Biotransformation und Abbau heterozyklischer Verbindungen durch Bakterien

elektronisches dokument
ULB Sachsen-Anhalt

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium habilitus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dr. rer. nat. Thomas Schräder
geb. am: 11.12.1960 in Oedelsheim

Gutachter:
1. Prof. Dr. J. R. Andreesen
2. Prof. Dr. K.-H. van Pee
3. Prof. Dr. K. Altendorf

Halle (Saale), 24.10.2001

urn:nbn:de:gbv:3-000003352
[http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003352]

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG 4

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE 5

1. Hydroxylierung von Heterozyklen durch Monooxygenasen 5

1.1. FAD-abhängige Pyrrol-2-carboxylat-umsetzende Monooxygenasen 7

1.2. Abbau von Morpholin durch *Mycobacterium* sp. HE5 13

1.2.1. Isolierung und Charakterisierung einer Morpholin-abbauenden Reinkultur 14

1.2.2. Funktion der L-Alanin Dehydrogenase beim Wachstum von *Mycobacterium* sp. HE5 auf Morpholin 17

1.2.3. Identifizierung und Charakterisierung der P450-abhängigen Morpholin-Monooxygenase 20

1.3. Abbau von Tetrahydrofuran durch *Pseudonocardia* sp. K1 24

1.3.1. Isolierung und Charakterisierung einer THF-abbauenden Reinkultur 24

1.3.2. Charakterisierung der THF-umsetzenden Monooxygenase 25

1.3.3. Molekularbiologische Analyse von weiteren am THF-Abbau beteiligten Proteinen 31

2. Hydroxylierung von Heteroaromaten durch Molybdän-abhängige Dehydrogenasen 34

2.1. 2-Hydroxyisonikotinsäure-Dehydrogenase aus *Mycobacterium* sp. INA1 36

2.2. 2-Hydroxylierung von Nikotinsäure durch Stamm DSM 6920 38

2.3. Die Selen-haltige Xanthin-Dehydrogenase aus *Eubacterium barkeri* 41

3. Abbau von Tetrahydrofurfuryl-2-Alkohol durch *Ralstonia eutropha* Bo 44

3.1. Isolierung und Charakterisierung der THFA-abbauenden Reinkultur 45

3.2. Charakterisierung der THFA-Dehydrogenase 46

3.3. Untersuchungen zur Induktion von Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen beim Wachstum von *R. eutropha* Bo auf verschiedenen Alkoholen 51

Ausblick 55

Literatur 60

Verzeichnis der für diese Arbeit relevanten eigenen Veröffentlichungen 73

Eidesstattliche Erklärung 75

Curriculum Vitae 76

Danksagung 78

EINLEITUNG

Die Zahl der in der Natur vorkommenden organischen Verbindungen wird auf mehr als 10 Millionen verschiedene Substanzen geschätzt (Wackett, 1998). Obwohl der größte Anteil organischer Moleküle durch natürliche Biosyntheseprozesse gebildet wird, sind seit dem Zeitalter der Petrochemie auch zunehmend industrielle Synthesen an ihrer Entstehung beteiligt. Ungefähr zwei Drittel aller organischen Verbindungen besitzen eine heterozyklische Struktur (Lettau, 1980; Kuhn and Suflita, 1989). Damit ist diese Verbindungsklasse für den Stoffkreislauf von außerordentlicher Bedeutung. Wie bei allen anderen Verbindungen spielen auch beim Katabolismus von Heterozyklen Mikroorganismen die zentrale Rolle, und man kann davon ausgehen, dass die weitaus meisten dieser Substanzen mikrobiell abbaubar sind. Im Vergleich zur großen Zahl der organischen Verbindungen ist das Wissen über ihren Abbau sehr gering. Studien zum Katabolismus wurden bisher lediglich für einige hundert Substanzen durchgeführt. Wackett (1998) bezeichnete diese Wissenslücke als „compound metabolism gap“. Da viele dieser Studien auf Metabolit- bzw. Intermediat-Analyse beruhen, ist über die am Abbau beteiligten Enzyme noch weitaus weniger bekannt (Fetzner, 2000).

Der mikrobiologische Abbau heterozyklischer Verbindungen wurde bisher überwiegend am Beispiel von N-Heteroaromaten untersucht (Kaiser et al., 1996; Fetzner, 1998; Fetzner et al., 1998; Fetzner, 2000). Über den Katabolismus von O- und S-Heteroaromaten ist im Gegensatz dazu, abgesehen von wenigen Ausnahmen, wie z. B. Furan-2-carbonsäure, Thiophen-2-carboxylat und Benzothiophenen erst relativ wenig bekannt (Koenig und Andreesen, 1992; Kropp und Fedorak, 1998; Padden et al., 1998). Auch der Abbau gesättigter Heterozyklen ist bisher kaum untersucht worden (Bernhard und Diekmann, 1991; Combourieu et al., 2000). Eine Schlüsselrolle beim Abbau zyklischer Verbindungen spielt die Öffnung des Ringsystems, die nur nach vorheriger Aktivierung der Substanz erfolgen kann. Bei den zyklischen Kohlenwasserstoffen wird diese Aktivierung in der Regel durch den elektrophilen Angriff einer Oxygenase erreicht. Aufgrund der Elektronenverteilung im Ringsystem aromatischer Heterozyklen spielen Monooxygenasen bei der initialen Hydroxylierung hier nur eine untergeordnete Rolle. Die meisten Heteroaromaten werden durch den nukleophilen Angriff einer Molybdän-abhängigen Dehydrogenase aktiviert (Fetzner, 2000). Sowohl die Oxygenasen als auch die Molybdän-abhängigen Dehydrogenase katalysieren eine regioselektive Hydroxylierung ihrer Substrate. Dadurch eignen sich diese Enzyme zur Synthese selektiv substituierter Verbindungen, die auf chemischem Wege nicht oder nur schwer zugänglich sind

(Bull et al., 1999; May, 1999). Durch die gezielte Veränderung ihrer katalytischen und strukturellen Eigenschaften können sie für den jeweiligen Produktionsprozeß optimiert werden (Rowan und Sanders, 1997; Arnold und Volkov, 1999; Joo et al., 1999). Die so erhaltenen Biokatalysatoren ermöglichen ein auch aus ökonomischer Sicht rentables Herstellungsverfahren.

Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit war der mikrobielle Katabolismus verschiedener aromatischer und nicht-aromatischer Heterozyklen. Neben der Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen standen die am Abbau dieser Substanzen beteiligten Enzyme im Mittelpunkt des Interesses. Insbesondere die für die initiale Umsetzung bzw. Aktivierung der Heterozyklen verantwortlichen Enzyme, die häufig eine Schlüsselrolle für den weiteren Abbauweg spielen, stellten einen Schwerpunkt der Forschungsarbeiten dar. Die thematische Gliederung der Ergebnisse basiert dementsprechend auf den jeweils identifizierten Enzymsystemen. Der erste und umfangreichste Teil der Untersuchungen befaßt sich mit dem Katabolismus dreier Heterozyklen, deren initiale Hydroxylierung von Monooxygenasen katalysiert wird. Diese Monooxygenasen unterscheiden sich bezüglich ihrer Struktur und Katalyse deutlich voneinander. Die Hydroxylierung von N-Heteroaromaten durch Molybdän-abhängige Dehydrogenasen ist Gegenstand des zweiten Teils der Arbeit. Hier werden drei einzelne Enzyme vorgestellt, die sich durch strukturelle oder katalytische Besonderheiten auszeichnen. Im dritten Teil werden Untersuchungen zum Umsatz von Tetrahydrofurfuryl-2-Alkohol vorgestellt, dessen Abbau durch eine Quinohämoprotein Alkohol-Dehydrogenase eingeleitet wird. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation der alkoholischen Seitenkette bis zur Stufe der Carbonsäure und gehört zu den bisher sehr selten gefundenen Typ 1 Quinohämoprotein-Dehydrogenasen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

1. Hydroxylierung von Heterozyklen durch Monooxygenasen

Unter aeroben Bedingungen spielen Oxygenasen eine zentrale Rolle beim Abbau natürlich vorkommender und xenobiotischer Verbindungen (Harayama et al., 1992; Mason und Cammack, 1992; Testa, 1995; Kaiser et al., 1996; Fetzner, 2000). Die gemeinsame Eigenschaft aller Oxygenasen ist die Inkorporation von molekularem Sauerstoff in das Substrat. Von den

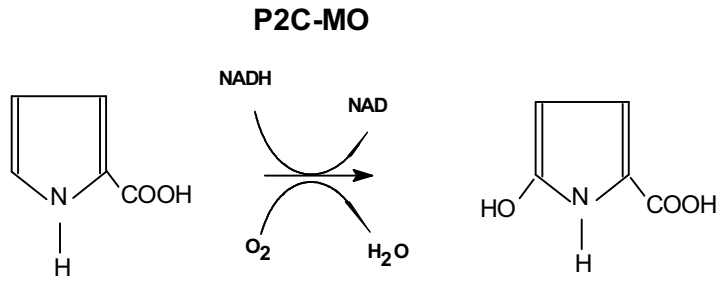
Dioxygenasen werden beide Sauerstoffatome in das Substrat eingebaut, wohingegen die Monooxygenasen das zweite Sauerstoffatom zu Wasser reduzieren. Durch die initiale Hydroxylierung werden die Substrate aktiviert und dem weiteren Abbau zugänglich gemacht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden der Abbau eines π-elektronenreichen N-Heteroaromaten und verschiedener gesättigter Heterozyklen untersucht. Die chemische Struktur dieser Verbindungen ermöglicht den elektrophilen Angriff einer Monooxygenase. In den folgenden Kapiteln werden drei sehr unterschiedliche Monooxygenasen besprochen, die für die initiale Hydroxylierung des jeweiligen Substrats verantwortlich sind. Obwohl formal gesehen alle Monooxygenasen die gleiche Reaktion katalysieren, unterscheiden sie sich sehr deutlich bezüglich Untereinheiten-Struktur, Kofaktorgehalt und Reaktionszentrum (Harayama et al., 1992). Deshalb soll diese Enzymfamilie zunächst in einem kurzen Überblick vorgestellt werden.

Grundsätzlich lassen sich die Monooxygenasen bezüglich des an der Sauerstoff-Aktivierung beteiligten Kofaktors in zwei große Gruppen einteilen: A) Die Monooxygenasen mit einem redox-aktiven organischen Kofaktor, der direkt an der Sauerstoff-Aktivierung und Substrat-Hydroxylierung beteiligt ist. Dieser Kofaktor ist in der Regel ein Flavin, nur in sehr seltenen Fällen wie bei den Aminosäure-Monooxygenasen ist er ein Pteridin (van Berkel und Müller, 1991; Harayama et al., 1992). B) Die Metall-abhängigen Monooxygenasen, die molekularen Sauerstoff über Metallatome im katalytischen Zentrum aktivieren. Abgesehen von wenigen Ausnahmen, bei denen das Metall als Kupfer oder Mangan identifiziert wurde, enthalten diese Enzyme Eisen (Harayama et al., 1992). Die Eisen-abhängigen Monooxygenasen lassen sich bezüglich der Bindung des Eisens im Enzym weiter unterteilen in die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen, die einen Häm-Kofaktor enthalten über den das Eisen komplexiert ist und die nicht-Häm-Eisen-Enzyme, bei denen das Eisen über Aminosäurereste im Protein gebunden wird. Bei letzteren können in Abhängigkeit von der Anzahl der Eisenatome im katalytischen Zentrum Enzyme mit binuklearem bzw. mononuklearem Eisenzentrum unterschieden werden (Harayama et al., 1992). Neben dem Aufbau des katalytischen Zentrums unterscheiden sich die Monooxygenasen bezüglich der am Elektronentransport beteiligten Komponenten. Von Einkomponenten-Enzymen, die ein Flavin als alleinigen Kofaktor besitzen, bis zu Sechskomponenten-Systemen, mit Flavin, Fe-S-Zentren und binuklearem Eisen als Kofaktoren sowie einem Kopplungsprotein, das keine Kofaktoren enthält, findet man eine Vielzahl unterschiedlicher Variationen.

1.1. FAD-abhängige Pyrrol-2-carboxylat-umsetzende Monooxygenasen

Der aromatische Heterozyklus Pyrrol-2-carboxylat (P2C) ist ein natürlich vorkommendes Stoffwechsel-Intermediat, das z. B. beim Abbau von 4-Hydroxyprolin, Kollagen oder Tetrapyrrol-Systemen wie Chlorophyll oder Häm entstehen kann. Die Fähigkeit, diese Verbindung als Wachstumssubstrat zu nutzen, wurde dementsprechend für verschiedene Bakterienstämme beschrieben (Adams und Frank, 1980; Evans und Venables, 1990; Hormann und Andreesen, 1991). Biochemische Untersuchungen zum P2C-Abbau lagen zu Beginn der hier vorgestellten Arbeiten allerdings nur für *Arthrobacter* sp. Py1 vor (Hormann und Andreesen, 1994). P2C wird im Gegensatz zu anderen Heteroaromaten nicht durch den nukleophilen Angriff einer Molybdän-abhängigen Dehydrogenase hydroxyliert, sondern durch den elektrophilen Angriff einer Monooxygenase, wobei 5-Hydroxy-P2C gebildet wird (Abb. 1). Aufgrund ihrer strukturellen und katalytischen Eigenschaften schien diese P2C-Monooxygenase (P2C-MO) zur großen Gruppe der "klassischen" NAD(P)H- und FAD-abhängigen Monooxygenasen zu gehören (Hormann und Andreesen, 1994). Bei diesen sehr intensiv untersuchten Proteinen handelt es sich um Einkomponenten-Systeme, die unter direkter Beteiligung des FAD-Kofaktors eine Hydroxylierung meist aromatischer Verbindungen katalysieren (Balou, 1984; Massay et al., 1988; van Berkel und Müller, 1991; Harayama et al., 1992). Die p-Hydroxybenzoat-Hydroxylase aus *Pseudomonas fluorescens* dient als Modell für diese Enzymklasse, weshalb sie zu den am besten untersuchten Redoxenzymen gehört (Wierenga et al., 1986; Schreuder et al., 1989; van Berkel und Müller, 1991; Entsch und van Berkel, 1995; Palfey et al., 1999). Studien mit diesem Enzym führten zur Entdeckung des konservierten, N-terminalen G-X-G-X-X-G-Motivs, das innerhalb einer βαβ-Rossmann-Struktur liegt und an der Bindung des FAD beteiligt ist (Wierenga et al., 1986). Durch Vergleiche der Aminosäuresequenzen verschiedener Flavin-abhängiger Monooxygenasen konnten weitere konservierte Motive identifiziert werden, für die ebenfalls eine Beteiligung an der Bindung des FAD bzw. NAD(P)H postuliert wird (Eggink et al., 1990; Eppink et al., 1997).



Pyrrol-2-carboxylat **5-Hydroxypyrrol-2-carboxylat**

Abb. 1: Initiale Hydroxylierung von P2C durch die P2C-MO aus *Rhodococcus* sp. Sedi2 bzw. *Arthrobacter* sp. Py1.

Eine gemeinsame Eigenschaft der Flavin-abhängigen Monooxygenasen ist ihre NAD(P)H-Oxidase-Aktivität, wobei es zu einem unkontrollierten Verbrauch von Reduktionsäquivalenten kommt. Die Kopplung von Substratbindung und NAD(P)H-Oxidation stellt einen Schutzmechanismus gegen diese Reaktion dar. Bei Untersuchungen der p-Hydroxybenzoat-Hydroxylase konnte gezeigt werden, dass sich das FAD während der Katalyse offenbar im Enzym bewegt (van Bolt et al., 1996; Palfey et al., 1999). Nur in Gegenwart eines Substrats und NADPH wandert das FAD von einer "geschützten" Position im Innern des Proteins an die Oberfläche. Hier kann es dann reduziert werden, was die Hydroxylierung des Substrats zur Folge hat. Das Substrat ist also das "Passwort" für den Fortgang der Katalyse.

