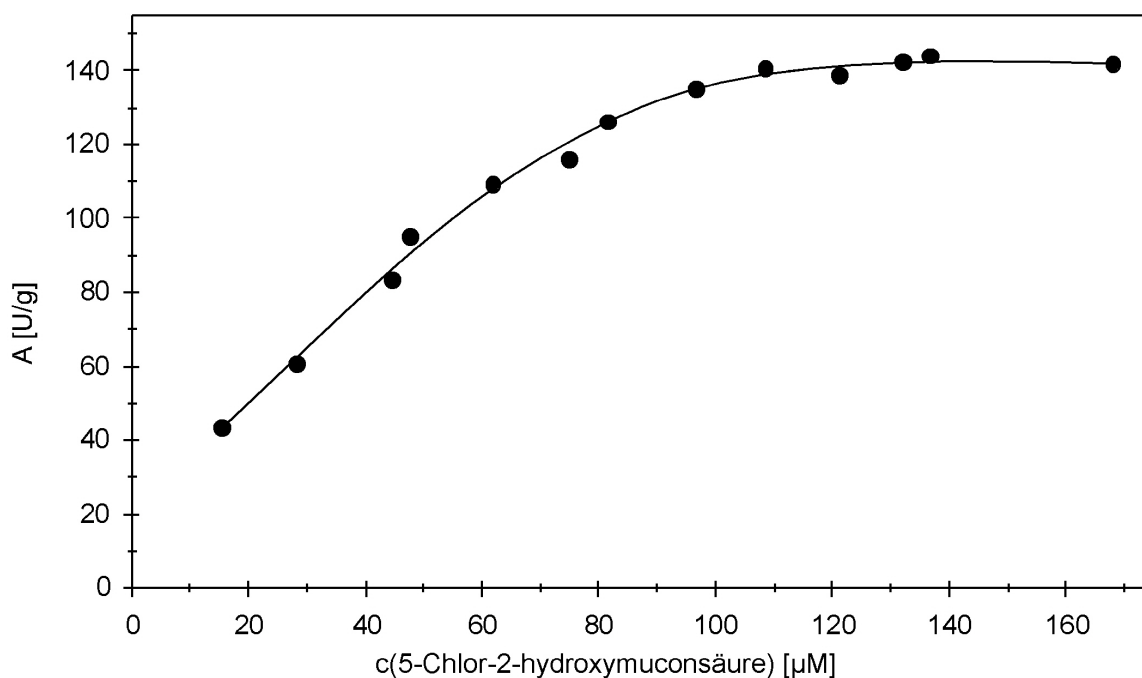


Abb. 8.11: 4-Oxalocrotonat-Tautomerase Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 5-Chlor-2-hydroxymuconsäure (7), bestimmt im Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur.

8.1.4 Bestimmung der 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase-Aktivitäten

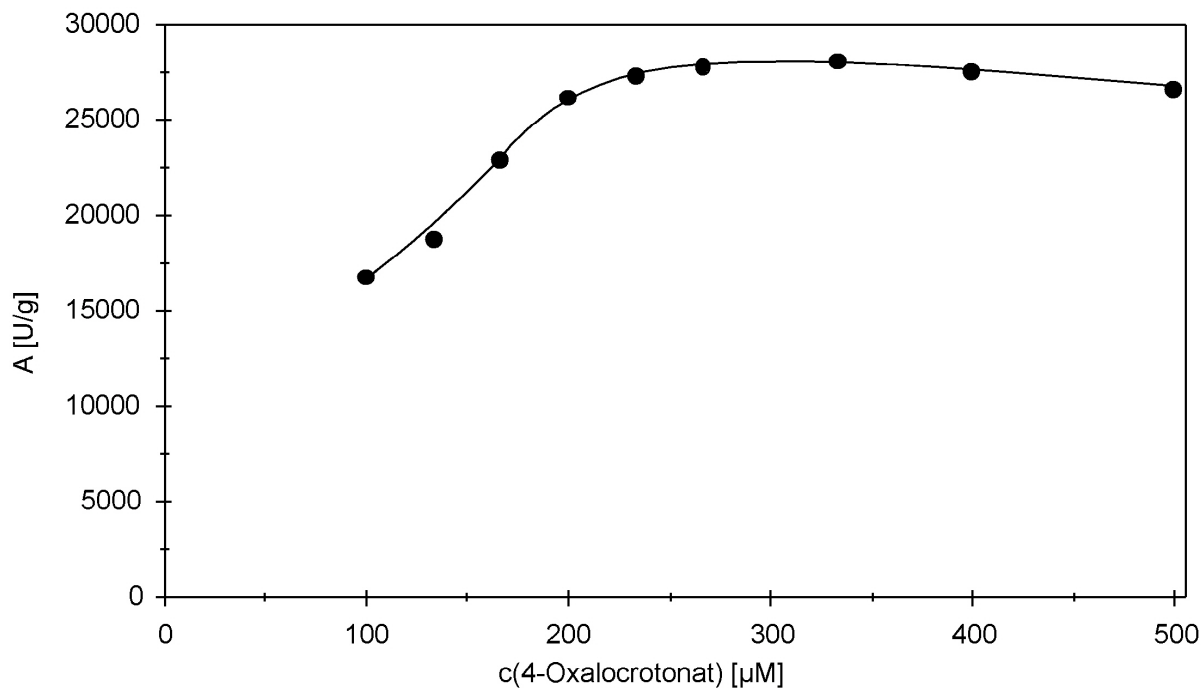


Abb. 8.12: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 4-Oxalocrotonat (**3**), bestimmt im Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur.