Auch *Rhodococcus* sp. Sedi2 (DSM 44237) ist in der Lage, mit P2C als alleiniger Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle zu wachsen (Hormann und Andreesen, 1991). Wie bei Stamm Py1 wird der Abbau durch eine Monooxygenase eingeleitet, und 5-Hydroxy-P2C entsteht als primäres Reaktionsprodukt (Abb. 1). Schon bei der Aufreinigung zeigte sich jedoch, dass diese P2C-MO aus zwei Komponenten besteht (Becker et al., 1997a+b) und damit nicht zu den "klassischen" Flavin-abhängigen Monooxygenasen gehört. Die homogenen Komponenten hatten ein Molekulargewicht von 18,7 bzw. 54 kDa und wurden aufgrund ihrer im folgenden beschriebenen Eigenschaften als Reduktase bzw. Oxygenase bezeichnet. Die kleine Reduktase-Komponente (PycB) katalysiert die FAD- und NADH-abhängige Reduktion von Cytochrom c und konnte auf diese Weise detektiert werden. Für die große Oxygenase-Komponente (PycA) war nach der Isolierung keine eigene katalytische Aktivität meßbar (Becker et al., 1997a+b). Ein Sauerstoff- und NADH-abhängiger Umsatz von P2C konnte nur beobachtet werden, wenn beide Enzymkomponenten und FAD im Reaktionsansatz vorhanden

waren. PycA konnte somit über eine Komplementierung nachgewiesen werden. Für keine der beiden Komponenten war nach ihrer Isolierung ein Flavin-Kofaktor nachweisbar, obwohl dieser für die Hydroxylierung des Substrats benötigt wurde. Dies deutete auf eine extrem schwache Bindung des FAD unter *in vitro* Bedingungen hin. Die weitere Analyse zeigte, dass es sich bei PycB offenbar um eine NADH:FAD-Oxidoreduktase handelt, da das Enzym in der Lage war, eine P2C-unabhängige Reduktion von freiem FAD zu katalysieren. Ein 26,2 kDa großes als Fre bezeichnetes Protein katalysiert in *E. coli* eine analoge Reaktion, wobei die physiologische Bedeutung bisher noch nicht geklärt wurde (Nivière et al., 1999). Die NADH-Oxidase-Aktivität von PycB resultierte unter aeroben Bedingungen, in Gegenwart von FAD und NADH, in einem P2C-unabhängigen Sauerstoffverbrauch, wobei H_2O_2 gebildet wurde (Becker et al., 1997b). Ein völlig anderes Bild ergab sich, wenn unter sonst gleichen Bedingungen, PycA dem Reaktionsansatz zugefügt wurde. Bei einer Abnahme der relativen Menge an gebildetem H_2O_2 stieg der Substrat-spezifische Sauerstoffverbrauch proportional zur eingesetzten PycA-Konzentration an. Bei einem 5-fachen Überschuß von PycA konnte die H_2O_2-Bildung fast vollständig unterdrückt werden, was gleichzeitig zu einem deutlich erhöhten P2C-Umsatz führte (Becker et al., 1997b). Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass PycA und PycB für die Hydroxylierung des Substrats absolut notwendig sind. Offen blieb aber die Frage, welche genaue Funktion die Komponenten bei der Enzymkatalyse haben. PycA scheint in jedem Falle an der eigentlichen Hydroxylierungsreaktion beteiligt zu sein. Im Vergleich zu PycA war die Konzentration von PycB im Rohextrakt wesentlich geringer (Verhältnis ca. 10:1), was bedeuten könnte, dass PycB an der Substrathydroxylierung nicht beteiligt ist, sondern lediglich reduziertes FAD für PycA zur Verfügung stellt. PycA sollte dann auch in Gegenwart von chemisch reduziertem FAD eine Hydroxylierung von P2C katalysieren können. Damit wäre FAD nicht der Kofaktor sondern das Substrat von PycB und das Enzym wäre somit kein Flavoprotein.

Ein Vergleich der 30 N-terminalen Aminosäuren der Einkomponenten-P2C-MO aus *Arthrobacter* Py1 mit PycA, ergab eine Identität von 60 %. Dies kann als weiteres Indiz dafür gesehen werden, dass PycA für die Hydroxylierung des Substrats verantwortlich ist. Bei einer Datenbank-Analyse der beiden Sequenzen wurden die größten Übereinstimmungen mit verschiedenen Flavin-abhängigen Ein- und Zweikomponenten-Monooxygenasen gefunden, worunter sich auch einige Chlorphenol-umsetzende Enzyme befanden (siehe unten). Die Sequenzen von vier internen Peptiden aus PycB hatten -wenn auch geringe- Ähnlichkeiten zu

den entsprechenden Sequenzen der kleinen Untereinheit verschiedener Flavin-abhängiger Zweikomponenten-Monooxygenasen (Becker et al., 1997b).

Im Gegensatz zu den schon sehr lange bekannten, "klassischen", FAD-abhängigen Einkomponenten Monooxygenasen, sind die Zweikomponenten-Enzyme erst vor relativ kurzer Zeit entdeckt worden. Im folgenden soll diese Enzymklasse deshalb in einem kurzen Überblick vorgestellt werden. Das erste beschriebene Enzym dieser Familie war die 4-Hydroxyphenylacetat-3-Monooxygenase (4-HPA-MO) aus *P. putida* (Arunachalam et al., 1992; 1994; Arunachalam und Massay, 1994). Später wurden mit der 4-HPA-MO aus *E. coli*, der 2,4,6-Trichlorphenol-4-Dechlorinase aus *Burkholderia pickettii* DTP0602, der Chlorophenol-4-Monooxygenase (CP-4-MO) aus *Burkholdria cepacia* AC1100, der Styren-Monooxygenase aus Pseudomonaden und der Phenol-Hydroxylase aus *Bacillus thermoglucosidasius* A7 weitere Vertreter gefunden (Prieto und Garcia, 1994; Takizawa et al., 1995; Xun, 1996; Beltrametti et al., 1997; Hübner et al., 1998; Velasco et al., 1998; Duffner et al., 2000). Mit Ausnahme der 4-HPA-MO aus *P. putida*, deren Untereinheiten etwa gleich groß sind, bestehen alle diese Enzyme aus einer ca. 20 kDa und einer 50-60 kDa großen Komponente, wobei letztere als die eigentliche Oxygenase identifiziert wurde. Abhängig von den ermittelten katalytischen Eigenschaften der kleineren Komponenten wurden ihr unterschiedliche Funktionen zugeordnet. Eine Kopplungsfunktion analog zum Protein B der Methan-Monooxygenase wurde z. B. für die 4-HPA-MO aus *P. putida*, die 2,4,6-Trichlorphenol-4-Dechlorinase aus *B. pickettii* und die Styren-Monooxygenase aus *P. fluorescens* angenommen (Arunachalam et al., 1992; 1994; Arunachalam und Massay, 1994; Liu et al., 1995; Takizawa et al., 1995; Beltrametti et al., 1997). Die zweite Komponente wäre somit für die Kopplung von NAD(P)H-Oxidation und Substrat-Hydroxylierung verantwortlich und nicht direkt am Elektronenfluß beteiligt. Ein völlig anderes Bild ergab sich für die 4-HPA-MO aus *E. coli* und die CP-4-MO aus *B. cepacia*. Bei beiden Enzymen hatte die kleine Komponente eine FAD-abhängige Cytochrom c-Reduktase- und NADH-Oxidase-Aktivität (Xun 1996, Galán et al., 2000; Xun und Sandvik, 2000). Die 4-HPA-MO ist bisher die einzige Zweikomponenten-Monooxygenase, die genauer untersucht wurde. Eine detaillierte Charakterisierung beider Komponenten dieses Enzyms führte zu folgenden Ergebnissen: 1.) Die kleine Komponente (HpaC) ist eine Flavin:NAD(P)H-Oxidoreductase, die Flavine als Substrate reduziert. 2.) Das gebildete $FADH_2$ wird von der große Komponente (HpaB) unter gleichzeitiger Hydroxylierung des Substrats reoxidiert. Damit ist HpaB die erste beschriebene Monooxygenase, die freies $FADH_2$-verwertet. 3.) Eine direkte Interaktion beider

Komponenten ist für die Katalyse nicht notwendig, und die Funktion von HpaC kann auch von anderen Reduktasen übernommen werden. 4.) HpaB und HpaC sind somit laut Definition keine Flavoproteine (Galán et al., 2000, Xun und Sandvik, 2000). Diese Eigenschaften sind denen verschiedener Monooxygenasen, die freies $FMNH_2$ verwerten, sehr ähnlich. Zu diesen Enzymen gehören z. B. die Pristinamycin-II_A-Synthase aus *Streptomyces pristinaespiralis* oder die Nitrilotriacetat-Monooxygenase aus *Chelatobacter heintzii* (Uetz et al., 1992; Blanc et al., 1995; Thibaut et al., 1995). Allerdings setzen diese FMN-abhängigen Monooxygenasen ausschließlich nicht-aromatische Substrate um und unterscheiden sich auch bezüglich ihrer Struktur von den FAD-abhängigen Proteinen.

Vergleicht man die P2C-MO aus *Rhodococcus* sp. Sedi2 mit anderen FAD-abhängigen Zweikomponenten-Monooxygenasen, so stimmen alle wesentlichen Eigenschaften des Enzyms mit denen der 4-HPA-MO aus *E. coli* überein. Dementsprechend sollte die Hydroxylierung von P2C nach dem in Abb. 2 dargestellten Reaktionsschema verlaufen. PycB ist für die Katalyse die NADH-abhängige Reduktion von FAD verantwortlich. In Gegenwart von Sauerstoff katalysiert PycA dann unter Reoxidation des freien $FADH_2$ die Hydroxylierung von P2C.

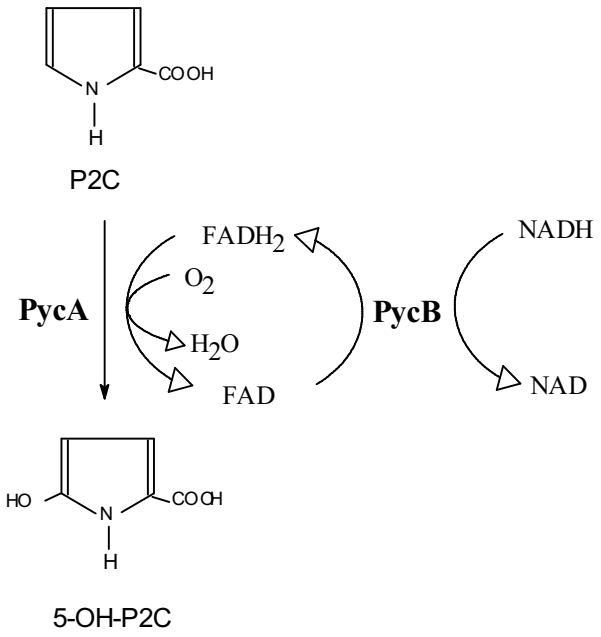


Abb. 2: Postuliertes Reaktionsschema für die Hydroxylierung von P2C durch die beiden Komponenten der P2C-MO aus *Rhodococcus* sp. Sedi2.

Einige Substrate der Zweikomponenten-Monooxygenasen werden von anderen Bakterien durch Einkomponenten-Enzyme umgesetzt. Beispiele hierfür sind die Phenol-Hydroxylase aus *Bacillus thermoleovorans* A2, die 2,4,6-Trichlorphenol-4-Monooxygenase aus *Azotobacter* sp. GP1 und die beschrieben P2C-MO aus *Arthrobacter* sp. Py1 (Hormann und Andreesen, 1994; Wieser et al., 1997; Duffner und Müller, 1998). Mit einem Molekulargewicht von 60 kDa haben diese Proteine etwa die gleiche Größe wie die Hydroxylase-Komponente der Zweikomponenten-Monooxygenasen, und auch die Primärstrukturen der Proteine zeigen untereinander signifikante Homologien (Becker et al., 1997b; Duffner und Müller, 1998; Duffner et al., 2000; Galán et al., 2000). Die an der FAD- bzw. NADH-Bindung beteiligten konservierten Sequenzmotive der "klassischen" Flavin-abhängigen Monooxygenasen, konnten weder bei den Ein-, noch bei den Zweikomponenten-Enzymen gefunden werden (Prieto und Garcia, 1994; Duffner und Müller, 1998; Duffner et al., 2000; Galán et al., 2000). Aus diesen Ergebnissen ergaben sich folgende Fragestellungen: 1.) Warum wird das gleiche Substrat in einem Organismus von einem Ein- und in einem anderen von einem Zweikomponenten-Enzym umgesetzt? 2.) Wie erfolgt die Interaktion mit den für die Katalyse benötigten Dinukleotiden FAD und NADH? 3.) Welche verwandtschaftliche und evolutionäre Beziehung besteht zwischen diesen Enzymen und den "klassischen" Flavin-abhängigen Monooxygenasen?

Die beiden P2C-MOs aus *Arthrobacter* sp. Py1 bzw. *Rhodococcus* sp. Sedi2 repräsentieren jeweils einen Vertreter aus der Gruppe der Ein- bzw. Zweikomponenten-Enzyme. Die Phenol-Hydroxylase aus *B. thermoleovorans* ist der bisher einzige sequenzierte Vertreter der Einkomponenten-Enzyme (Duffner und Müller, 1998). Ein Sequenzvergleich der beiden P2C-MOs untereinander und mit anderen Proteinen könnte wichtige Informationen zur Struktur- und Verwandtschaftsbeziehung dieser Enzyme liefern. Deshalb wurden die Strukturgene beider P2C-MOs kloniert und sequenziert. Für das Enzym aus *Rhodococcus* sp. Sedi2 konnte das PycA kodierende Gen (*pycA*) kürzlich vollständig sequenziert werden (C. Schmitz, unveröffentlichte Daten). Das für PycB kodierende Gen (*pycB*) wurde ebenfalls identifiziert und bisher teilweise sequenziert. Im Gegensatz zu den Genen anderer Zweikomponenten-Monooxygenasen liegen *pycA* und *pycB* nicht in einem Gen-Cluster (C. Schmitz, unveröffentlichte Daten). Die abgeleitete vollständige Aminosäuresequenz von PycA wies mit 35 % Identität die höchsten Homologien zu HpaB aus *E. coli* und den Ein- bzw. Zweikomponenten Phenol-Hydroxylasen aus *B. thermoleovorans* bzw. *B. thermoglucosidasius* auf. Bei einer Datenbankanalyse der abgeleiteten PycB Teilsequenz (88 Aminosäuren) wurden

die mit Abstand größten Homologien (50 % Identität) zu der kleinen Untereinheit der Phenol-Hydroxylase aus *B. thermoglucosidasius* gefunden. Das Strukturgen der P2C-MO aus *Arthrobacter* sp. Py1 konnte inzwischen ebenfalls kloniert werden (T. Wolsch, unveröffentlichte Daten). Eine vollständige Sequenz liegt hier momentan aber noch nicht vor. Im Bereich der bestimmten Teilsequenz von 270 Aminosäuren besteht eine Identität von 68 % zwischen PycA und der P2C-MO aus *Arthrobacter* sp. Py1. Da beide Enzyme das gleiche Substrat umsetzen, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. Aufgrund der unterschiedlichen Katalyse-Mechanismen der beiden Proteine, sollten jedoch auch signifikante Abweichungen in ihrer Primärstuktur vorhanden sein. Die weitere Analyse der vollständigen Aminosäuresequenz wird darüber Aufschluss geben.

1.2. Abbau von Morpholin durch *Mycobacterium* sp. HE5

Morpholin ist ein xenobiotischer Heterozyklus, der sowohl zu den Ethern als auch zu den sekundären Aminen gehört (Abb. 3). Aufgrund der daraus resultierenden Eigenschaften wird diese Verbindung in der chemischen Industrie für unterschiedlichste Zwecke eingesetzt. Sie dient als Lösungsmittel, Antikorrosionsmittel, Zusatz bei der Gummiherstellung und Synthesebaustein bei der Produktion von Pharmaka und Pestiziden (Mijos, 1978; Anon, 1989). Das über die Abwässer in die Umwelt gelangende Morpholin kann chemisch oder biologisch zum karzinogenen N-Nitrosomorpholin umgesetzt werden (Enzmann et al., 1995). Eine Dekontamination solcher Abwässer ist somit aus ökologischen und medizinischen Gründen notwendig.

Die bisher beschriebenen Morpholin-verwertenden Bakterien gehören mit wenigen Ausnahmen zur Gattung *Mycobacterium* (Knapp et al., 1982; Cech et al., 1988; Poupin et al., 1998, 1999b). Eine gemeinsame Eigenschaft aller bekannten Morpholin-abbauenden Kulturen ist die niedrige Wachstumsrate, weshalb sie für einen biotechnologischen Einsatz nur bedingt geeignet erscheinen (Cech et al., 1988; Knapp und Brown, 1988; Mazure und Truffaut, 1994; Poupin et al., 1996, 1998). Obwohl bereits verschiedene Wege für den Morpholin-Katabolismus vorgeschlagen wurden, gab es zu Beginn der hier vorgestellten Arbeiten keine konkreten Informationen über die am Abbau beteiligten Enzyme (Bernhardt und Diekmann, 1991; Swain et al., 1991; Mazure und Truffaut, 1994). Das Ziel der in den folgenden Kapiteln zusammengefaßten Untersuchungen bestand somit zunächst darin, eine Reinkultur zu isolieren, die Morpholin mit hoher Rate abbaut und damit die Voraussetzungen für einen *in*

situ Einsatz zur Dekontamination von Abwässern mitbringt. Weiterhin sollte das Enzym isoliert und charakterisiert werden, welches den initialen Angriff auf den Morpholin-Ring katalysiert. Damit ließe sich die Frage klären, ob die Öffnung des Ring-Systems am N- oder O-Atom erfolgt.

1.2.1. Isolierung und Charakterisierung einer Morpholin-abbauenden Reinkultur

Zur Isolierung Morpholin-abbauender Organismen wurden Mineralmedien, die 20 mM Morpholin als einzige Kohlenstoff-, Sickstoff- und Energiequelle enthielten, mit unterschiedlichen Bodenproben beimpft. Auf diese Weise konnte ein orange gefärbtes, stäbchenförmiges, Gram-positives Bakterium mit einem G+C-Gehalt von 69 % in Reinkultur isoliert werden, das als Stamm HE5 bezeichnet wurde (DSM 44238). Mittels chemotaxonomischer Untersuchungen und einer Analyse der 16S rRNA Sequenz konnte Stamm HE5 als Mitglied der Gattung *Mycobacterium* identifiziert werden. Mit 99,4, 98,7 und 98,3 % Identität bestanden die größten Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Sequenzen der schnell wachsenden Mycobakterien *M. gilvum, M. parafortuitum und M. chlorophenolicum* (Schräder et al., 2000). Trotz der sehr hohen Homologie zwischen der 16S rRNA Sequenz von *Mycobacterium* sp. HE5 und *M. gilvum*, deuteten wachstumsphysiologische Untersuchungen darauf hin, dass es sich um zwei verschiedene Arten handeln könnte. So war der gelbe *M. gilvum* Typstamm (DSM 44245) nicht in der Lage, die zyklischen Amine Morpholin, Piperidin und Pyrrolidin zu verwerten. Im Gegensatz zu *Mycobacterium* sp. HE5, das sehr gut auf L-Alanin wuchs und dabei eine aktive L-Alanin Dehydrogenase exprimierte, konnte *M. gilvum* auch dieses Substrat nicht verwerten (siehe Kapitel 1.2.2.). Aus den erhaltenen Ergebnissen konnte ebenfalls geschlossen werden, dass es sich bei *Mycobacterium* sp. HE5 nicht um einen der bereits bekannten Morpholinverwerter handelt. Diese als MO1, MorG bzw. RP1 bezeichneten *Mycobacterium* Stämme zeigten die größten Ähnlichkeiten zu *M. aurum*, *M. chelonae* bzw. *M. chlorophenolicum* (Cech et al., 1988, Combourieu et al., 1998; Poupin et al., 1998). Ob Stamm HE5 eine neue Art der Gattung *Mycobacterium* ist, kann erst durch DNA-DNA-Homologiestudien endgültig geklärt werden.

Die maximale Wachstumsrate von *Mycobacterium* sp. HE5 wurde mit 0,17 h^{-1} bei einer Morpholinkonzentration von 30 mM, pH 7,2 und 30 °C ermittelt. Dieser Wert lag um den Faktor 2 bis 3 über den Wachstumsraten anderer Morpholinverwerter (Schräder et al., 2000). Unter diesen Bedingungen wurde Morpholin mit einer Rate von 0,84 mmol (Gramm

Trockengewicht)$^{-1}$ abgebaut. Obwohl die Wachstumsrate bei steigender Substratkonzentration abnahm, konnte Stamm HE5 auch in Gegenwart von 100 mM Morpholin noch wachsen und baute 70 % des eingesetzen Substrates ab. Neben Morpholin wurden auch die strukturell verwandten zyklischen Amine Piperidin und Pyrrolidin von Stamm HE5 als Wachstumssubstrate verwertet, was eine allgemeine Eigenschaft der bisher beschriebenen Morpholinverwerter zu sein scheint (Mazure und Truffaut, 1994; Poupin et al., 1998). Die Fähigkeit zum Abbau der drei zyklischen Amine war bei *Mycobacterium* sp. HE5 nicht konstitutiv vorhanden. Interessanter Weise wurde der Pyrrolidin-Abbau aber auch durch Morpholin und Piperidin induziert. Umgekehrt erfolgte keine Induktion des Morpholin- bzw. Piperidin-Abbaus durch Pyrrolidin (Schräder et al., 2000). N-substituierte Morpholinderivate, 2-Morpholinoethanol und Piperazin, wurden von Stamm HE5 nicht verwertet. Wachstum konnte hingegen auf verschiedenen Carbon- und Aminosäuren sowie auf den postulierten Intermediaten des Morpholin Katabolismus Glykolat und Glyoxylat beobachtet werden (Abb. 3). Der Abbau der beiden C_2-Säuren erfolgte bei vorherigem Wachstum auf Morpholin ohne lag-Phase. Sie könnten damit also auch bei *Mycobacterium* sp. HE5 Intermediate des Morpholin-Abbaus sein. Ethanolamin, ein weiteres postuliertes Intermediat des Morpholin-Abbaus (Swain et al., 1991), wurde von Stamm HE5 erst nach einer lag-Phase von mehr als 50 h abgebaut, was darauf hindeutet, dass diese Verbindung bei Stamm HE5 wahrscheinlich nicht als Zwischenprodukt gebildet wird (Schräder et al., 2000). Der Abbau von 2-(2-Aminoethoxy)acetat sowie des entsprechenden Aldehyds, der als primäres Produkt der Ringspaltung am N-Atom postuliert wird (Abb. 3; Poupin et al., 1998), konnte nicht untersucht werden, da diese Substanzen kommerziell nicht verfügbar sind. Diglykolat wurde kürzlich durch Ionenspray-Massenspektrometrie als Intermediat des Morpholin Katabolismus in *Mycobacterium* sp. MO1 nachgewiesen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Organismus dieses Substrat vollständig abbaut (Combourieu et al., 2000). Im Gegensatz dazu war Stamm HE5 nicht in der Lage, Diglykolat als Wachstumssubstrat zu nutzen (B. Sielaff, unveröffentlichte Daten). Der Stamm baut Morpholin also entweder über einen anderen Weg ab oder er kann das doppelt geladene Diglykolat nicht in die Zelle aufzunehmen. Der Abbau von Morpholin könnte bei *Mycobacterium* sp. HE5 also durchaus über Diglykolat verlaufen. Bei der Spaltung dieses symmetrischen Ethers durch eine Oxygenase könnten dann Glykolat und Glyoxylat entstehen, während Ethanolamin in diesem Falle nicht als Intermedat gebildet wird (Abb. 3).

Faßt man die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse zusammen, so wurde mit *Mycobacterium* sp. HE5 erstmals ein Morpholinverwerter isoliert, der aufgrund seiner deutlich höheren Wachstumsraten und der ausgeprägten Toleranz gegenüber dem Lösungsmittel das Potential für einen *in situ* Einsatz zur Abwasserreinigung besitzt. Die taxonomischen Daten lassen vermuten, dass es sich bei diesem Bakterium um eine neue Art der schnell wachsenden Mycobakterien handeln könnte. Die wachstumsphysiologischen Untersuchungen sowie die unter 1.2.3. beschriebenen enzymatischen Analysen legen den Schluß nahe, dass *Mycobacterium* sp. HE5 Morpholin über den gleichen Weg wie *Mycobacterium* sp. MO1 abbaut.

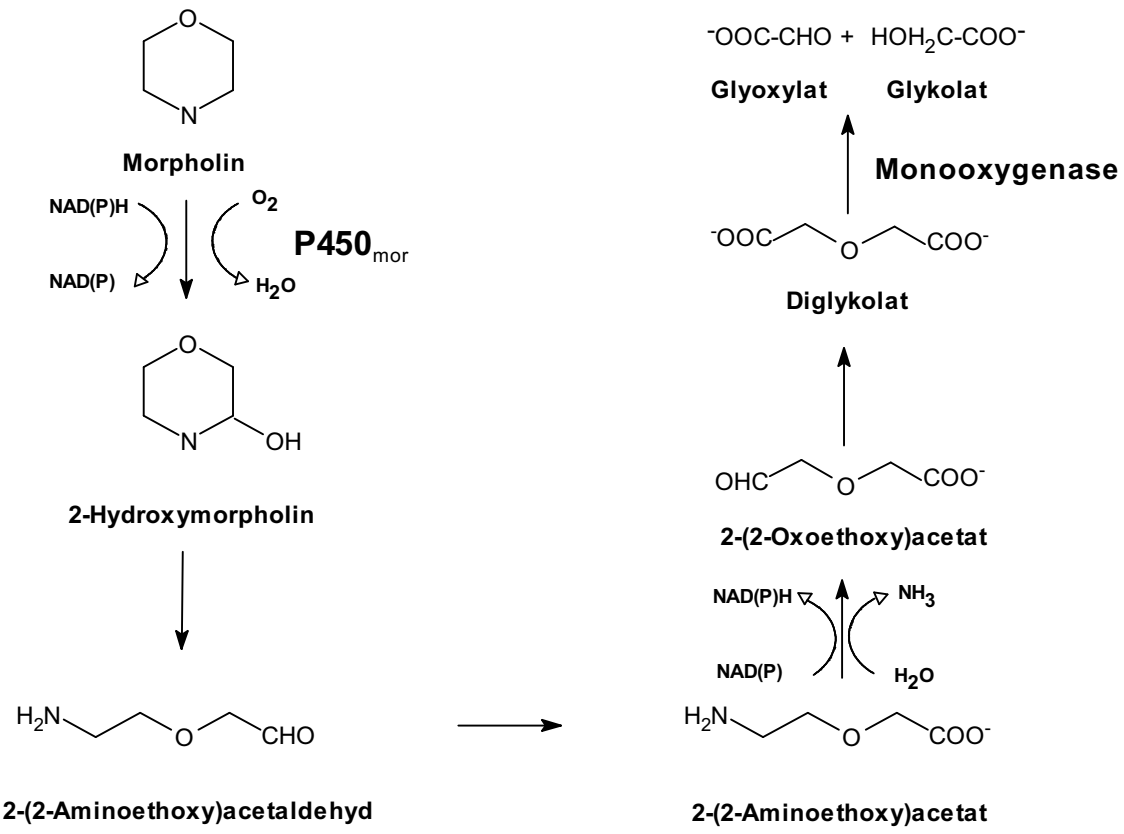


Abb. 3: Postulierter Abbauweg von Morpholin durch *Mycobacterium* sp. MO1 (modifiziert nach Combourieu et al., 2000). Die Intermediate 2-(2-Aminoethoxy)acetat, Diglykolat und Glykolat konnten beim Wachstum auf Morpholin nachgewiesen werden. Für die initiale Hydroxylierung des Substrats wird eine Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase-Reaktion ($P450_{mor}$) postuliert (siehe Kapitel 1.2.3.).

1.2.2. Funktion der L-Alanin Dehydrogenase beim Wachstum von *Mycobacterium* sp. HE5 auf Morpholin

Für die initiale Oxidation von Morpholin läßt sich sowohl eine Oxygenase- als auch eine Dehydrogenase-Reaktion postulieren, wobei in beiden Fällen 2-Hydroxy-Morpholin als Produkt entstehen würde. Analog zum Abbau von Pyrrolidin durch *Pseudomonas fluorescens* (Jacoby und Fredericks, 1959) wurde für *Mycobacterium* sp. MorG vorgeschlagen, dass eine Dehydrogenase den Abbau von Morpholin und Pyrrolidin einleitet (Swain et al., 1991). Eine entsprechende Enzymaktivität konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Nach dem Wachstum von *Mycobacterium* sp. HE5 auf Morpholin, Pyrrolidin und Piperidin konnte in den entsprechenden Extrakten eine Reduktion von NAD beobachtet werden, die sich durch die Zugabe von Morpholin deutlich stimulieren ließ (Schuffenhauer et al., 1999). Da diese Aktivität in Extrakten von Glukose- oder Succinat-gewachsenen Zellen nicht nachweisbar war, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei dem entsprechenden Enzym um eine Morpholin-Dehydrogenase handeln könnte. Die postulierte Dehydrogenase wäre somit bezüglich der katalysierten Reaktion ein der Prolin-Dehydrogenase aus *E. coli* analoges Enzym (Xia et al. 1995). Um diese Vermutung zu überprüfen, sollte das Enzym aus Morpholin-gewachsenen Zellen isoliert werden. Nach der chromatographischen Trennung der Extrakte, konnte die Aktivität erst durch die Vereinigung zweier Fraktionen rekonstituiert werden (Schuffenhauer et al., 1999). Durch eine weitere Analyse beider Fraktionen konnte die eine Komponente als Protein und die zweite Komponente als L-Alanin identifiziert werden. Die Konzentration von L-Alanin in Extrakten aus Morpholin-gewachsenen Zellen betrug ca. 0.25 mM. Somit lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der Protein-Komponente um eine L-Alanin-Dehydrogenase handeln könnte, die offenbar durch Morpholin stimuliert wurde. Diese Annahme konnte durch die Charakterisierung des Enzyms sowie den Nachweis der Enzymaktivität in L-Alanin-gewachsenen Zellen bestätigt werden (Schuffenhauer et al., 1999). Das isolierte Protein bestand aus vier identischen Untereinheiten mit einem Molekuargewicht von 41 kDa. Der N-Terminus des gereinigten Proteins hatte die höchsten Sequenzhomologien zu L-Alanin-Dehydrogenasen aus *Mycobacterium tuberculosis* und verschiedenen Bacilli (Kuroda et al., 1990; Andersen et al., 1992; Jaacks Siranosian et al., 1993). L-Alanin war das einzige Substrat, das oxidativ deaminiert wurde, wohingegen Glyoxylat, Pyruvat, 2-Oxobutyrat und Oxalacetat als Substrate für die reduktive Aminierung genutzt werden konnten. Keine Aktivität wurde mit den zyklischen Aminen Morpholin, Pyrrolidin oder Piperidin gemessen.

Sehr ungewöhnlich war aber die Beobachtung, dass die L-Alanin-Dehydrogenase-Aktivität durch Morpholin deutlich stimuliert wurde (Schuffenhauer et al., 1999). Dieser Effekt trat jedoch erst dann auf, wenn die eingesetze L-Alanin-Konzentration unterhalb des für dieses Substrat bestimmten K_m-Wertes lag und verstärkte sich bei abnehmender Konzentration. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Zugabe von Morpholin zu einer Absenkung des K_m-Wertes führte. So verringerte sich der K_m-Wert für L-Alanin in Gegenwart von 50 mM Morpholin ca. um den Faktor drei. Der in Rohextrakten beobachtete Einfluß von Morpholin auf die NAD-Reduktion beruht somit auf einer Stimulierung der L-Alanin-Dehydrogenase-Aktivität.

Eine mögliche Funktion der L-Alanin-Dehydrogenase in *Mycobacterium* sp. HE5 könnte die Assimilation von Ammonium beim Wachstum auf N-haltigen Substraten sein. Die beobachtete deutliche Stimulation der Enzymaktivität durch Ammonium unterstützte diese Hypothese (Schuffenhauer et al., 1999). Beim Wachstum von *Mycobacterium* sp. HE5 auf Morpholin konnten nur 50 % des theoretisch zu erwartenden Ammoniums wiedergefunden werden (Schräder et al., 2000). In Gegenwart hoher Ammonium-Konzentrationen ist die Glutamat-Dehydrogenase in der Regel für die Assimilation verantwortlich (Tyler, 1978). Eine solche Enzymaktivität konnte im Gegensatz zu *Mycobacterium smegmatis* in *Mycobacterium* sp. HE5 unabhängig von den Wachstumsbedingungen nicht nachgewiesen werden (Sarada et al., 1980; Schuffenhauer et al., 1999). Bei anderen Bakterien, die ebenfalls nicht über eine Glutamat-Dehydrogenase verfügen, konnte gezeigt werden, dass deren Funktion durch die L-Alanin-Dehydrogenase übernommen werden kann (Aharonowitz und Friedrich, 1980; Cacciari et al., 1986). Eine solche Funktion der L-Alanin-Dehydrogenase könnte somit auch für *Mycobacterium* sp. HE5 angenommen werden. Bei niedrigen Konzentrationen wird Ammonium gewöhnlich durch eine Glutamin-Synthetase assimiliert. Dies scheint auch bei *Mycobacterium* sp. HE5 der Fall zu sein, da eine entsprechende Aktivität in allen untersuchten Extrakten gemessen werden konnte. Allerdings war die Glutamin-Synthetase-Aktivität nach dem Wachstum auf N-freien Substraten 4-fach höher als in Morpholin-, Pyrrolidin- oder Piperidin-gewachsenen Zellen. Wie bei anderen Glutamin-Synthetasen ist dies wahrscheinlich auf die Hemmung der Enzymaktivität in Gegenwart hoher Ammonium- oder L-Alanin-Konzentrationen zurückzuführen (Alvarez und McCarthy, 1984; Patterson und Hespell, 1985).

Die L-Alanin-Dehydrogenase-Aktivität scheint in *Mycobacterium* sp. HE5 offenbar auf unterschiedlichen Ebenen reguliert zu werden: 1.) Beim Wachstum auf Pyruvat war keine Aktivität meßbar, obwohl dieses Substrat vom Enzym umgesetzt wird. 2.) Die Deaminierung

von L-Alanin wird bei geringen Konzentrationen durch Morpholin stimuliert und Ammonium hat ebenfalls einen positiven Einfluß auf diese Aktivität. 3.) Es wurden zwei Isoenzyme nachgewiesen, die sich bezüglich ihrer isoelektrischen Punkte deutlich unterschieden (Schuffenhauer et al., 1999). Wie bei anderen Bakterien könnte die L-Alanin-Dehydrogenase als Bindeglied zwischen C- und N-Stoffwechsel fungieren (McCowen und Phibbs, 1974; Sawa et al., 1995), was eine komplexe Regulation notwendig erscheinen läßt. In Bezug auf den Morpholin-Katabolismus ist eine solche Verbindung von C- und N-Stoffwechsel dadurch gegeben, dass die L-Alanin-Dehydrogenase das postulierte Intermediat Glyoxylat reduktiv zum Glycin aminieren kann. Dieses könnte dann über Serin und Pyruvat in die Glukoneogenese einfließen.

Wie bereits erwähnt, wurde Diglykolat als Intermediat beim Morpholin-Abbau durch *Mycobacterium* sp. MO1 nachgewiesen (Combourieu et al., 2000). Dieses Ergebnis widerspricht der früheren Hypothese, dass nach der Spaltung der C-N-Bindung eine Etherspaltung unter Bildung von Ethanolamin und Glyoxylat bzw. 2-Aminoacetaldehyd und Glykolat erfolgt (Swain et al., 1991). Vielmehr müßte das primäre Spaltprodukt 2-(2-Aminoethoxy)acetaldehyd zur entsprechenden Carbonsäure oxidiert und anschließend oxidativ deaminiert werden (Abb. 3). Aus dem Reaktionsprodukt 2-(2-Oxoethoxy)acetat könnte dann durch einen weiteren Oxidationsschritt Diglykolat entstehen. Analoge Intermediate ohne Etherbindung wären auch für den Abbau von Pyrrolidin und Piperidin zu fordern. Sollte dieser Abbauweg auch für *Mycobacterium* sp. HE5 zutreffen, könnte die L-Alanin-Dehydrogenase direkt an der oxidativen Deaminierung der primären Spaltprodukte beteiligt sein. Zur Prüfung dieser Hypothese ist es notwendig, das Substratspektrum der L-Alanin-Dehydrogenase erneut zu untersuchen. Bei der Akkumulation von Ammonium im Medium könnte die L-Alanin-Dehydrogenase auch für die Bildung von L-Alanin als Endprodukt des Morpholin-Stoffwechsels verantwortlich sein.