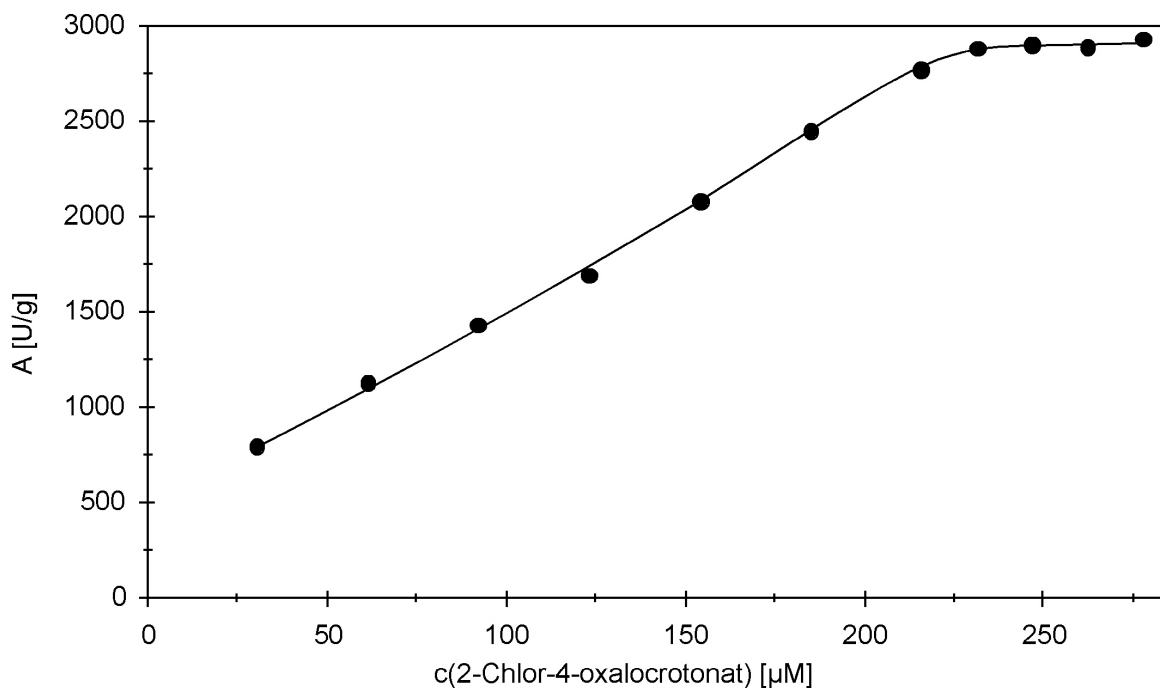


Abb. 8.13: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 2-Chlor-4-oxalocrotonat (**8**), bestimmt im Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur.

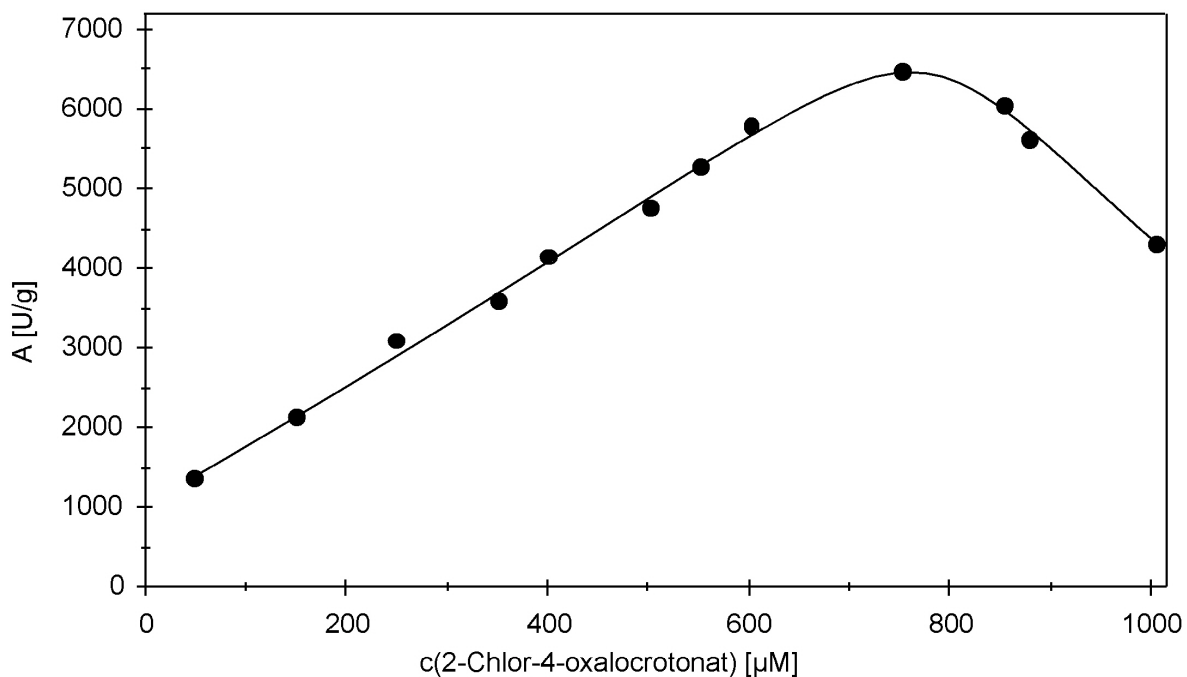


Abb. 8.14: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 2-Chlor-4-oxalocrotonat (**8**), bestimmt im Rohextrakt einer auf 3-Methylbenzoat gewachsenen *Pseudomonas putida* PaW1-Kultur.

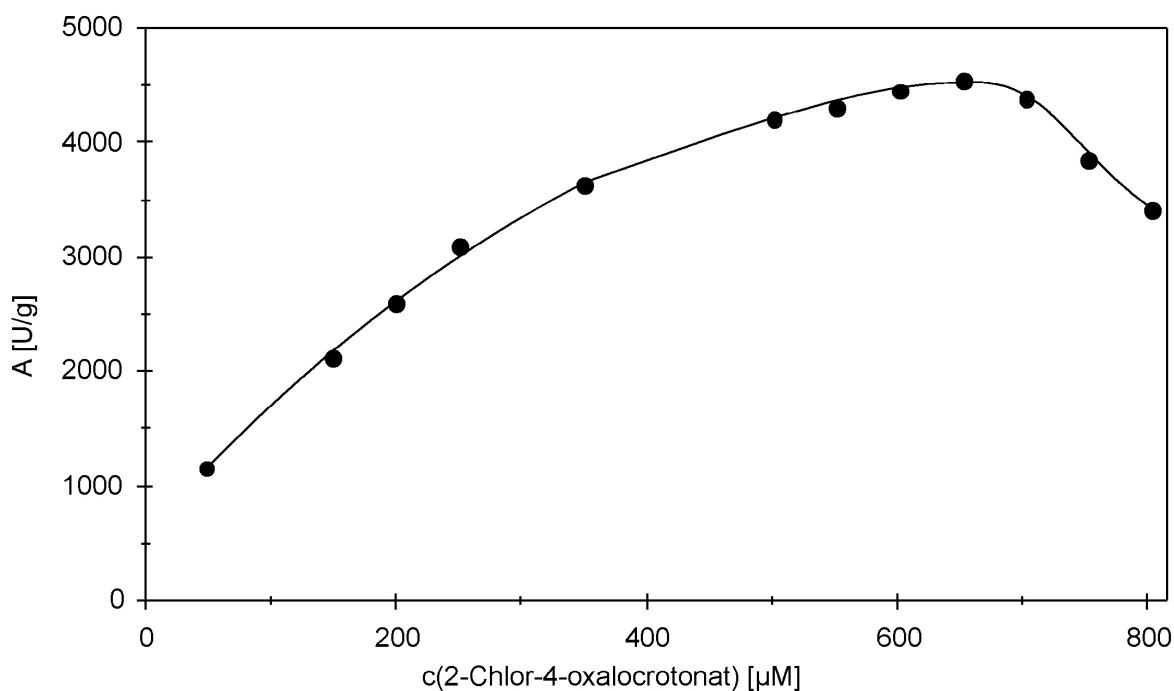


Abb. 8.15: 4-Oxalocrotonat-Decarboxylase Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats 2-Chlor-4-oxalocrotonat (**8**), bestimmt im Rohextrakt einer auf 4-Chlorbenzoat gewachsenen *Pseudomonas putida* WR311-Kultur.