Die dargestellten Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass die L-Alanin-Dehydrogenase, auch wenn ihre genaue physiologische Funktion noch nicht geklärt werden konnte, beim Wachstum von *Mycobacterium* sp. HE5 auf Morpholin eine wichtige Rolle im Zellstoffwechsel spielt.

1.2.3. Identifizierung und Charakterisierung der P450-abhängigen Morpholin-Monooxygenase

Mehrfache Versuche, eine Morpholin-umsetzende Enzym-Aktivität in Rohextrakten von *Mycobacterium* sp. HE5 zu detektieren, führten trotz Variation aller Parameter im Enzymtest und beim Zellaufschluß zu keinem Ergebnis (Schräder et al., 2000; Sielaff et al., 2001). Aus diesem Grund wurde der Morpholin-Umsatz durch ruhende und permeabilisierte Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen nur in Gegenwart von Sauerstoff in der Lage waren, Morpholin mit signifikanter Rate umzusetzen (Schräder et al., 2000). Dies war ein erster Hinweis auf eine Oxygenase als einleitendes Enzym des Morpholin-Abbaus. Mittels CO-Differenzspektren wurde in Morpholin-gewachsenen Zellen von *Mycobacterium* HE5 ein spezifisch exprimiertes Cytochrom P450 nachgewiesen (Sielaff et al., 2001). Eine signifikante Hemmung des Wachstums in Gegenwart des P450-spezifischen Inhibitors Metyrapon (Testa und Jenner, 1981) legte die Vermutung nahe, dass dieses Cytochrom P450 am Morpholin-Abbau beteiligt ist (Sielaff et al., 2001). Nur das Wachstum auf Morpholin, Pyrrolidin und Piperidin wurde durch Metyrapon deutlich gehemmt, und ein Cytochrom P450 war, wie auch bei anderen Mycobakterien, nur nach dem Wachstum auf diesen Substraten nachweisbar (Poupin et al., 1999b; Schräder et al., 2000). Daraus wurde geschlossen, dass in *Mycobacterium* sp. HE5 eine P450-abhängige Monooxygenase in den Abbau der drei zyklischen Amine involviert ist. Da eine solche Monooxygenase offenbar auch am Abbau von Substraten beteiligt ist, die keine Etherbindung enthalten, kann sie nicht für die Spaltung dieser Bindung verantwortlich sein. Vielmehr liegt der Schluß nahe, dass diese Monooxygenase den Morpholin-Ring am C-Atom in Nachbarschaft zum N-Heteroatom hydroxyliert, was dann zur Ringspaltung unter Bildung von 2-(2-Aminoethoxy)acetaldehyd führt (Abb. 3). Mittels ^{1}H-NMR, die uns als Methode nicht zur Verfügung stand, konnte 2-(2-Aminoethoxy)acetat als Intermediat des Morpholin-Abbaus in *Mycobacterium* sp. MO1 nachgewiesen werden, was diese Hypothese bestätigte (Combourieu et al., 1998).

Trotz der offensichtlichen Beteiligung von Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen am Abbau der drei zyklischen Amine, konnte eine enzymatische Aktivität bisher nicht nachgewiesen werden (Poupin et al., 1998, Poupin et al., 1999b; Schräder et al., 2000; Sielaff et al., 2001). Aufgrund der extrem instabilen Aktivität dieser Monooxygenasen, ist eine Charakterisierung wohl nur auf indirektem Wege möglich. Ausgehend von Morpholin-gewachsenen Zellen konnte ein als $P450_{mor}$ bezeichnetes Cytochrom aus *Mycobacterium* sp.

HE5 über die Aufnahme von CO-Differenzspektren bis zur Homogenität gereinigt werden (Sielaff et al., 2001). Das isolierte Protein lag als Monomer mit einem Molekulargewicht von 45 kDa vor und zeigte ein für Cytochrome typisches Absorptionsspektrum. Die Zugabe von Substrat und dessen Bindung am aktiven Zentrum hat bei P450-Cytochromen in der Regel eine Verschiebung der Soret-Bande in den Bereich kürzerer Wellenlängen zur Folge (Jefcoate, 1978; Poulus et al., 1986; Eltis et al., 1993). Eine solche Verschiebung konnte für $P450_{mor}$ nicht beobachtet werden, was darauf schließen ließ, dass das isolierte Protein nicht mehr in der Lage war, Morpholin zu binden (Sielaff et al., 2001). Differenzspektren des reduzierten und CO-behandelten Proteins zeigten das charakteristische namengebende Absorptionsmaximum bei 450 nm. Bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C war das Maximum nach 30 min vollständig in den Bereich von ca. 420 nm verschoben. Die Umwandlung vom P450 zum P420 ist eine typische Eigenschaft von P450-Cytochromen, wobei das P420 enzymatisch inaktiv ist (Martinis et al., 1996). Für andere P450-Cytochrome konnte eine solche Umwandlung erst nach einer drastischen Behandlung mit organischen Lösungsmitteln, hohen Temperaturen oder hohen Drücken beobachtet werden (Martinis et al., 1996). Es handelt sich bei $P450_{mor}$ also offenbar um ein Protein mit extrem labiler Struktur, was auch den Befund erklären könnte, dass in Rohextrakten keine Aktivität meßbar war.

Bei der Sequenzanalyse eines internen Peptids aus $P450_{mor}$ (19 Aminosäuren) zeigten sich signifikante Ähnlichkeiten zu verschiedenen P450-Cytochromen aus Streptomyceten und *Bradyrhizobium japonicum* (Tully und Keister, 1993; Arisawa et al., 1995; Dickens und Strohl, 1996; Omer et al., 1996; Walczak et al., 1999). Bemerkenswert war allerdings die vollständige Identität mit einem postulierten Cytochrom P450 aus *M. smegmatis* mc^2155 (Poupin et al., 1999a). Die Sequenz dieses Cytochrom P450 (PipA) wurde aus einem als *pipA* bezeichneten Gen abgeleitet, welches mittels Transposon-Mutagenese und spezifischem Genaustausch identifiziert wurde. Im Rahmen dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass *M. smegmatis* mc^2155 Pyrrolidin und Piperidin nur dann abbauen kann, wenn ein intaktes *pipA* Gen vorhanden ist (Poupin et al., 1999a). Interessanterweise ist *M. smegmatis* mc^2155 nicht in der Lage, auf Morpholin zu wachsen. PipA und $P450_{mor}$ sollten dementsprechend nicht identisch sein. In einem bisher sequenzierten Teilbereich des für $P450_{mor}$ kodierenden Gens, der einer Länge von 290 Aminosäuren entspricht, waren 87,6 % der Aminosäuren identisch (B. Sielaff, unveröffentlichte Ergebnisse). Die strukturelle Verwandtschaft der Substrate Pyrrolidin, Piperidin und Morpholin sowie die hohen Sequenzhomologien zwischen PipA und $P450_{mor}$ deuten darauf hin, dass die beiden Proteine eine analoge Reaktion katalysieren. Wie

bereits dargelegt, kann es sich hier nur um eine Hydroxylierung in Nachbarschaft zum N-Heteroatom handeln, die eine Spaltung der C-N-Bindung zur Folge hat.

Die meisten P450-abhängigen Monooxygenasen bestehen aus drei Komponenten: der Oxygenase, einem kleinen Eisen-Schwefel-Protein vom Ferredoxin-Typ und einer Flavin-enthaltenden Reduktase (Degtyarenko, 1995; Munro und Lindsay, 1996). Die Elektronen werden vom NAD(P)H über das Flavin der Reduktase auf das Ferredoxin übertragen. Von hieraus gelangen sie dann zum katalytischen Zentrum der Oxygenase (Abb. 4).

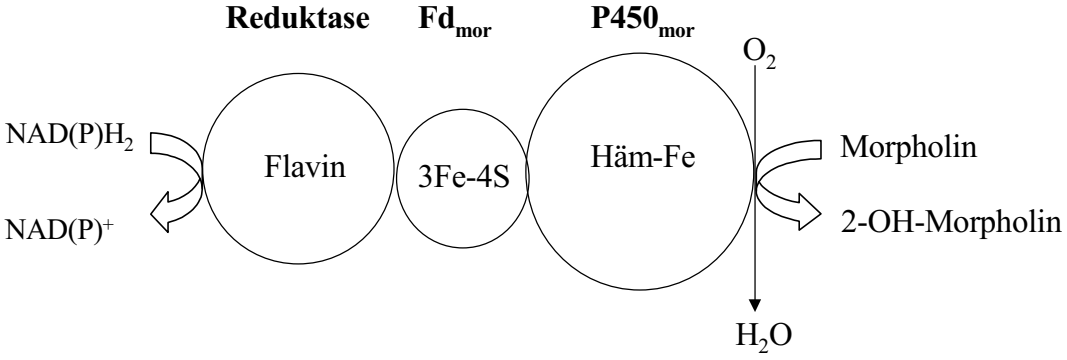


Abb. 4: Schematische Darstellung der Struktur und Katalyse P450-abhängiger Monooxygenasen am Beispiel der postulierten Morpholin-Monooxygenase. P450$_{mor}$ und Fd$_{mor}$, aus Morpholin-gewachsenen *Mycobacterium* sp. HE5 Zellen isoliertes Cytochrom P450 bzw. 3Fe-4S-Ferredoxin. Reduktase, postulierte konstitutiv gebildete Reduktase.

Nach dem Wachstum von *Mycobacterium* sp. HE5 auf Morpholin konnte über die Bestimmung des säurelabilen Schwefels in Zellextrakten ein Eisen-Schwefel-Protein nachgewiesen werden, das in Extrakten aus Succinat-gewachsenen Zellen nicht vorhanden war (Sielaff et al., 2001). Das homogene Protein, das als Fd$_{mor}$ bezeichnet wurde, besitzt ein Molekulargewicht von 6,8 kDa und eine dimere native Struktur. Das Absorptionsspektrum von Fd$_{mor}$ deutete darauf hin, dass das Protein 4Fe-4S- bzw. 3Fe-4S-Zentren enthielt (Sielaff et al., 2001). Die Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz bestätigte diesen Befund. Signifikante Ähnlichkeiten waren zu 3Fe-4S-Ferredoxinen aus verschiedenen Streptomyceten vorhanden, die alle Bestandteil einer P450-abhängigen Monooxygenase sind (O´Keefe et al., 1991; Trower et al., 1992). Wie P450$_{mor}$ zum PipA-Protein zeigte Fd$_{mor}$ die größte Homologie zu einem 3Fe-4S-Ferredoxin aus *M. smegmatis* mc^{2}155. Die Sequenz dieses mutmaßlichen

Ferredoxins wurde von einem Gen abgeleitet, das direkt neben *pipA* liegt. Es handelt sich bei diesem Ferredoxin also wahrscheinlich um die zweite Komponente einer P450-abhängigen Monooxygenase, die die initiale Reaktion beim Pyrrolidin- und Piperidin-Abbau katalysiert (Poupin et al., 1999a). Das für Fd_{mor} kodierende Gen befindet sich ebenfalls in direkter Nachbarschaft zum $P450_{mor}$-Gen (B. Sielaff, unveröffentlichte Daten). Somit ist Fd_{mor} sehr wahrscheinlich die zweite Komponente einer spezifisch durch Morpholin induzierten P450-abhängigen Monooxygenase.

Die dritte, noch fehlende Reduktase-Komponente konnte trotz intensiver Suche bisher nicht identifiziert werden (Sielaff et al., 2001). Dieses Ergebnis war insofern erklärbar, als auch bei *M. smegmatis* mc^2155 in Nachbarschaft zu *pipA* und dem Ferredoxin Gen kein offener Leserahmen gefunden wurde, der für eine solche Reduktase kodiert (Poupin et al., 1999a). Auch bei verschiedenen Streptomyceten, deren Proteine signifikante Homologien zu $P450_{mor}$ und Fd_{mor} zeigten, lagen die Gene des Cytochrom P450 und des Ferredoxins als Cluster vor. Ein Reduktase-Gen wurde in deren Nachbarschaft jedoch nicht gefunden (O´Keefe et al., 1991; Trower et al., 1992). Weiterhin war die Aktivität der Monooxygenase durch unspezifische Reduktasen rekonstituierbar (O´Keefe und Harder, 1991). Demnach bestehen diese Monooxygenasen offenbar aus spezifisch induzierten P450-Cytochromen und Ferredoxinen und einer konstitutiv vorhandenen Reduktase. Diese Hypothese würde auch erklären, warum nach dem Wachstum von *Mycobacterium* sp. HE5 auf Morpholin keine spezifische Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

Faßt man die dargestellten Ergebnisse zusammen, so wurden mit $P450_{mor}$ und Fd_{mor} erstmals zwei Proteine isoliert und charakterisiert, die am bakteriellen Morpholin-Abbau beteiligt sein könnten. Diese Proteine sind mit großer Wahrscheinlichkeit Komponenten einer P450-abhängigen Monooxygenase, die eine Hydroxylierung des C-Atoms in Nachbarschaft zum N-Heteroatom katalysiert, was dann zur Öffnung des Morpholin-Rings führt. Die ermittelten Daten bilden die Grundlage für die bereits begonnene Analyse dieser Monooxygenase auf molekularbiologischer Ebene. Bei keiner der bisherigen Untersuchungen zum Morpholin-Abbau konnte die direkte Umsetzung dieses Substrats durch ein Enzym gezeigt werden. Alle Informationen über die am Abbau beteiligten Enzyme beruhen ausschließlich auf indirekten Nachweismethoden. Die jetzt bekannten strukturellen Eigenschaften der Morpholin-Monooxygenase aus *Mycobacterium* sp. HE5 könnten dazu genutzt werden, Bedingungen zu etablieren, unter denen die entsprechende Enzymaktivität direkt nachweisbar ist.

1.3. Abbau von Tetrahydrofuran durch *Pseudonocardia* sp. K1

Tetrahydrofuran (THF) ist ein zyklischer Ether (Abb. 6) xenobiotischen Ursprungs, der aufgrund seiner chemischen Eigenschaften in der Industrie häufig als Lösungsmittel oder Synthesebaustein verwendet wird. Da THF sehr flüchtig ist und eine hohe Wasserlöslichkeit besitzt, gelangt der Ether leicht in die Umwelt, wo er eine toxische Wirkung entfalten kann (Moody, 1991; Draper et al., 1997). Im Gegensatz zum Furan, dessen Abbau gut untersucht ist, gibt es über den Katabolismus von THF, das lange als biologisch nicht abbaubar galt, sehr wenige Informationen (Bernhardt und Diekmann, 1991; Parales et al., 1994; Bock et al., 1996). Ein Wachstum auf THF wurde bisher lediglich für einen als *Rhodococcus ruber* identifizierten Stamm und ein zu den Pseudonocardien gehörendes Bakterium beschrieben (Bernhardt und Diekmann, 1991; Parales et al., 1994; Bock et al., 1996). Allerdings waren die tolerierten THF-Konzentrationen sehr gering, was diese Kulturen für einen *in situ* Einsatz als nicht geeignet erscheinen läßt. Die am THF-Abbau beteiligten Enzyme sind bisher nicht untersucht worden, und der postulierte THF-Abbauweg beruht lediglich auf Studien verwertbarer Wachstumssubstrate (Bernhardt und Diekmann, 1991). Das Ziel der im folgenden zusammengefaßten Arbeiten bestand deshalb zunächst in der Isolierung einer THF-abbauenden Reinkultur, die eine hohe Toleranz gegenüber dem Lösungsmittel besitzt. Weiterhin sollten die am Abbau beteiligten Enzyme identifiziert und charakterisiert werden.

1.3.1. Isolierung und Charakterisierung einer THF-abbauenden Reinkultur

Aus einer Abwasserprobe konnte mittels Anreicherungskulturen, die 10 mM THF als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle enthielten, ein als Stamm K1 bezeichnetes Bakterium (DSM 44239) in Reinkultur isoliert werden (Kohlweyer et al., 2000). Das Gram-positive, stäbchenförmige Bakterium zeigte ein mycelartiges Wachstum, hatte einen G+C-Gehalt der DNA von 71,3 % und MK-8(H4) als Haupt-Menaquinon. Die morphologischen und chemotaxonomischen Eigenschaften ließen vermuten, dass Stamm K1 zur Gattung *Pseudonocardia* gehört. Dies wurde durch die Bestimmung der 16S rRNA-Sequenz bestätigt, die mit 99 % Identität die größten Homologien zu den entsprechenden Sequenzen von *Pseudonocardia sulfidoxydans* und *Pseudonocardia hydrocarbonoxydans* aufwies (Reichert et al., 1998; Lee et al., 2000; Kohlweyer et al., 2000).