8.1.5 Bestimmung der 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase-Aktivitäten

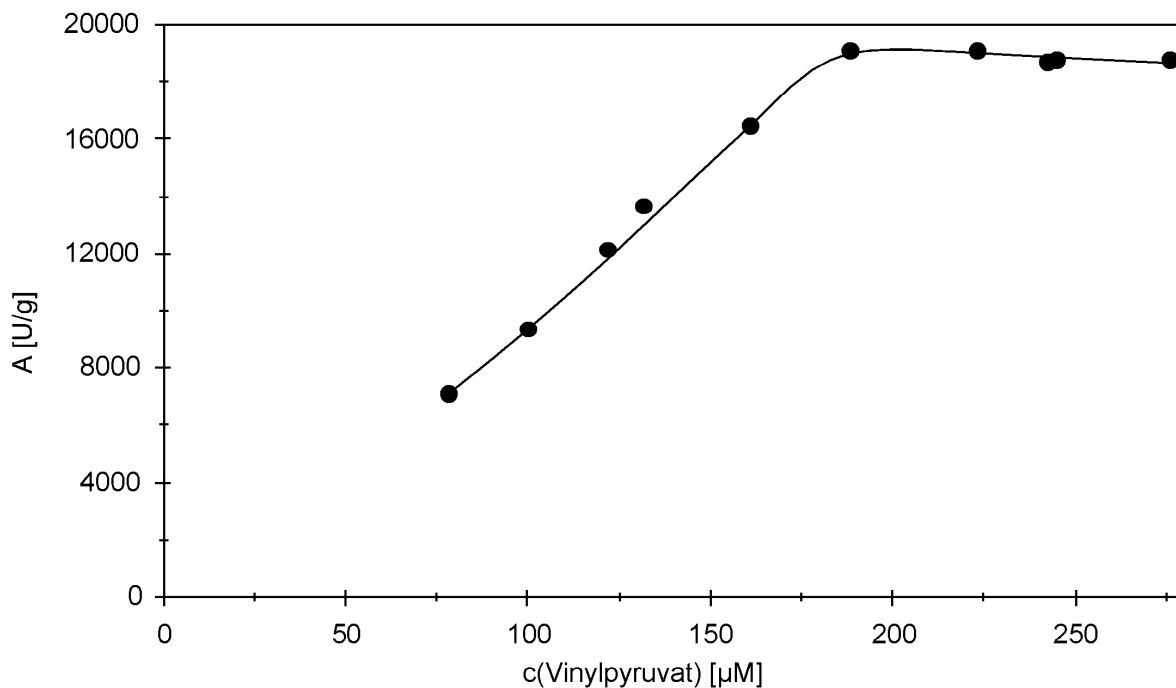


Abb. 8.16: 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats Vinylpyruvat (4), bestimmt im Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur.

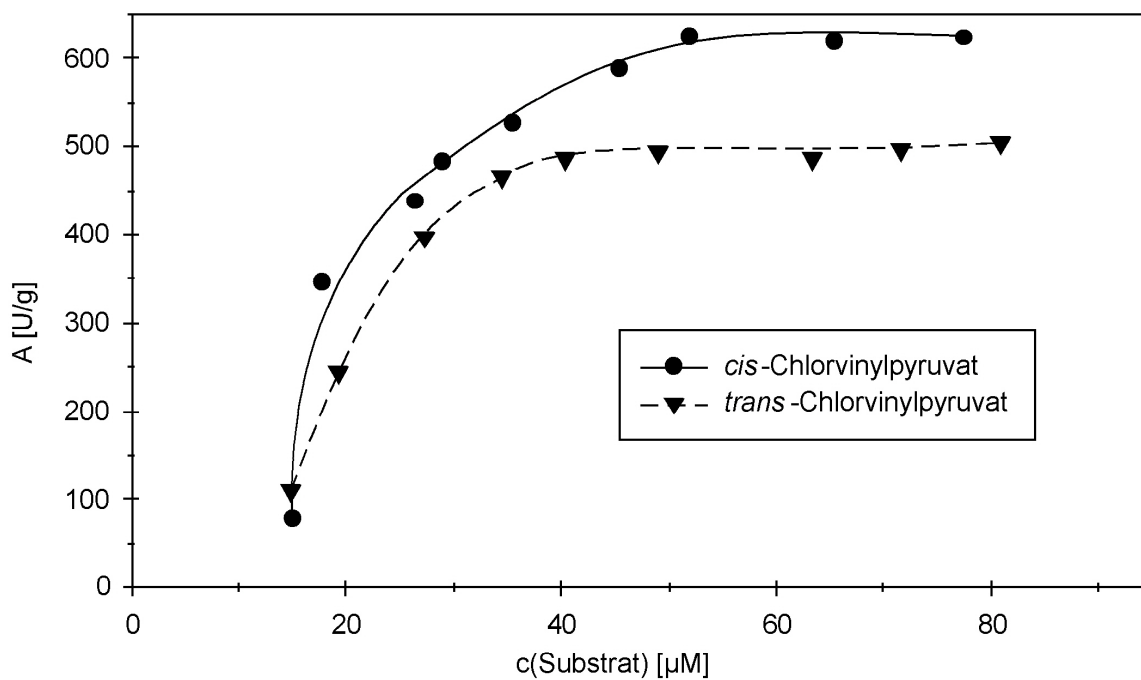


Abb. 8.17: 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration der Substrate *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (9), bestimmt im Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur.

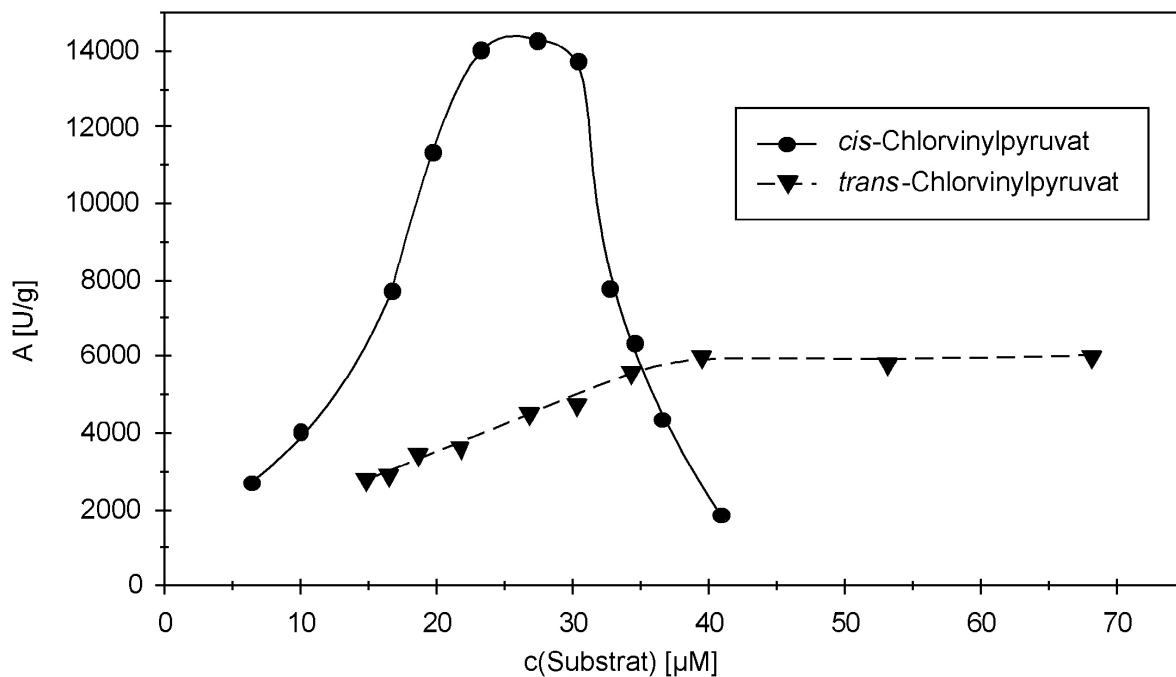


Abb. 8.18: 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration der Substrate *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (9), bestimmt im Rohextrakt einer auf 3-Methylbenzoat gewachsenen *Pseudomonas putida* PaW1-Kultur.

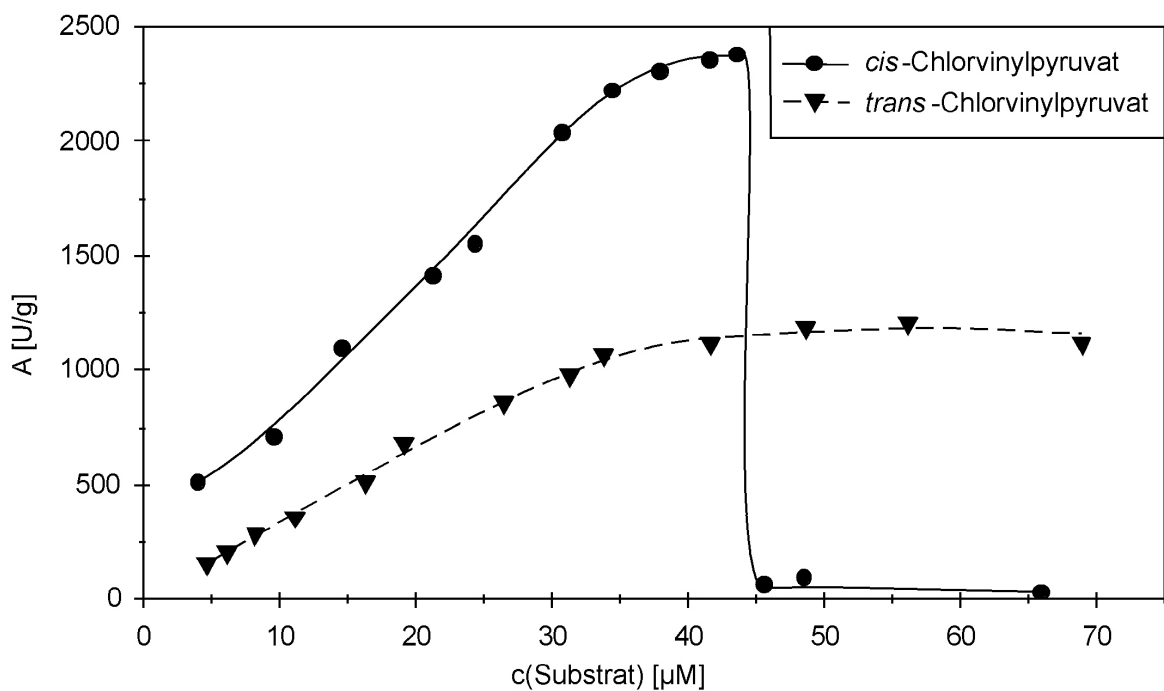


Abb. 8.19: 2-Oxo-4-pentenoat-Hydratase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration der Substrate *cis*- und *trans*-Chlorvinylpyruvat (9), bestimmt im Rohextrakt einer auf 4-Chlorbenzoat gewachsenen *Pseudomonas putida* WR311-Kultur.