Pseudonocardia sp. Stamm K1 zeigte bei THF-Konzentrationen von 10-20 mM, 28 °C und pH-Werten von 5,0-8,0, mit einer Verdopplungszeit von 14 h, optimales Wachstum. Nach längerem Wachstum auf Vollmedium ging die Fähigkeit zur THF-Verwertung nicht verloren, unterlag aber der spezifischen Induktion durch das Substrat (Kohlweyer et al., 2000). THF wurde von Stamm K1, bei geringfügig niedrigeren Wachstumsraten, bis zu einer Konzentration von 60 mM toleriert. Dieser Wert liegt um eine Größenordnung über den THF-Konzentrationen, die von anderen Organismen toleriert werden (Bernhardt und Diekmann, 1991; Parales et al., 1994). Als weitere Wachstumssubstrate konnte *Pseudonocardia* sp. K1 die postulierten Intermediate des THF-Abbaus γ-Butyrolakton, 4-Hydroxybuttersäure und Succinatsemialdehyd verwerten. Auch mit den Ethern 3-Hydroxy-THF, Diethylether und Polyethylenglykol wurde ein Wachstum beobachtet. Methanol, Ethanol, 1,4-Butandiol, Glyzerin und Toluol wurden ebenfalls als Wachstumssubstrate genutzt (Kohlweyer et al., 2000). Eine vergleichende Untersuchung mit typischen Wachstumssubstraten von *Pseudonocardia* sp. K1, *P. sulfidoxydans* und *P. hydrocarbonoxydans* zeigte, dass sich die drei Stämme bezüglich der verwertbaren Verbindungen deutlich voneinander unterscheiden. So konnte Stamm K1 Dimethyldisulfid, verschiedene Zucker, Tyrosin, Hexadekan und Petroleum nicht als Wachstumssubstrate nutzen. *Pseudonocardia* sp. K1 könnte somit eine neue Art der Gattung *Pseudonocardia* sein, was durch weitere Untersuchungen wie DNA-DNA-Hybridisierung zu prüfen wäre.

Mit Stamm K1 steht nun erstmals ein Organismus zu Verfügung, der für einen *in situ* Einsatz zur Abwasserreinigung geeignet ist. Die guten Wachstumsraten sowie der hohe Zell-Ertrag eröffneten zudem die Möglichkeit, durch enzymatische Studien Informationen über die am Abbau beteiligten Enzyme zu erhalten.

1.3.2. Charakterisierung der THF-umsetzenden Monooxygenase

Ruhende und permeabilisierte *Pseudonocardia* sp. K1 Zellen setzten THF mit signifikanter Rate um, wobei nach Zugabe des Substrats, ein erhöhter Sauerstoffverbrauch zu beobachten war. Dies ließ vermuten, dass eine Monooxygenase am THF-Abbau beteiligt ist. In Extrakten von THF-gewachsenen Zellen war trotz Variation aller relevanten Parameter keine THF-abhängige Enzymaktivität nachweisbar (Kohlweyer et al., 2000; Thiemer et al., 2001b). Eine typische katalytische Eigenschaft vieler Monooxygenasen ist die NAD(P)H-abhängige Reduktion künstlicher Elektronenakzeptoren. Diese Teilaktivität wird häufig durch eine

separate Komponente katalysiert, was eine unabhängige Isolierung dieses Proteins ermöglicht (Powlowski und Shingler, 1990; Weber et al., 1992; Becker et al., 1997; Hübner et al., 1998; Xun, 1996; Pessione et al., 1999; Galan et al., 2000). Auch in Zellextrakten von *Pseudonocardia* sp. K1 konnte eine THF-spezifische NADH:Cytochrom c-Reduktase-Aktivität detektiert und bis zur Homogenität des Enzyms gereinigt werden (Thiemer et al., 2001b). Das monomere, als ThmD bezeichnete Protein hat ein Molekulargewicht von 40 kDa und besitzt ein Flavin sowie ein Fe-S-Zentrum als Kofaktoren. Die Sequenz der 30 N-terminalen Aminosäuren zeigte die höchste Homologie zu den Sequenzen von NAD(P)H:Akzeptor-Reduktasen verschiedener Multikomponenten-Monooxygenasen mit binuklearem Eisenzentrum, wie der Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas putida* H oder der Alken-Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B-276 (Saeki und Furuhashi, 1994; Hermann et al., 1995). Bestätigt wurde dieses Ergebnis nach der Klonierung und Sequenzierung des entsprechenden Gens (*thmD*), das für ein aus 360 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 39,7 kDa kodiert. Über den gesamten Bereich der abgeleiteten Aminosäuresequenz waren signifikante Homologien zu den Sequenzen der erwähnten NAD(P)H:Akzeptor-Reduktasen vorhanden. Insbesondere waren alle konservierten Bereiche der Primärstruktur, für die eine Beteiligung an der Kofaktor-Bindung postuliert wurde, in der ThmD-Sequenz nachweisbar (Thiemer et al., 2001b). Im N-terminalen Teil des Proteins befindet sich ein konserviertes Sequenzmotiv mit vier Cysteinresten, das dem Motiv des 2Fe-2S-Cluster vom Chloroplasten-Typ-Ferredoxin sehr ähnlich ist (Otaka und Ooi, 1989). Somit scheint auch ThmD ein 2Fe-2S-Cluster dieses Typs zu besitzen. Für zwei weitere Sequenzmotive, die in ThmD konserviert sind, wird eine Beteiligung an der Flavin- bzw. NADH-Bindung postuliert (Johnson und Olson, 1995; Neidle et al., 1991). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass es sich bei ThmD um die NADH:Akzeptor-Reduktase einer Multikomponenten-Monooxygenase mit binuklearem Eisenzentrum handelt und, dass diese THF-Monooxygenase (THF-MO) am THF-Abbau beteiligt ist.

Obwohl alle strukturellen Eigenschaften von ThmD mit denen anderer NADH:Akzeptor-Reduktasen übereinstimmten, wies das Protein eine Besonderheit auf, die für ein solches Enzym bisher noch nicht beschrieben wurde. Der Flavin-Kofaktor, der als FAD identifiziert werden konnte, ist kovalent im Enzym gebunden (Thiemer et al., 2001b). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Bindung wahrscheinlich über die 8α-Position des FAD erfolgt. Der Aminosäurerest, über den der Kofaktor kovalent mit dem Protein verknüpft ist,

konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Beim Peptid-Mapping zeigte das Enzym eine ungewöhnlich starke Bindung am verwendeten Säulenmaterial und wies ein ausgeprägtes Aggregationsverhaltens auf, so dass keine ausreichenden Mengen an analysierbaren Peptiden erhalten werden konnten. Eine weitere Untersuchungen der Flavin-Bindung ist aber geplant. Bisher sind erst ca. 30 Enzyme bekannt, für die eine kovalente Bindung des Flavin-Kofaktors nachgewiesen werden konnte (Decker, 1993; Mewies et al., 1998). Offenbar gibt es nur drei Aminosäure-Reste, die für eine kovalente Bindung des Flavins in Frage kommen: Histidin, Tyrosin oder Cystein (Decker und Brandsch, 1991; Mewies et al., 1998). Kürzlich wurde allerdings ein Enzym beschrieben, bei dem das Flavin über einen Threonin-Rest kovalent gebunden ist (Nakayama et al., 2000).

Das binukleare Eisenzentrum der Multikomponenten-Monooxygenasen, das im katalytischen Zentrum für die Aktivierung des Sauerstoffmoleküls verantwortlich ist, besteht aus zwei Eisenatomen, die über Sauerstoffatome miteinander verbrückt sind (Abb. 5; Lipscomb, 1994; Westerheide et al., 2000). Enzyme mit einem solchen katalytischen Zentrum sind am Abbau von Methan, Phenol, Toluol, Benzol, Alkenen, Isopren und Dimethylsulfid beteiligt und katalysieren jeweils die initiale Hydroxylierung oder Epoxylierung des Substrats (Byrne et al., 1993; Lipscomb, 1994; Powlowski und Shingler, 1994; Saeki und Furuhashi, 1994; Miura und Dalton, 1995; Johnson und Olson, 1995; Horinouchi et al., 1997; Small und Ensign, 1997; Zhou et al., 1999; van Hylckama Vlieg et al., 2000). Basierend auf intensiven Studien der Methan-Monooxygenase wurde ein Reaktionsmechanismus für die Hydroxylierungs-Reaktion postuliert, bei dem die Eisenatome einen Valenzwechsel von +2 nach +4 durchlaufen (Lipscomb, 1994; Westerheide et al., 2000). Als strukturelle Komponente findet man bei den Enzymen die eigentliche Oxygenase, die aus zwei oder drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist, wobei das katalytische Zentrum in der größten Untereinheit lokalisiert ist (Abb. 5). Die zweite Komponente ist die bereits beschriebene NAD(P)H:Akzeptor-Reduktase. Ein kleines, ca. 10 - 16 kDa großes Protein, das für die Katalyse der Hydroxylierungsreaktion essentiell ist, aber keine Kofaktoren enthält, stellt die dritte Komponente dar (Abb. 5). Einige Multikomponenten-Monooxygenasen besitzen als vierte, zusätzliche Komponente ein Rieske-Typ 2Fe-2S-Ferredoxin (Harayama et al., 1992; Zhou et al., 1999). Bei der Katalyse werden die Elektronen vom NAD(P)H auf das FAD der Reduktase übertragen und von dort intramolekular zum 2Fe-2S-Zentrum weitergeleitet. Anschließend werden sie entweder direkt auf die Oxygenase übertragen oder sie fließen über

das 2Fe-2S-Ferredoxin zur Oxygenase, wo dann die Hydroxylierung des Substrats erfolgt (Abb. 5).

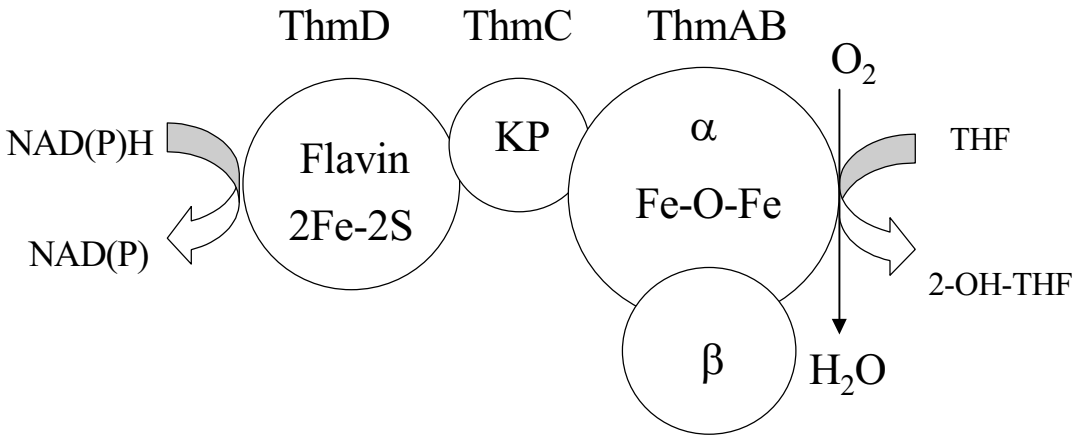


Abb. 5: Schematische Darstellung von Untereinheiten-Struktur und Katalyse der Multikomponenten-Monooxygenasen mit binuklearem Eisenzentrum am Beispiel der postulierten THF-MO.

Die Strukturgene aller bisher daraufhin untersuchten Multikomponenten-Monooxygenasen mit binuklearem Eisenzentrum liegen in einem Gen-Cluster oder Operon (Nordlund et al., 1990; Stainthorpe et al., 1990; Byrne et al., 1993; Saeki und Furuhashi, 1994; Herrmann et al., 1995; Johnson und Olson, 1995; Horinouchi et al., 1997; Zhou et al., 1999; van Hylckama Vlieg et al., 2000). Um weitere Informationen über die postulierte THF-MO zu erhalten, lag es somit nahe, zu untersuchen, ob sich in den DNA-Regionen stromauf- und stromabwärts von *thmD* weitere Strukturgene einer Multikomponenten-Monooxygenase befinden. Bei der Analyse der entsprechenden DNA-Sequenzen wurden drei offene Leserahmen (ORFs) mit vorgelagerter Ribosomen-Bindestelle identifiziert, die mit *thmD* in einem eng assoziierten Gen-Cluster liegen (Thiemer et al., 2001a). Stromaufwärts von *thmD* befindet sich ein als *thmA* bezeichneter ORF, der für ein Protein kodiert, das aus 545 Aminosäuren besteht (ThmA). Die abgeleitete Primärstruktur von ThmA zeigte die höchsten Sequenzhomologien zur großen Oxygenase α-Untereinheit verschiedener Multikomponenten-Monooxygenasen, die Träger des binuklearen Eisenzentrums ist. Wie am Beispiel der Methan-Monooxygenase gezeigt wurde, besitzen diese Enzyme hoch konservierte Sequenzmotive, deren Aminosäuren an der Koordinierung der beiden Eisenatome und der Ausbildung einer hydrophoben Tasche im katalytischen Zentrum beteiligt sind (Rosenzweig et al., 1993; 1997). Diese Sequenzmotive

sind mit geringen Ausnahmen im Bereich der hydrophoben Tasche, die durch eine abweichende Substratspezifität bedingt sein können, auch in ThmA konserviert (Thiemer et al., 2001a).

Zwei weitere zum *thm*-Gen-Clusters gehörende ORFs (*thmB* und *thmC*) lagen stromabwärts von *thmD*. Das von *thmB* kodierte Protein (ThmB) konnte aufgrund von Sequenzhomologien als kleine β-Untereinheit der Oxygenase identifiziert werden, wobei, wie schon für ThmA, die größten Homologien zur Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous*, zur Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas* CF 600 und zur Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) gefunden wurden (Nordlund et al., 1990; Stainthorpe et al., 1990; Saeki und Furuhashi, 1994). Bei einer Datenbank-Analyse der von *thmC* abgeleiteten Aminosäuresequenz konnten lediglich Homologien (21 % Identität) zum Kopplungsprotein AmoB der Alken-Monooxgenase aus *R. rhodochrous* ermittelt werden (Thiemer et al., 2001a). Die DNA-Sequenzen stromaufwärts von *thmA* und stromabwärts von *thmC* zeigten keine Homologien zu Strukturgenen der Multikomponenten-Monooxygenasen. Daraus wurde geschlossen, dass es sich bei der postulierten THF-MO um ein aus vier Proteinen bestehendes Enzym handelt. Damit gehört diese Monooxygenase zu den Drei-Komponenten-Enzymen, die aus einer Oxygenase, einer Reduktase und einem Kopplungsprotein bestehen. Bezüglich ihrer Primär- und Quartärstruktur ist die THF-MO aus *Pseudonocardia* sp. K1 der Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* am ähnlichsten (Thiemer et al., 2001a).

Um die Beteiligung der THF-MO am THF-Abbau zu verifizieren, wurde mittels Northern-Blot eine Transkriptions-Analyse der *thm*-Gene in Abhängigkeit vom Wachstumssubstrat durchgeführt. Transkripte der *thm*-Gene konnten in THF-, aber nicht in Succinat-gewachsenen Zellen detektiert werden (Thiemer et al., 2001a). Neben polycistronischen mRNAs wurden mono- und dicistronische Transkripte erhalten. In der Reihenfolge der Transkription umfassen diese mRNAs die folgenden Gene: mRNA1, *thmADBC*; mRNA2, *thmBC* und mRNA3, *thmA*. Damit ist *thmD* das einzige *thm*-Gen, für das nur ein Transkript nachgewiesen werden konnte. Dementsprechend dürfte ThmD in der Zelle, im Vergleich zu den anderen Komponenten der Monooxygenase, in geringeren Mengen vorhanden sein. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Transkriptions-Analyse führten Primer-Extension-Experimente zur Identifizierung von Transkriptions-Startpunkten stromaufwärts von *thmA* und *thmB* (Thiemer et al., 2001a). Bei der Analyse der stromaufwärts gelegenen DNA-Region konnten keine Ähnlichkeiten zu bekannten eubakteriellen Promotor-Sequenzen gefunden werden, was für Streptomyceten allerdings nicht ungewöhnlich ist (Strohl, 1992; Wösten, 1998). Mögliche

Terminations-Strukturen sind stromabwärts von *thmA* und *thmC* vorhanden. Dieses Transkriptions-Muster der *thm*-Gene entspricht im wesentlichen dem der Methan-Monooxygenase-Gene aus *M. trichosporium* OB3b und *M. capsulatus* (Bath). In beiden Fällen wurden verschiedene poly- und monocistronische mRNAs nachgewiesen, die ausgehend von einem bzw. zwei verschiedenen Promotoren abgelesen werden (Nielsen et al., 1996; 1997). Im Gegensatz zu den mRNAs dieser Monooxygenasen wurden für die *thm*-Gene aber noch weitere Transkripte gefunden, die zusätzliche nicht zur THF-MO gehörende stromaufwärts liegende Gene umfassen (siehe nächstes Kapitel). Besonders bemerkenswert ist die gemeinsame Transkription der *thm*-Gene mit dem *sad*-Gen, das eine Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase kodiert, die am THF-Abbau beteiligt ist (Thiemer et al., 2001a, nächstes Kapitel).