8.1.6 Bestimmung der 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase-Aktivitäten

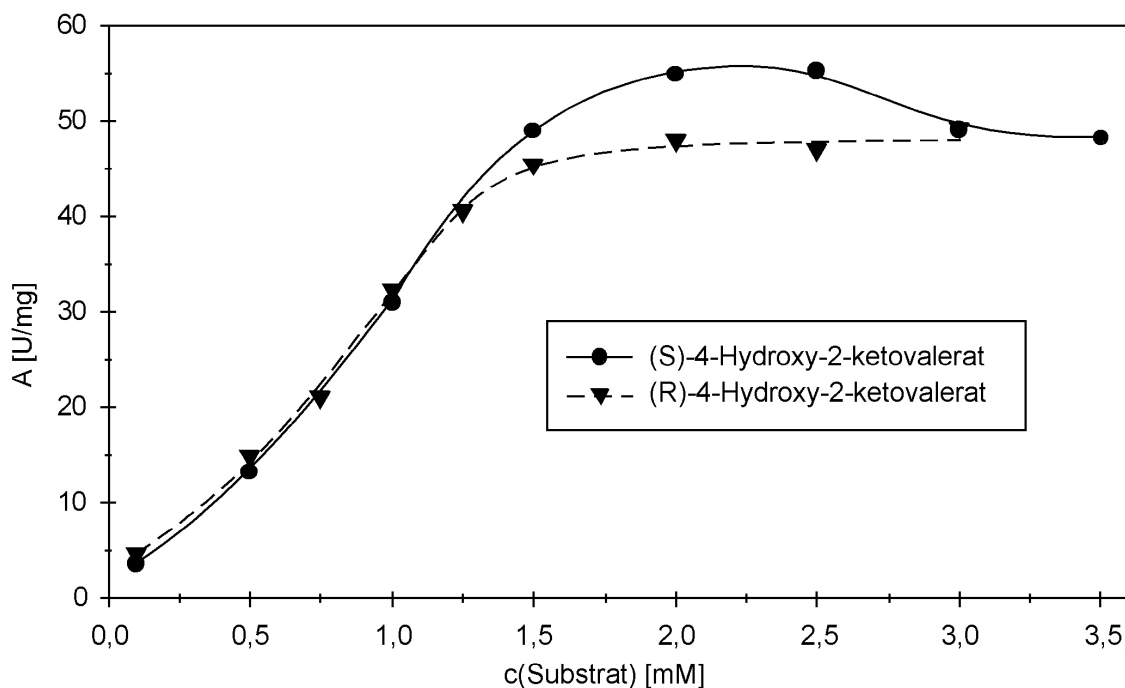


Abb. 8.20: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration der Substrate (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat (5), bestimmt im Rohextrakt einer auf Chlorbenzol gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur.

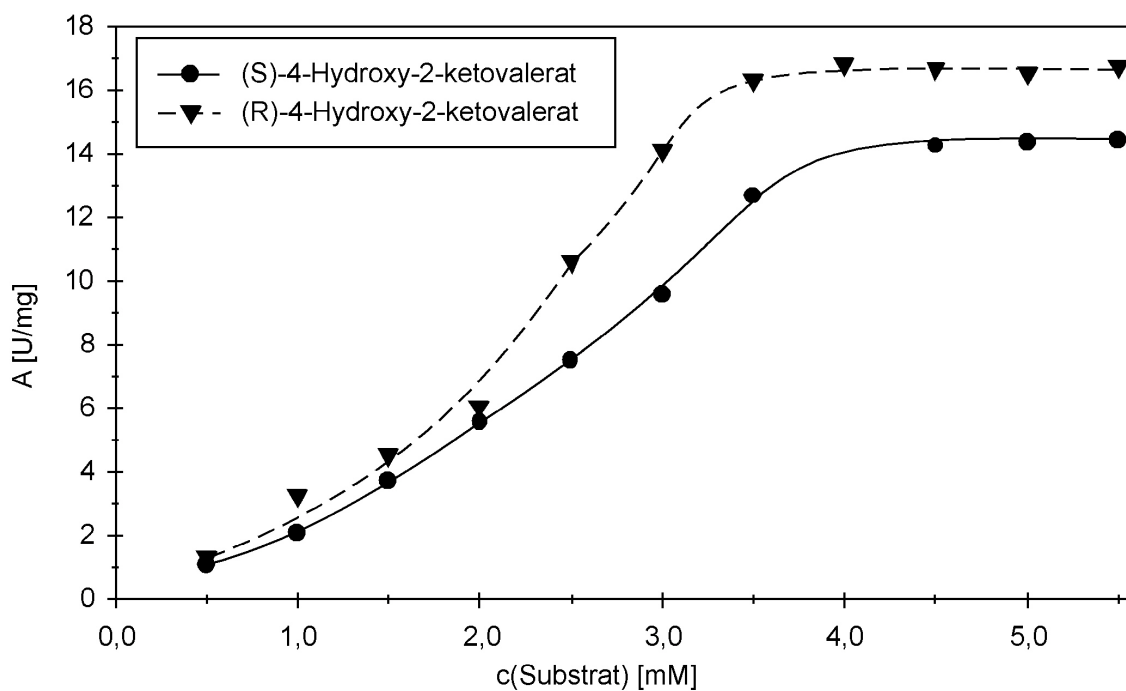


Abb. 8.21: 4-Hydroxy-2-oxovalerat-Aldolase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration der Substrate (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxovalerat (5), bestimmt im Rohextrakt einer auf 3-Methylbenzoesäure gewachsenen *Pseudomonas putida* PaW1-Kultur.

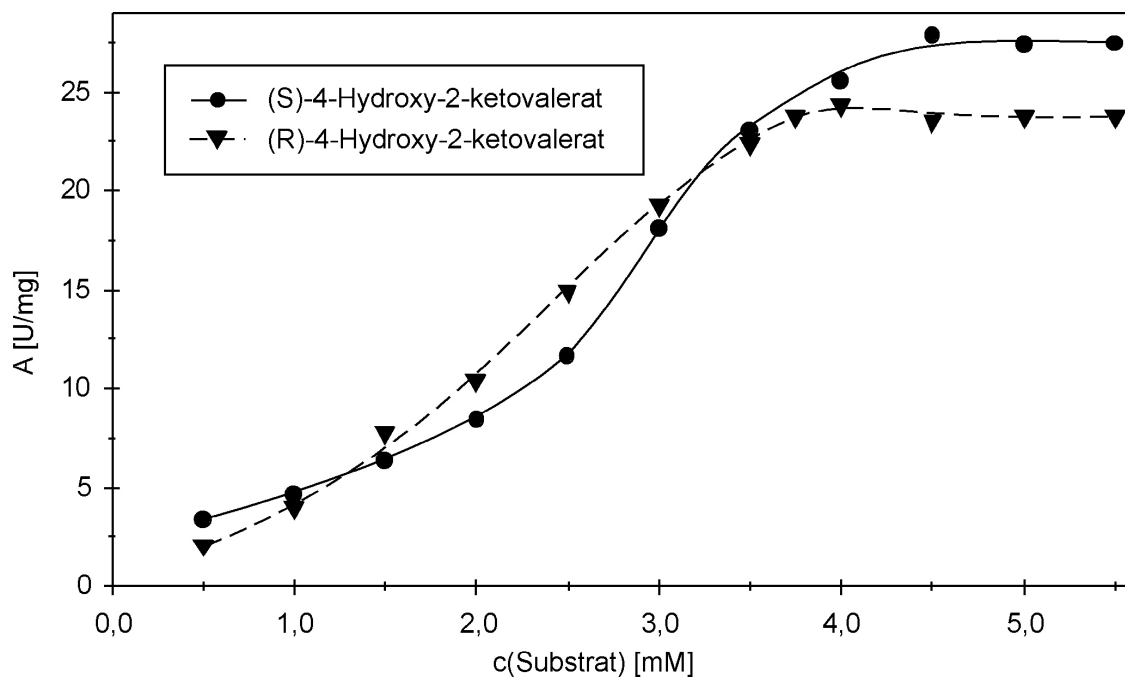


Abb. 8.22: 4-Hydroxy-2-oxoalderat-Aldolase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration der Substrate (S)- und (R)-4-Hydroxy-2-oxoalderat (5), bestimmt im Rohextrakt einer auf 4-Chlorbenzoesäure gewachsenen *Pseudomonas putida* WR311-Kultur.

8.1.7 Bestimmung der Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten

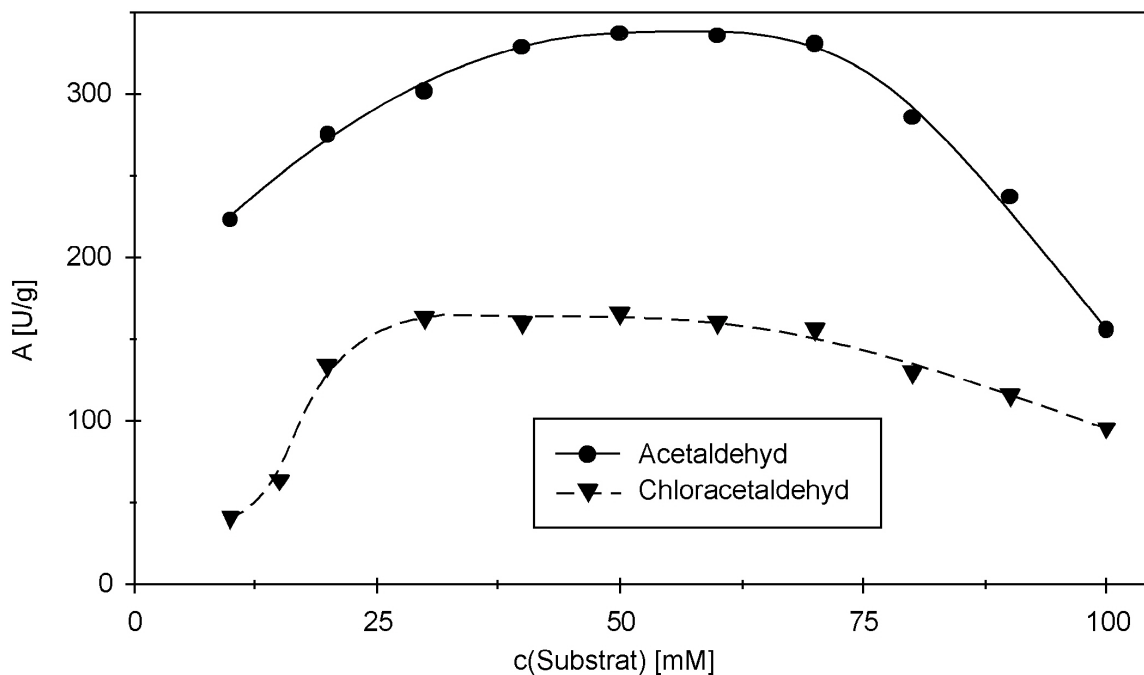


Abb. 8.23: Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration der Substrate Acetaldehyd und Chloroacetaldehyd, bestimmt im Rohextrakt einer auf Chlorbenzoesäure gewachsenen *Pseudomonas putida* GJ31-Kultur.

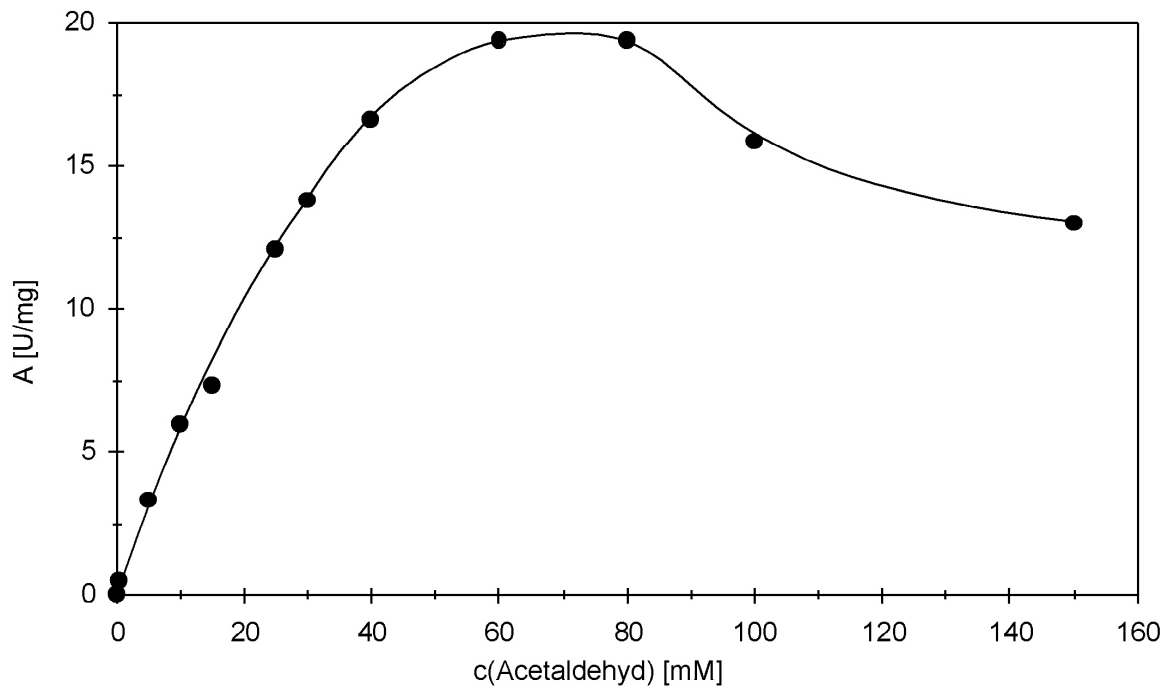


Abb. 8.24: Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration des Substrats Acetaldehyd, bestimmt im Rohextrakt einer auf 3-Methylbenzoat gewachsenen *Pseudomonas putida* PaW1-Kultur.