Die ermittelten Daten zur postulierten THF-MO lassen sich wie folgt zusammenfassen: 1.) Die NADH:Akzeptor-Reduktase (ThmD) dieser Monooxygenase läßt sich nur nach Wachstum von *Pseudonocardia* sp. K1 auf THF enzymatisch nachweisen. 2.) Die THF-MO ist eine aus drei Komponenten bestehende Multikomponenten-Monooxygenase mit binuklearem Eisenzentrum. 3.) Die Transkription der *thm*-Gene wird durch THF spezifisch induziert. 4.) Die Strukturgene der THF-MO werden gemeinsam mit einem Gen transkribiert, das für ein am THF-Abbau beteiligtes Enzym kodiert. Trotz der in zellfreien Extrakten nicht nachweisbaren THF-MO-Aktivität lassen diese Ergebnisse den Schluß zu, dass die analysierte Monooxygenase am Abbau von THF durch *Pseudonocardia* sp. K1 beteiligt ist. Als mögliche Oxygenase-Reaktion kommt beim THF-Abbau nur die initiale Hydroxylierung des Ringsystems in Frage. Durch die Einführung einer Hydroxylgruppe in Nachbarschaft zum Heteroatom wird ein labiles Hemiacetal gebildet, dessen Hydrolyse zur Spaltung der Etherbindung und Öffnung der Ringstruktur führt (Abb. 6). Beim weiteren Abbau entstehen dann verschiedene Alkohole und Aldehyde für deren Oxidation keine Oxygenase benötigt wird (Abb. 6). Damit ist die THF-MO, neben der Methan-Monooxygenase und der Toluol-2-Monooxygenase die dritte Multikomponenten-Monooxygenasen, die auch eine Etherspaltung katalysiert (Stirling und Dalton, 1980; Hur et al., 1997). In *Acinetobacter* sp. 20B ist ein ähnliches Enzym an der Spaltung des Thioethers Dimethylsulfid beteiligt (Horinouchi et al., 1997).

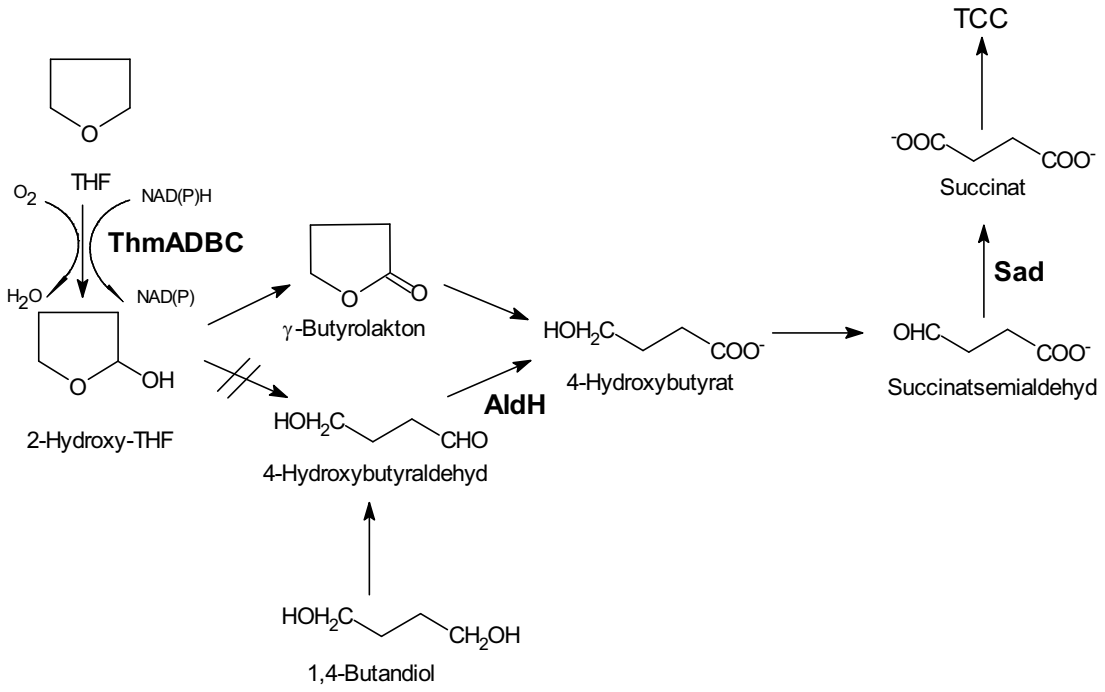


Abb. 6: Postulierter Weg des THF-Abbaus in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 und daran beteiligte Enzyme. ThmADBC, Multikomponenten-THF-Monooxygenase mit binuklearem Eisenzentrum. Sad, Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase. AldH, postulierte 4-Hydroxybutyraldehyd-Dehydrogenase (s. Kapitel 1.3.3.).

1.3.3. Molekularbiologische Analyse von weiteren am THF-Abbau beteiligten Proteinen

Die Gene der am Abbau einer Verbindung beteiligten Enzyme sind häufig in einem Cluster oder Operon organisiert. Um festzustellen, ob dies auch für die Enzyme des THF-Abbaus zutrifft, wurden die DNA-Sequenzen stromauf- (ca. 2 kb) und stromabwärts (ca. 3 kb) der *thm*-Gene bestimmt. Stromaufwärts von *thmA* wurden zwei weitere ORFs mit möglicher Ribosomen-Bindestelle identifiziert (*orfY* und *sad*). Das hypothetische Protein OrfY besteht aus 107 Aminosäuren und zeigte bei einer Datenbank-Analyse die größten Homologien zu einem hypothetischen Protein aus *Rhodococcus* sp. Stamm NI86/21 mit bisher unbekannter Funktion, dessen Gen zwischen den Genen eines Cytochrom P450 und eines Ferredoxins lokalisiert ist, die am Abbau eines Thiocarbamat-Herbizids beteiligt sind (Nagy et al., 1995). In Nachbarschaft dieser Gene wird eine Aldehyd-Dehydrogenase kodiert, die ebenfalls in den Abbau des Herbizids involviert ist (Nagy et al., 1995). Bei *Pseudonocardia* sp. K1 liegt zwischen *orfY* und *thmA* das bereits erwähnte *sad*-Gen. Dieses Gen kodiert ein Protein (Sad),

dessen abgeleitete Aminosäuresequenz ebenfalls deutliche Homologien zu verschiedenen Aldehyd-Dehydrogenasen zeigt (Thiemer et al., 2001a). Die größte Ähnlichkeit wurde mit 48 % Identität zu zwei Aldehyd-Dehydrogenasen aus Pseudomonaden bestimmt, die eine Oxidation aromatischer Aldehyde katalysieren (Beltrametti et al., 1997; Eaton, 1997). Da beim Abbau von THF mehrere Aldehyde als mögliche Intermediate auftreten, wurde vermutet, dass Sad für die weitere Oxidation einer dieser Verbindungen verantwortlich ist. Diese Hypothese wurde durch nachfolgende enzymatische Untersuchungen bestätigt. Succinatsemialdehyd ist ein postuliertes Intermediat des THF-Abbaus (Abb. 6). Aus Zellextrakten von Stamm K1 konnte eine THF-induzierte, NAD-abhängige Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase isoliert werden. Das Enzym besteht aus vier identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 53,5 kDa und enthält keine Kofaktoren (Thiemer et al., 2001a). Abgesehen von einem aminoterminalen Methionin-Rest, der wahrscheinlich bei der Reifung des Proteins abgespalten wird, war die N-terminale Aminosäuresequenz des Enzyms (5 Aminosäuren) identisch mit der abgeleiteten Sad-Sequenz. Neben der THF-MO konnte mit der Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase somit ein weiteres Enzym des THF-Abbaus identifiziert werden. Die Tatsache, dass die Stukturgene beider Enzyme in direkter Nachbarschaft liegen, sowie die im folgenden beschriebenen Ergebnisse der Transkriptions-Analyse bestätigen ihre enge physiologische Verknüpfung.

Pseudonocardia sp. K1 kann neben THF auch auf 1,4-Butandiol und den postulierten Intermediaten des THF-Abbaus γ-Butyrolakton und 4-Hydroxybuttersäure wachsen (Kohlweyer et al., 2000). Beim Katabolismus dieser Verbindungen entsteht Succinatsemialdehyd als gemeinsames Intermediat (Abb. 6). Dementsprechend sollte Sad durch diese Substrate spezifisch induzierbar sein, was durch eine Transkriptions-Analyse des *sad*-Gens gezeigt werden konnte. Transkripte des *sad*-Gens wurden nach dem Wachstum von Stamm K1 auf den drei genannten Substraten, aber nicht mit Succinat-gewachsenen Zellen erhalten (Thiemer et al., 2001a). Es konnten drei verschiedene mRNAs nachgewiesen werden, die Transkripte der folgenden Gene darstellten: mRNA1, *orfY, sad* und *thmA*; mRNA2, *sad* und *thmA*; mRNA3, *sad* und *thmADBC*. Durch Primer-Extension-Experimente konnte stromaufwärts von *sad* ein Transkriptions-Startpunkt mit vorgelagerter Promotorsequenz identifiziert werden. Diese Promotorsequenz war der Konsensussequenz σ^{54}-abhängiger Promotoren sehr ähnlich (Thiemer et al., 2001a). Aus diesen Ergebnissen wurden die folgenden Schlußfolgerungen gezogen: 1.) Sad ist am Abbau von THF, 1,4-Butandiol und 4-Hydroxybutyrat beteiligt. 2.) Die gemeinsame Transkription von THF-MO und Sad kann als

Indiz für die enge stoffwechselphysiologische und regulatorische Assoziation der Gene bzw. der von ihnen kodierten Proteine gesehen werden. 3.) Die vielen verschiedenen mRNAs deuten auf eine sehr komplexe Regulation der Transkription hin. 4.) Bei OrfY handelt es sich offenbar um ein Protein, das in den Abbau der drei oben genannten Verbindungen involviert ist. Offen bleiben allerdings die Fragen, i) warum Transkripte der *thm*-Gene auch nach dem Wachstum auf 1,4-Butandiol bzw. 4-Hydroxybutyrat nachweisbar waren, obwohl die THF-MO für den Abbau dieser Substrate nicht benötigt wird. ii) wie die Transkription der identifizierten Gene reguliert wird. und iii) welche physiologische oder regulatorische Rolle das hypothetische Protein OrfY spielt. Die Klärung dieser Fragen wird Gegenstand der weiteren Forschungsarbeit sein.

In der DNA-Region stromabwärts der *thm*-Gene konnten zwei weitere ORFs mit möglicher Ribosomen-Bindstelle identifiziert werden, die als *orfZ* und *aldH* bezeichnet wurden. Das von *orfZ* kodierte, hypothetische Protein besteht aus 221 Aminosäuren (22,3 kDa) und zeigt eine signifikante Ähnlichkeit zu verschiedenen hypothetischen Transmembranproteinen, die im Rahmen der Genom-Sequenzierungen von *E. coli* und *Methanobacterium autotrophicum* identifiziert wurden (P28695 und O26317). Bei einer Analyse der Sekundärstruktur dieses Proteins konnten sechs mögliche Transmembranhelices nachgewiesen werden (Thiemer et al., 2001a). Es könnte sich hierbei um einen Transporter handeln. Das von *aldH* kodierte hypothetische Protein (AldH) besteht aus 479 Aminosäuren (51,5 kDa) und zeigt die höchsten Homologien zu verschiedenen Aldehyd-Dehydrogenasen. Ein direkter Vergleich der Aminosäuresequenz von Sad und AldH ergab eine Identität von 32 %. Da für den THF-Abbau verschiedene Aldehyde als Intermediate postuliert wurden, lag die Vermutung nahe, dass AldH wie Sad für die Oxidation eines dieser Aldehyde verantwortlich ist. Im Gegensatz zu *sad* wurden *aldH* beim Wachstum auf THF aber nicht transkribiert. Transkripte konnten dagegen in 1,4-Butandiol-gewachsenen Zellen nachgewiesen werden. Dementsprechend könnte es sich bei AldH um eine 4-Hydroxybutyraldehyd-Dehydrogenase handeln, da diese Verbindung ein Intermediat des 1,4-Butandiol-Abbaus darstellt (Abb. 6). Eine Überprüfung dieser Hypothese auf enzymatischer Ebene war nicht möglich, da 4-Hydroxybutyraldehyd kommerziell nicht verfügbar ist. Weiterhin könnte aufgrund dieser Daten vermutet werden, dass der Abbau von THF über γ-Butyrolakton und nicht über 4-Hydroxybutyraldehyd verläuft (Abb. 6). Die Größe der *aldH*-spezifischen mRNAs ließ vermuten, dass dieses Gen zusammen mit benachbarten Genen transkribiert wird. Dies wurde bei der genaueren Analyse bestätigt. *OrfZ* und *aldH* werden gemeinsam mit bisher unbekannten, stromabwärts von *aldH* gelegenen Genen

transkribiert (Thiemer et al., 2001a). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass neben AldH auch das von *orfZ* kodierte Protein eine Rolle beim Abbau von 1,4-Butandiol spielt. Welche genaue physiologische Funktion diesem Protein zukommt und welche zusätzlichen Proteine von der *aldH*-spezifischen mRNA kodiert werden, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Insbesondere die Enzyme, die am Abbau xenobiotischer Verbindungen beteiligt sind, werden häufig von Genen kodiert, die auf einem Plasmid lokalisiert sind. Der G+C-Gehalts des analysierten *Pseudonocardia* sp. K1 Gen-Cluster lag mit ca. 60 % deutlich unter dem für die Gesamt-DNA ermittelten Wert von 71 % (Kohlweyer et al., 2000; Thiemer et al., 2001a), was darauf hindeutete, dass diese Gene plasmid-kodiert sind. Dies konnte mittels spezifischer Sonden gegen die *thm*-Gene und das Gen der 16S rRNA bestätigt werden. Die *thm*-Gene liegen in *Pseudonocardia* sp. K1 als einfache Kopie vor und sind auf einem der beiden Plasmide lokalisiert. Dieses Plasmid liegt in der zirkulären Form vor, konnte aber aufgrund seiner ungewöhnlichen Laufeigenschaften im Agarosegel nicht näher charakterisiert werden (Thiemer et al., 2001a). Somit könnte *Pseudonocardia* sp. K1 die Fähigkeit zum THF-Abbau durch lateralen Gentransfer erworben haben.

2. Hydroxylierung von Heteroaromaten durch Molybdän-abhängige Dehydrogenasen

Die Molybdän-haltigen Dehydrogenasen spielen eine zentrale Rolle beim mikrobiellen Abbau aromatischer Heterozyklen. Obwohl sie wie die Oxygenasen eine Hydroxylierung des Substrats katalysieren, handelt es sich hier um einen nukleophilen Angriff, wobei der inkorporierte Sauerstoff aus dem Wasser stammt. Aufgrund ihrer strukturellen und katalytischen Eigenschaften wurden die mononuklearen Molybdän-enthaltenden Enzyme in drei Familien unterteilt: Die Sulfit-Oxidase-Familie, die DMSO-Reduktase-Familie und die Xanthin-Oxidase-Familie (Hille, 1996; Kisker et al. 1999; Hille et al., 1999). Das gemeinsame Merkmal dieser Protein-Familien ist der Molybdän-Kofaktor (Molybdopterin), über den das im aktiven Zentrum lokalisierte Molybdänatom gebunden wird (Abb. 7; Hille et al., 1999). Bei den meisten prokaryontischen Enzymen liegt der Kofaktor als Dinukleotid vor, wobei CMP, GMP, AMP oder Hypoxanthin-MP jeweils über den Phosphatrest des Molybdopterins gebunden ist (Abb. 7). Bezüglich der Liganden des Molybdänatoms bestehen zwischen den Familien jedoch signifikante Unterschiede.

Zur Xanthin-Oxidase-Familie gehören neben verschiedenen Aldehyd-Oxidasen und CO-Dehydrogenasen auch eine Reihe von Enzymen, die heteroaromatische Verbindungen wie Pyridin-, Quinolin- und Xanthin-Derivate hydroxylieren (Hille, 1996; Kisker et al. 1999; Hille et al., 1999). Diese oft auch als Hydroxylasen bezeichneten Enzyme sind dadurch charakterisiert, dass sich im aktiven Zentrums ein Schwefelatom als Ligand des Molybdäns befindet (Abb. 7). Weitere Liganden sind ein Sauerstoffatom und ein Wassermolekül oder Hydroxidion (Hille et al., 1999; Fetzner, 2000). Wie bei allen mononuklearen Molybdoenzymen wird das Molybdänatom über die Dithiolene-Gruppe des Molybdopterin gebunden (Abb. 7).

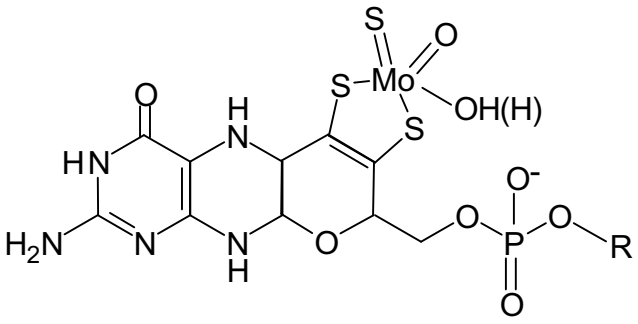


Abb. 7: Struktur des Molybdän-Kofaktors und des katalytischen Zentrums der Xanthin-Oxidase-Familie (nach Fetzner, 2000). R = H, Molybdän-Kofaktor der eukaryontischen Enzyme; R = CMP, GMP, AMP oder Hypoxanthin-MP, Molybdän-Kofaktor der meisten prokaryontischen Enzyme.

In Abb. 8 ist der postulierte Reaktionsmechanismus am Beispiel der Hydroxylierung von Xanthin dargestellt (Hille et al., 1999). Das C-Atom des Substrats wird nach diesem Mechanismus vom Molybdän-gebundenen Hydroxid nukleophil angegriffen. Die daran beteiligte Base wurde mittels Röntgenstrukturanalyse als konservierter Glutamatrest identifiziert (Huber et al., 1996). Der Hydridtransfer vom C-Atom auf das Molybdän-gebundene Schwefelatom hat einen Redoxwechsel des Molybdäns von +6 nach +4 zur Folge. Nach Freisetzung des Produkts erfolgt eine Reoxidation des Molybdäns durch den Abfluß der Elektronen über den Flavin-Kofaktor und/oder die Fe/S-Zentren auf den Endakzeptor. Der fehlende Ligand wird direkt aus dem umgebenden Wasser regeneriert.

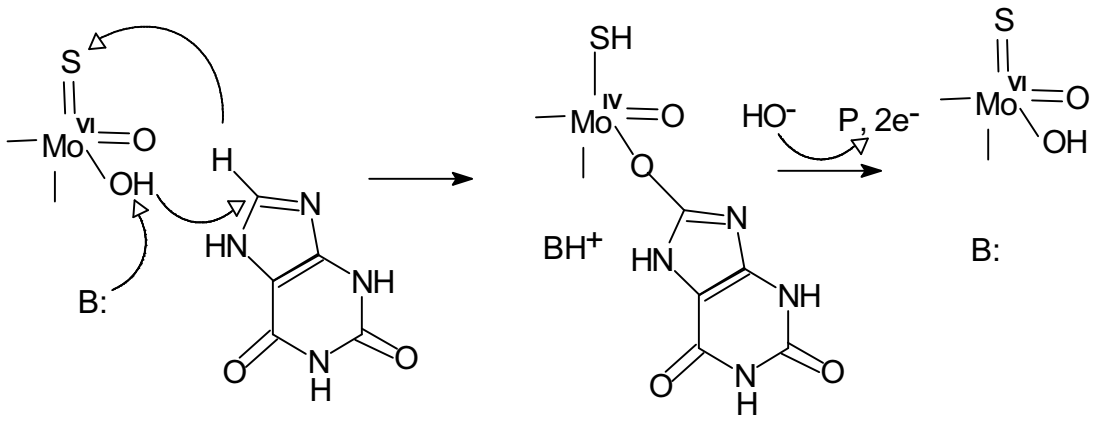


Abb. 8: Postulierter Reaktionsmechanismus der Molybdän-haltigen Hydroxylasen am Beispiel der Xanthin-Oxidation (nach Hille et al., 1999).

In den folgenden Kapiteln werden drei Enzyme vom Xanthin-Oxidase-Typ beschrieben, die jeweils eine regioselektive Hydroxylierung von Heteroaromaten katalysieren. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Isolierung und Charakterisierung dieser Enzyme erfolgte, da vorherige physiologische Untersuchungen auf ungewöhnliche katalytische und/oder strukturelle Eigenschaften hindeuteten. Dies konnte durch die erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden.

Der Abbau von N-Heteroaromaten ist in der Vergangenheit bereits intensiv erforscht worden. Die Molybdän-abhängigen Dehydrogenasen waren ebenfalls Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen. Aus diesen Gründen lag der Fokus der im folgenden vorgestellten Arbeiten auf einzelnen Enzymen mit besonderen Eigenschaften. Insgesamt stellen diese Untersuchungen eher ein thematisches Randgebiet dar.

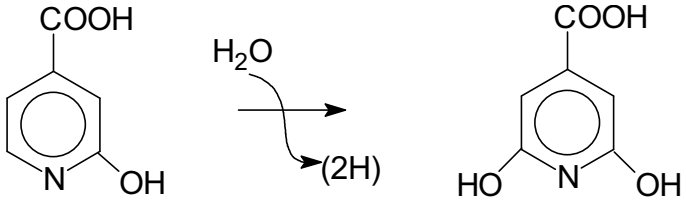
2.1. 2-Hydroxyisonikotinsäure-Dehydrogenase aus *Mycobacterium* sp. INA1

Die Fähigkeit zur Verwertung von Isonikotinsäure (Pyridin-4-Carboxylat) als Wachstumssubstrat wurde bisher für Bakterien der Gattungen *Pseudomonas, Sarcina, Mycobacterium* und *Bacillus* beschrieben (Ensign und Rittenberg, 1965; Gupta und Shukla, 1979; Singh und Shukla, 1986; Kretzer et al., 1993). Eine Hydroxylierung in Position 2 und 6 leitet dabei den Abbau dieser Verbindung ein. Lediglich bei *Bacillus brevis* wurde als initiale Reaktion eine Reduktion des aromatischen Ringsystems postuliert (Singh und Shukla, 1986). Genauere Untersuchungen zu den am Abbau beteiligten Enzymen liegen bisher nur für

Mycobacterium sp. INA1 vor (Kretzer et al., 1993). Die einleitende Hydroxylierung von Isonikotinsäure zur 2-Hydroxy-Isonikotinsäure (2-OH-IN) wird bei diesem Bakterium durch eine Molybdän-haltige Dehydrogenase vom Xanthin-Oxidase-Typ katalysiert (Kretzer et al., 1993). Neben dieser Isonikotinsäure-Dehydrogenase (INDH) konnte eine weitere, 2-OH-IN-abhängige Dehydrogenaseaktivität nachgewiesen werden. Aus diesem Befund ergaben sich folgende Fragen: 1. Könnte die Umsetzung von 2-OH-IN durch die INDH katalysiert werden, und 2. falls nicht, welche Eigenschaften hat das putative 2-OH-IN-oxidierende Enzym? Die Voraussetzung für die Klärung dieser Fragen war die Reinigung und Charakterisierung des Enzyms.

Nach der Chromatographie von Extrakten aus Isonikotinsäure-gewachsenen Zellen an einem Anionenaustauscher, konnte bereits eine klare Trennung der Isonikotinsäure- und 2-OH-IN-abhängigen Aktivität beobachtet werden (Schräder et al., 1998). Letztere Aktivität wurde in vier Schritten 26-fach bis zur Homogenität des Enzyms angereichert. Aufgrund der Eigenschaften des im folgenden als 2-OH-Isonikotinsäure-Dehydrogenase (2-OH-INDH) bezeichneten Enzyms konnte eindeutig festgestellt werden, dass es von der INDH verschieden war. Aus dem nativen Molekulargewicht von 300 kDa und Untereinheiten von 97, 31 und 17 kDa konnte eine $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Struktur abgeleitet werden. Die Analyse der im Enzym vorhandenen Kofaktoren ergab 0,94 mol FAD, 0,75 mol Molybdän, 3,8 mol Eisen und 3,7 mol säurelabilen Schwefel pro mol Protomer. Weiterhin wurde Cytosin-Monophosphat als Bestandteil des Molybdän-Kofaktors nachgewiesen, was auf ein Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid schließen ließ (Schräder et al., 1998). In Gegenwart von Zyanid unterlag das Enzym einer schnellen Inaktivierung. Mit diesen Eigenschaften war die 2-OH-INDH der INDH zwar sehr ähnlich, aber nicht identisch mit ihr. Wie die INDH gehört damit auch die 2-OH-INDH zur Familie der Molybdoenzyme vom Xanthin-Oxidase-Typ. Eine Untersuchung des Substratspektrums der 2-OH-INDH zeigte, dass von den getesteten Substraten nur 2-OH-IN umgesetzt wurde. Als Produkt dieser Reaktion konnte 2,6-Dihydroxypyridin-4-Carboxylat identifiziert werden (Schräder et al., 1998). Damit ist die 2-OH-INDH das erste beschriebene Enzym, das eine spezifische, regioselektive Hydroxylierung von 2-OH-IN in Position 6 katalysiert (Abb. 9). Eine regioselektive Hydroxylierung und ein enges Substratspektrum sind charakteristische Merkmale von Molybdoenzymen, die Pyridinderivate umsetzen. Die N-terminalen Aminosäuresequenzen der kleinen und mittleren 2-OH-INDH Untereinheit zeigten bei der Datenbank-Analyse keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen. Bei einem direkten Vergleich der N-terminalen Sequenz von INDH und 2-OH-INDH ergab sich eine -wenn auch

geringe- Ähnlichkeit für beide Untereinheiten (Schräder et al., 1998). Aus den erhaltenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass *Mycobacterium* sp. INA1 zwei spezifische Molybdän-haltige Dehydrogenasen besitzt, die den ersten und zweiten Schritt beim Isonikotinat-Abbau katalysieren. Auch in *Bacillus niacini* konnten zwei Molybdän-haltige Dehydrogenasen identifiziert werden, die beide am Abbau von Nikotinsäure beteiligt sind (Nagel und Andreesen, 1990). Ein Enzym katalysiert die initiale Hydroxylierung von Nikotinsäure zur 6-OH-Nikotinsäure, und das zweite Enzym bildet aus diesem Produkt 2,6-Dihydroxynikotinsäure.



2-OH-Isonikotinsäure 2,6-Dihydroxyisonikotinsäure

Abb. 9: Oxidation von 2-OH-IN durch die 2-OH-INDH aus *Mycobacterium* INA1.

2.2. 2-Hydroxylierung von Nikotinsäure durch Stamm DSM 6920

Die im folgenden Kapitel vorgestellten Untersuchungen wurden mit einem von der Lonza AG (Schweiz) zur Verfügung gestellten Bakterienstamm durchgeführt. Dieser Gram-negative Stamm (DSM 6920) wurde mittels Anreicherungskulturen, die 6-Methylnikotinsäure als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle enthielten, aus einer Abwasserprobe isoliert (Tinschert et al., 1997). Während des Wachstums auf 6-Methylnikotinsäure konnte im Medium eine Akkumulation von 2-Hydroxy-6-Methylnikotinsäure beobachtet werden, die anschließend vollständig verstoffwechselt wurde (Tinschert et al., 1997). Weitere Versuche zeigten, dass Stamm DSM 6920 in der Lage war, Nikotinsäure zu 2-Hydroxy-Nikotinsäure umzusetzen (Abb. 10), aber nicht auf dieser Verbindung wachsen kann (Tinschert et al., 1997). Ruhende Zellen setzten außerdem chlorierte Nikotinsäurederivate sowie verschiedene 2-Carboxypyrazine um (Tinschert et al., 2000). Die initiale Hydroxylierung erfolgte dabei immer am C-Atom zwischen der Carboxylgruppe und dem N-Heteroatom. Das ließ vermuten, dass das selbe Enzym die Umsetzung aller Substrate katalysiert. Das Ziel der im Rahmen der

vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente war die Isolierung und Charakterisierung dieses Enzyms, um mit den gewonnenen Daten die Voraussetzungen für die Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens zur Produktion regioselektiv substituierter N-Heteroaromaten zu schaffen.

Bei früheren Untersuchungen zum Nikotinsäurestoffwechsel verschiedener Bakterien wurde in allen Fällen 6-Hydroxy-Nikotinsäure als Produkt der initialen Hydroxylierung identifiziert (Kaiser et al., 1996; Fetzner et al., 1998). Lediglich zwei als MCI 3288 und MCI 3289 bezeichnete Stämme, die phylogenetisch mit Stamm DSM 6920 verwandt sind, konnten ebenfalls Nikotinsäure zu 2-Hydroxy-Nikotinsäure umzusetzen (Ueda und Sashida, 1998). Wie für verschiedene Bakterien gezeigt werden konnte, wird die Hydroxylierung von Nikotinsäure am C_6-Atom von Molybdän-haltigen Dehydrogenasen katalysiert, die zur Xanthin-Oxidase-Familie gehören (Nagel und Andreesen, 1990; Gladyshev et al., 1996). Im Gegensatz dazu ist über die Enzyme, die eine Hydroxylierung in Position 2 katalysieren, bisher nichts bekannt.

Substituierte 2-Carboxypyridine wie 2-Cl-Nikotinsäure sind wichtige Ausgangsstoffe für die Herstellung von Feinchemikalien in der Pharma- und Agrochemie (Tinschert et al., 2000). Da eine regioselektive Substitution dieser Verbindungen auf chemischem Wege sehr schwierig ist, wird zunehmend nach Biokatalysatoren gesucht, die solche Reaktionen katalysieren.

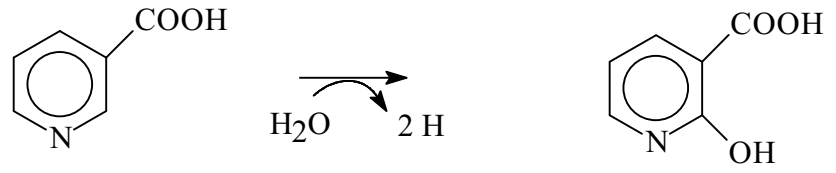
Die Isolierung und Charakterisierung des Nikotinsäure hydroxylierenden Enzyms aus Stamm DSM 6922 war somit sowohl aus wissenschaftlicher als auch aus biotechnologischer Sicht besonders interessant.

In Extrakten von 6-Methylnikotinsäure-gewachsenen Zellen konnte eine Nikotinsäure-abhängige Enzymaktivität nachgewiesen werden, die in fünf Schritten 134-fach angereichert wurde (Schräder et al., 2001b). Das isolierte homogene Protein, das im folgenden als Nikotinsäure-Dehydrogenase (NDH) bezeichnet wird, besteht aus drei Untereinheiten mit Molekulargewichten von 16, 30 und 75 kDa. Aufgrund des nativen Molekulargewichts von ca. 250 kDa wurde auf eine $\alpha_2\beta_2\gamma_2$–Quartärstruktur geschlossen. Die Analyse des Metallgehalts der NDH ergab einen Anteil von 0,8 mol Molybdän, 3,7 mol Eisen und 0,9 mol Zink pro mol Protomer (121 kDa). Weiterhin wurden 4 mol säurelabiler Schwefel und 0,3 mol FAD pro Protomer bestimmt (Schräder et al., 2001b). Der geringe Flavingehalt des isolierten Enzyms war auf einen Verlust der Flavin-bindenden Untereinheit während der Aufreinigung zurückzuführen. Die erhaltenen Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass es sich bei der NDH aus Stamm DSM 6920 um ein Molybdän-Eisen-Schwefel-Flavoprotein handelt. Der Nachweis

von CMP als Bestandteil des Molybdän-Kofaktors und die schnelle Inaktivierung des Enzyms durch Zyanid unterstützten diese Annahme. Außer dem nachgewiesenen Zink stimmten alle Eigenschaften der NDH mit denen von Molybdoenzymen der Xanthin-Oxidase-Familie überein (Hille, 1996; Kisker et al., 1999). Übergangsmetalle wie Zink und Kupfer, über deren Funktion in diesen Enzymen bisher nichts bekannt ist, wurden früher auch in anderen Molybdoenzymen aus der Xanthin-Oxidase-Familie gefunden. So enthielt die Xanthin-Dehydrogenase aus *Veillonella atypica* Zink, und in der Isoquinolin-1-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas diminuta* wurde Kupfer gefunden (Gremer und Meyer, 1996; Lehmann et al., 1994).

Die NDH aus Stamm DSM 6920 zeichnet sich durch ein relativ enges Substratspektrum aus. Von den eingesetzten Verbindungen wurden nur Nikotinsäure, 6-Methylnikotinsäure und Quinolin-3-Carbonsäure mit signifikanter Rate umgesetzt. Interessant ist die Beobachtung, dass das Enzym für jedes Substrat ein spezifisches pH-Optimum aufweist (Schräder et al., 2001b). Dies wurde auch bei anderen Molybdoenzymen beobachtet und durch Änderungen des Ladungszustandes bestimmter Aminosäuren erklärt, die dann wiederum eine Veränderungen bei der Substratinteraktion zur Folge haben (Greelee und Hadler, 1964; Cleere und Coughlan, 1975). Obwohl die ermittelten V_{max}-Werte aller Substrate ähnlich waren, lag der K_m-Wert für Nikotinsäure mit ca. 150 µM etwa eine Größenordnung über den Werten der beiden anderen Substrate. Bei einem Vergleich des Substratspektrums der verschiedenen NDHs wird deutlich, dass nur das Enzym aus Stamm DSM 6920 in der Lage ist, 3-Carboxypyridin mit Substituenten in Position 5 und/oder 6 umzusetzen. Aufgrund ihrer Regioselektivität konnte keine der bekannten NDHs 3-Carboxyquinolin umsetzen. Nur die NDH aus *Eubacterium barkeri* (früher *Clostridium barkeri*) scheint 6-Methylnikotinsäure mit geringer Rate zu oxidieren (Nagel und Andreesen, 1990; Hurh et al., 1994; Gladyshev et al., 1996).

Bei der Umsetzung von Nikotinsäure bzw. 6-Methylnikotinsäure durch homogene NDH aus Stamm DSM 6920 konnten 2-OH-Nikotinsäure bzw. 2-OH-6-Methylnikotinsäure als Produkte identifiziert werden (Abb. 10; Schräder et al., 2001b). Dieses Ergebnis zeigt, dass die isolierte NDH die zuvor mit ganzen Zellen beobachtete Biotransformation dieser Verbindungen katalysiert. Nach der eingehenden Charakterisierung des Enzyms sind die Voraussetzungen für die Auswahl eines geeigneten Wirts zur heterologen Expression geschaffen. Dieser Wirt muß zur Biosynthese der benötigten Kofaktoren und deren Einbau in das Protein befähigt sein. Nach der Expression des aktiven Enzyms könnte es zur Herstellung von 2-OH-Nikotinsäure und anderen 2-hydroxylierten N-Heterozyklen eingesetzt werden.



Nikotinsäure 2-Hydroxynikotinsäure

Abb. 10: Regioselektive 2-Hydroxylierung von Nikotinsäure durch die NDH aus Stamm DSM 6920.

Aus patentrechtlichen Gründen war eine weitere Bearbeitung des Projekts in unserer Arbeitsgruppe leider nicht möglich. Interessant wäre hier neben der Entwicklung eines Expressionssystems insbesondere der Vergleich der Primärstrukturen der NDH aus Stamm DSM 6922 mit der NDH und 6-OH-NDH aus *B. niacini* und der INDH bzw. 2-OH-INDH aus *Mycobacterium* sp. INA1 (Nagel und Andreesen, 1990; Kretzer et al., 1993; Schräder et al., 1998). Da alle Enzyme relativ ähnliche Substrate umsetzen, könnte ein Sequenzvergleich Rückschlüsse auf die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren zulassen.