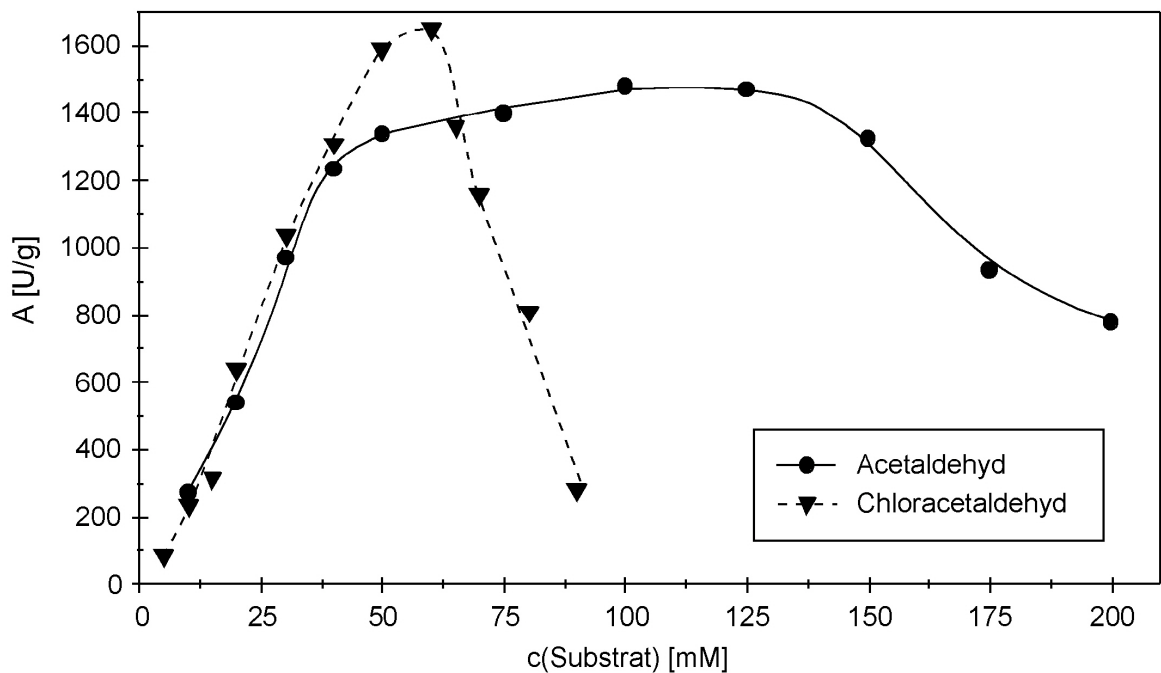
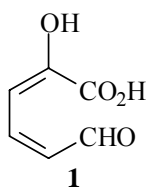
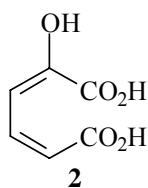
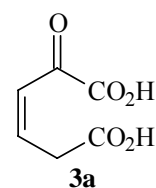


Abb. 8.25: Acetaldehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten in Abhängigkeit der Konzentration der Substrate Acetaldehyd und Chloracetaldehyd, bestimmt im Rohextrakt einer auf 4-Chlorbenzoat gewachsenen *Pseudomonas putida* WR311-Kultur.

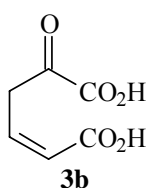
8.2 Verbindungsverzeichnis:

2-Hydroxymucon-
säuresemialdehyd

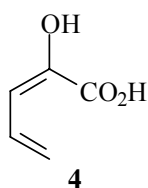
2-Hydroxymuconsäure



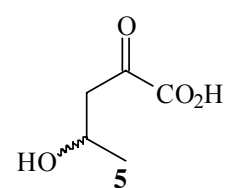
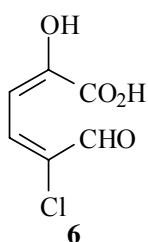
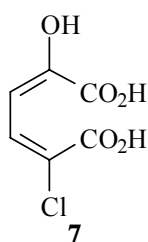
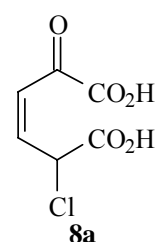
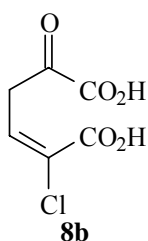
2-Oxo-3-hexendisäure



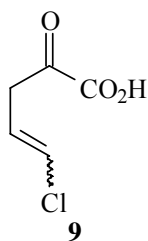
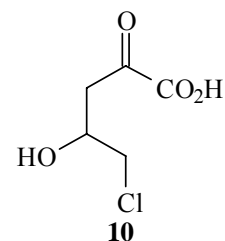
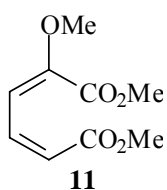
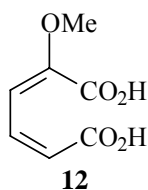
4-Oxalocrotonat



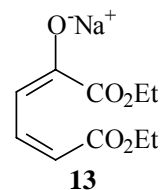
Vinylpyruvat

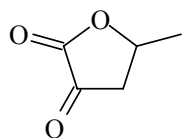
R/S-4-Hydroxy-2-
oxovalerat5-Chlor-2-hydroxy-
muconsäuresemialdehyd5-Chlor-2-hydroxy-
muconsäure5-Chlor-2-oxo-3-
hexendisäure

2-Chlor-4-oxalocrotonat

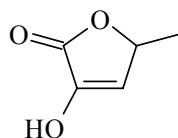
*cis/trans*-Chlorvinyl-
pyruvatR/S-5-Chlor-4-hydroxy-
2-oxovalerat2-Methoxymuconsäure-
dimethylester

2-Methoxymuconsäure

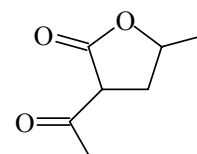
Natrium-Muconsäure-
diethylester-2-olat

**14a**

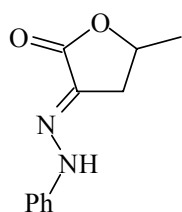
4-Methyl-3-oxo-
dihydro-2-furanon

**14b**

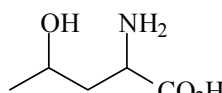
3-Hydroxy-5-methyl-
5H-2-furanon

**15**

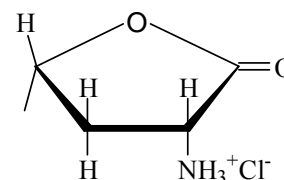
3-Acetyl-5-methyl-
dihydro-2-furanon

**16**

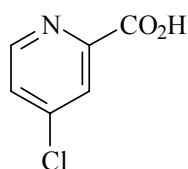
5-Methyl-3-phenylhydrazono-
dihydro-2-furanon

**17**

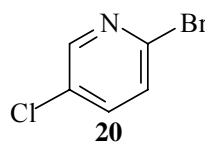
2-Amino-4-hydroxypentansäure

**18**

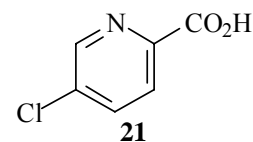
3-Amino-5-methyldihydro-2-
furanonhydrochlorid

**19**

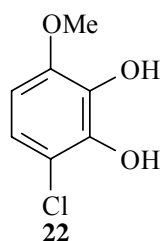
4-Chlorpicolinsäure

**20**

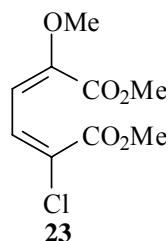
2-Brom-5-chlorpyridin

**21**

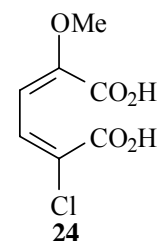
5-Chlorpicolinsäure

**22**

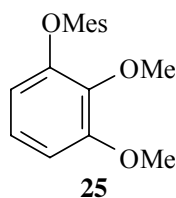
3-Chlor-6-methoxy-
catechol

**23**

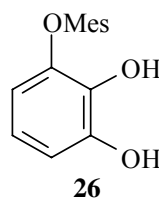
5-Chlor-2-methoxy-
muconsäuredimethylester

**24**

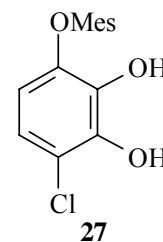
5-Chlor-2-methoxy-
muconsäure

**25**

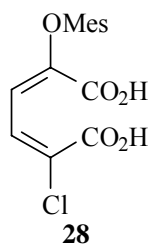
Methansulfonsäure-2,3-
dimethoxyphenylester

**26**

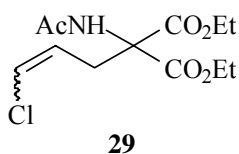
Methansulfonsäure-2,3-
dihydroxyphenylester

**27**

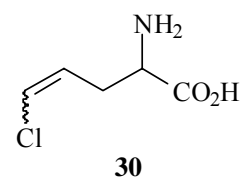
Methansulfonsäure-4-
chlor-2,3-dihydroxyphenylester



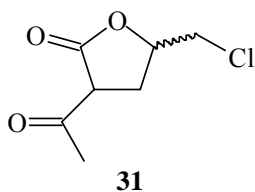
5-Chlor-2-methan-
sulfonylxymuconsäure



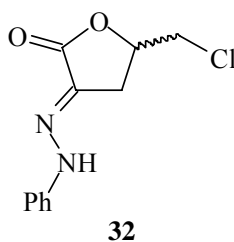
cis/trans-3-Chlorallylac-
amidomalonsäurediethylester



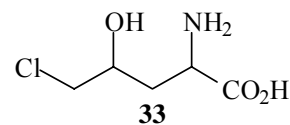
cis/trans-2-Amino-
5-chlor-4-pentensäure



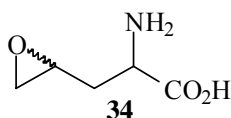
R/S-3-Acetyl-5-chlor-
methyl-dihydro-2-furanon



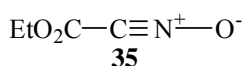
R/S-5-Chlormethyl-3-phenyl-
hydrazonodihydro-2-furanon



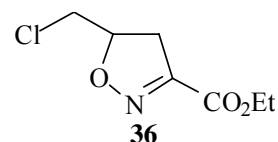
2-Amino-5-chlor-4-
hydroxypentensäure



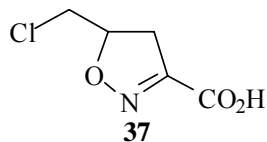
R/S-2-Amino-4,5-
epoxypentensäure



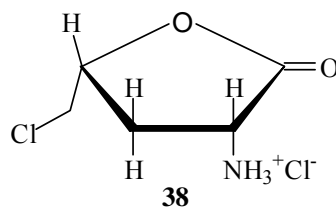
Oxalsäureethylesternitroxid



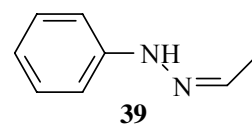
5-Chlormethylisoxa-
zolin-3-carbonsäureethylester



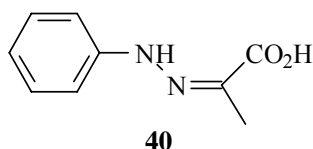
5-Chlormethylisoxa-
zolin-3-carbonsäure



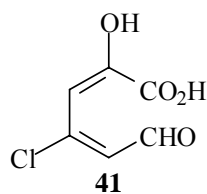
3-Amino-5-chlormethyl-
dihydro-2-furanonhydrochlorid



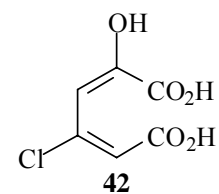
Acetaldehydphenylhydrazon



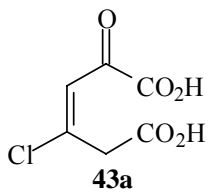
Pyruvat-Phenylhydrazon



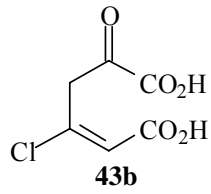
4-Chlor-2-hydroxy-
muconsäureseimaldehyd



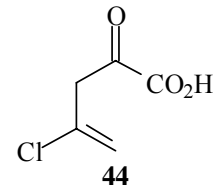
4-Chlor-2-hydroxy-
muconsäure



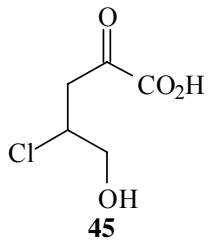
4-Chlor-2-oxo-3-hexendisäure



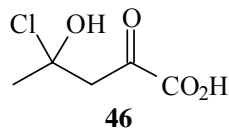
3-Chlor-4-oxalocrotonat



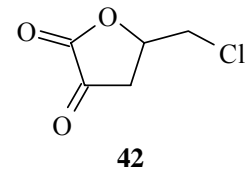
4-Chlor-2-oxo-4-pentenoat



R/S-4-Chlor-5-hydroxy-2-oxovalerat



4-Chlor-4-hydroxy-2-oxovalerat



4-Chlormethyl-3-oxodihydro-2-furanon