2.3. Die Selen-haltige Xanthin-Dehydrogenase aus *Eubacterium barkeri*

Wie bereits erwähnt, besitzt das anaerobe Bakterium *E. barkeri* eine Nikotinsäure-Dehydrogenase (NDH), die zur Klasse der Molybdoenzyme vom Xanthin-Oxidase-Typ gehört. Obwohl das Protein alle typischen Eigenschaften dieser Enzymfamilie aufweist, konnte schon sehr früh gezeigt werden, dass aktives Enzym nur gebildet wird, wenn Selenit im Wachstumsmedium vorhanden ist (Imhoff und Andreesen, 1979; Dilworth, 1982). Dieses Selen ist jedoch nicht -wie bei der Formiat-Dehydrogenase aus *E. coli*- in Form eines Selenocysteins kovalent am Enzym gebunden, sondern konnte als niedermolekulare Verbindung abgetrennt werden (Gladyshev et al., 1994; Gladyshev et al., 1996). Auf der Grundlage von EPR-Studien wurde postuliert, dass der Selen-Kofaktor in direkter Koordination zum Molybdän vorliegt (Gladyshev et al., 1994). Damit war die NDH aus *E. barkeri* das erste Enzym, für das ein solcher Selen-Kofaktor nachgewiesen werden konnte.

Beim Wachstum von *E. barkeri* auf verschiedenen Purinderivaten war eine NADP-abhängige Xanthin-Dehydrogenase(XDH)-Aktivität in Zellextrakten messbar. Diese Aktivität konnte durch Zugabe von Selenit zum Wachstumsmedium ca. um das 10-fache gesteigert werden (Schräder et al., 1999). Eine ähnliche Steigerung der Aktivität wurde bei Kontrollversuchen mit Nikotinsäure-gewachsenen Zellen auch für die NDH beobachtet. Die Möglichkeit, dass beide Substrate *in vivo* durch das selbe Selen-abhängige Enzym umgesetzt werden, konnte aufgrund der folgenden Ergebnisse ausgeschlossen werden: 1. Nach dem Wachstum von *E. barkeri* auf Nikotinsäure war keine signifikante XDH-Aktivität meßbar, und Hypoxanthin-gewachsene Zellen zeigten nur geringe NDH-Aktivitäten. 2. Extrakte von Nikotinsäure- bzw. Hypoxanthin-gewachsenen Zellen zeigten nach der Trennung im nativen Gel und anschließender Aktivitätsfärbung jeweils nur eine Bande. Diese Banden unterschieden sich in ihrem Laufverhalten deutlich voneinander (Schräder et al., 1999). *E. barkeri* besitzt demnach eine Selen-abhängige XDH, die nicht in den Nikotinsäure-Stoffwechsel involviert ist. Um weitere Aussagen über die Eigenschaften dieser XDH machen zu können, wurde ein Anreicherungsschema entwickelt, mit dem das Protein in homogener Form dargestellt werden konnte. Die isolierte XDH hatte ein natives Molekulargewicht von 530 kDa mit Untereinheiten von 17,5, 30 und 81 kDa, woraus sich eine $\alpha_4\beta_4\gamma_4$-Quartärstruktur ableiten läßt. Als Kofaktor wurde ein Molybdopterin nachgewiesen, das als Dinukleotid vorlag. Weiterhin wurden 0,7 mol FAD, 0,58 mol Molybdän, 0,28 mol Wolfram, 0,24 mol Selen, 4,4 mol Eisen und 4.6 mol säurelabiler Schwefel pro mol Protomer bestimmt (Schräder et al., 1999). Die homogene XDH setzte Hypoxanthin, Xanthin, Purin und 4-Aminoimidazol-5-Carboxylat mit signifikanter Rate um und konnte neben NADP die folgenden Elektronenakzeptoren nutzen: DCPIP, Methylviologen, Methylenblau und Sauerstoff. Nikotinsäure wurde von dem Enzym nicht oxidiert. Weiterhin konnte eine Inaktivierung durch Arsenit, Zyanid sowie verschiedene Purinderivate beobachtet werden (Schräder et al., 1999). Die meisten Eigenschaften der isolierten XDH stimmten somit mit denen der Molybdoenzyme aus der Xanthin-Oxidase-Familie überein. Als untypisch für diese Enzymklasse muß allerdings der Selen- und Wolframgehalt der XDH aus *E. barkeri* angesehen werden. Aufgrund der chemischen Ähnlichkeit von Wolfram und Molybdän können die beiden Elemente im aktiven Zentrum von Molybdoenzymen gegeneinander ausgetauscht werden, was dann häufig zum inaktiven Enzym führt (Johnson et al., 1974). Da die Gegenwart von Wolfram während des Wachstums von *E. barkeri* keinen Einfluß auf die XDH-Aktivität hatte, scheint ein solcher Austausch hier nicht stattzufinden oder das Protein ist auch mit Wolfram aktiv (Schräder et al., 1999). Aktive

Isoenzyme, die Wolfram oder Molybdän enthalten, wurden im Falle der Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Clostridium formicoaceticum* oder der Formylmethanofuran-Dehydrogenase aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *M. wolfei* beschrieben (Huber et al., 1994; Hochheimer et al., 1996; Hochheimer et al., 1998). Für die Trimethylamin-N-Oxid-Reduktase aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität beim Austausch von Molybdän gegen Wolfram nicht verlorengeht (Buc et al., 1999). Summiert man den Molybdän- und Wolframgehalt der XDH aus *E. barkeri,* so ergibt sich ein Wert von ca. 0,9, was dem erwarteten Wert von 1 mol Molybdän pro mol Protomer sehr nahe kommt. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass *E. barkeri* zwei XDH Isoenzyme besitzt, von denen das eine Molybdän und das andere Wolfram im aktiven Zentrum enthält.

Weitere Untersuchungen zum Einfluß von Selen auf die Aktivität der isolierten XDH aus *E. barkeri* führten zu folgenden Ergebnissen: 1.) Die XDH-Aktivität in Extrakten aus Zellen, die unter Selenmangel angezogen worden waren, konnte durch Zugabe von Selenverbindungen nicht erhöht werden. Wie durch immunologische Studien gezeigt werden konnte, war dies nicht auf eine verringerte XDH-Menge zurückzuführen, da Selenmangel keinen signifikanten Einfluß auf die Synthese des Enzyms hatte. 2.) Die XDH-Aktivität in Zellen, die unter Selenmangel angezogen wurden und deren Proteinbiosynthese durch Chloramphenikol gehemmt wurde, erhöhte sich nach Zugabe von Selenit signifikant im Vergleich zur Kontrolle ohne Selenit. 3.) Zyanid-inaktivierte XDH konnte in Gegenwart von Dithionit und Selenid bis zu 2/3 der Ausgangsaktivität reaktiviert werden (Schräder et al., 1999). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass für den Einbau des Selens offenbar der Biosyntheseapparat der Zelle benötigt wird. Weiterhin scheint der Selen-Kofaktor posttranslational eingebaut zu werden und somit kann das Selen nicht als Selenocystein im Enzym gebunden sein. Die Reaktivierbarkeit des Zyanid-inaktivierten Enzyms durch Selenid ließ vermuten, dass der Selen-Kofaktor direkt im katalytischen Zentrum der XDH lokalisiert ist. Interessanterweise wurde die NDH aus *E. barkeri* in Gegenwart von Zyanid nicht inaktiviert (Gladyshev et al., 1996). Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die XDH einen Selen-Kofaktor besitzt, der dem der NDH sehr ähnlichen ist.

Die Aldehyd-Oxidoreduktase aus *Desulfovibrio gigas* war bis vor kurzem das einzige Enzym aus der Xanthin-Oxidase-Familie, dessen Kristallstruktur aufgeklärt werden konnte (Romao et al., 1995). Die homodimere Struktur des Proteins und der fehlende Flavin-Kofaktor sind allerdings eher untypische Merkmale für diese Enzymklasse. Ein typischer Vertreter dieser Proteinfamilie ist dagegen die heterotrimere CO-Dehydrogenase aus *Oligotropha*

carboxidovorans, die ein Molybdopterin-Dinukleotid, FAD und Fe/S Zentren als Kofaktoren enthält. Kürzlich konnte die Kristallstruktur dieses Proteins und des analogen Enzyms aus *Hydrogenophaga pseudoflava* aufgeklärt werden (Dobbek et al., 1999; Hänzelmann et al., 2000). Die erhaltenen Daten zeigten, dass das katalytische Zentrum der genannten Enzyme offenbar deutliche Abweichungen von der für diese Proteinfamilie charakteristischen Struktur aufweist. Das für diese Proteine typische Schwefelatom ist mit einem Selenatom verbrückt, welches als S-Selanylcystein über den Schwefel eines Cysteinrestes im Protein gebunden ist (Abb. 11, Meyer et al., 2000). Der Cysteinrest, über den das Selenatom gebunden wird befindet sich in einem konservierten Sequenzmotiv, das auch bei anderen CO-Dehydrogenasen gefunden wurde. Da die Eigenschaften der XDH denen der CO-Dehydrogenase sehr ähnlich sind, könnte das katalytische Zentrum einen vergleichbaren Aufbau haben. Das S-Selanylcystein wäre dann direkt an der Hydroxylierung von Xanthin beteiligt.

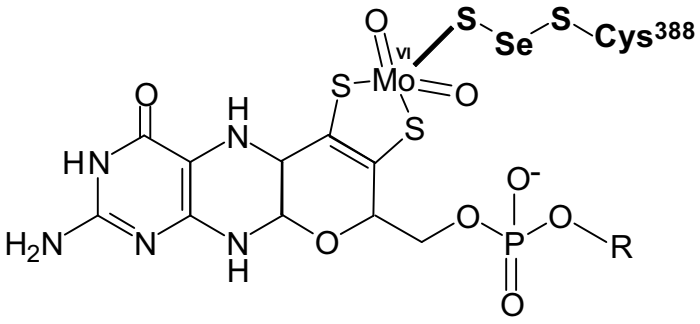


Abb. 11: Postulierter Aufbau des katalytischen Zentrums der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans.* (modifiziert nach Meyer et al., 2000). Das Selanylcystein und der Schwefelligand des Molybdäns über den es mit dem aktiven Zentrum verbunden ist, sind fettgedruckt.

3. Abbau von Tetrahydrofurfuryl-2-Alkohol durch *Ralstonia eutropha* Bo

Wie Tetrahydrofuran ist Tetrahydrofurfuryl-2-Alkohol (THFA) ein zyklischer xenobiotischer Ether mit einer zusätzlichen Alkoholfunktion in der Seitenkette (Abb. 12). In der chemischen Industrie wird diese Verbindung häufig als Lösungsmittel eingesetzt und entsteht in größeren Mengen bei der Synthese von Furanharzen. Mit den Abwässern der Industriebetriebe gelangt THFA in die Umwelt, wo die Verbindung aufgrund ihres

Lösungsmittelcharakters eine zytotoxische Wirkung entfalten kann. Über den Katabolismus dieser Substanz war bisher nichts bekannt, jedoch ließen die wenigen Untersuchungen zur Verwertung von THFA vermuten, dass dieser Ether biologisch nicht abgebaut wird (Wang et al., 1994; Bock et al., 1996). Detailliertere Studien existieren im Gegensatz dazu sowohl über den aeroben als auch anaeroben Abbau aromatischer Furanderivate (Brune et al., 1983; Trudgill, 1984; Koenig und Andreesen, 1990; Wang et al., 1994). Untersuchungen zum Abbau von Furfuryl-2-Alkohol in *Pseudomonas putida* Fu1 zeigten, dass diese Verbindung durch zwei verschiedene NAD-abhängige Dehydrogenasen über den Aldehyd bis zur Stufe der Carbonsäure oxidiert wird (Koenig und Andreesen, 1990). Nach der Aktivierung zum 2-Furoyl-Coenzym A erfolgt eine Hydroxylierung in Position 5, die durch eine spezifisch induzierte Molybdän-abhängige Dehydrogenase vom Xanthin-Oxidase-Typ katalysiert wird (Koenig und Andreesen, 1990).

Ziel der im folgenden vorgestellten Arbeiten war zunächst die Isolierung und Charakterisierung einer Reinkultur, die THFA mit möglichst hoher Rate abbauen kann und eine ausreichende Toleranz gegenüber diesem Lösungsmittel besitzt. Weiterhin sollten die am Abbau beteiligten Enzyme sowie die entsprechenden Gene identifiziert und charakterisiert werden.

3.1. Isolierung und Charakterisierung der THFA-abbauenden Reinkultur

Mit Anreicherungskulturen, die 30 mM THFA als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle enthielten, konnte aus einer Bodenprobe ein als Stamm Bo (DSM 11098) bezeichnetes Bakterium in Reinkultur isoliert werden, das diese Verbindung mit hoher Rate abbaut. Das bewegliche, stäbchenförmige, Gram-negative Bakterium wurde auf der Grundlage seiner chemotaxonomischen Eigenschaften als *Ralstonia eutropha* Stamm (früher *Alcaligenes eutrophus*) identifiziert (Zarnt et al., 1997). Eine bisher unveröffentlichte Analyse der 16S rRNA Sequenz (1461 bp) bestätigte diese taxonomische Einordnung, wobei die größten Homologien mit 99,2, 98,8, und 98,7 % Identität zu den 16S rRNA Sequenzen von *R. eutropha* HF33 (plasmidfreie Variante von *R. eutropha* H16 (DSM 428)), *Cupriavidus necator* (ATCC 43291) und dem *R. eutropha* Typstamm (DSM 531) bestanden.

Die wachstumsphysiologischen Untersuchungen mit Stamm Bo zeigten, dass er ein sehr breites Spektrum an verwertbaren Substraten besaß. Der Stamm akzeptierte verschiedene Amino- und Carbonsäuren und war ebenfalls in der Lage, auf einigen substituierten

Heterozyklen zu wachsen (Zarnt et al., 1997). Ein besonders gutes Wachstum wurde mit den meisten untersuchten Alkoholen beobachtet, wobei der Stamm auf THFA am schnellsten und auf 2-Propanol am langsamsten wuchs (Schräder et al., 2001a). Besonders hervorzuheben ist auch die hohe Toleranz von Stamm Bo gegenüber den getesteten Lösungsmitteln. So wurde THFA bis zu einer Konzentration von 200 mM ohne signifikanten Einfluß auf das Wachstum toleriert. Zucker, verschiedene Aminosäuren und unsubstituierte, aromatische oder gesättigte Heterozyklen konnten von Stamm Bo nicht als Wachstumssubstrate genutzt werden (Zarnt et al., 1997).

R. eutropha Bo ist damit das erste beschriebene THFA-abbauende Bakterium und bringt aufgrund des breiten Substratspektrums sowie der ausgeprägten Toleranz gegenüber verschiedenen Lösungsmitteln die notwendigen Voraussetzungen für einen *in situ* Einsatz zur Dekontamination von Abwässern mit.

3.2. Charakterisierung der THFA-Dehydrogenase

Mit der Isolierung einer THFA-verwertenden Reinkultur bestand erstmals die Möglichkeit, durch enzymatische Studien den Katabolismus dieser Verbindung näher zu untersuchen. In Analogie zum Abbau von Furfuryl-2-alkohol durch *P. putida* Fu1 wäre eine einleitende, durch NAD-abhängige Dehydrogenasen katalysierte Oxidation der Alkoholgruppe bis zur Stufe der Carbonsäure denkbar gewesen. Nach dem Wachstum von *R. eutropha* Stamm Bo auf THFA, Furfuryl-2-alkohol und verschiedenen aliphatischen Alkoholen konnte in allen Extrakten eine NAD-abhängige Alkohol-Dehydrogenase(ADH)-Aktivität nachgewiesen werden. Das oder die Enzym(e) zeigte(n) mit THFA aber keine Aktivität. Aus diesen Resultaten konnte geschlossen werden, dass das oder die Enzym(e) nicht am THFA-Abbau beteiligt sind (Zarnt et al., 1997; Schräder et al., 2001a). Auf die NAD-abhängigen ADHs und ihre Induktion beim Wachstum auf verschiedenen Alkoholen wird im folgenden Kapitel näher eingegangen. Neben den NAD-abhängigen ADH-Aktivitäten war nach dem Wachstum auf verschiedenen Alkoholen in Extrakten eine spezifisch induzierte Ferrizyanid- und Ca^{2+}-abhängige ADH-Aktivität meßbar, die THFA mit signifikater Rate umsetzte. Die höchsten spezifischen Aktivitäten wurden aber mit längerkettigen aliphatischen Alkoholen (C_4 und C_5) als Elektronendonator gemessen. Weitere Untersuchungen zum Induktionsmuster dieser ADH-Aktivität ließen vermuten, dass es sich entweder um ein Enzym handelt, das ein breites Substratspektrum besitzt oder das abhängig vom Wachstumssubstrat verschiedene Ferrizyanid-abhängige Enzyme induziert

werden (Zarnt et al., 1997; Schräder et al., 2001a). Da das Ziel der Untersuchungen in der Aufklärung des THFA-Abbauweges lag, stand die Charakterisierung der THFA-abhängigen ADH-Aktivität zunächst im Vordergrund. Ausgehend von Extrakten aus THFA-gewachsenen Zellen konnte eine Ferrizyanid-abhängige ADH 211-fach bis zur Homogenität angereichert werden. Das Molekulargewicht des monomeren Enzyms wurde mit 73,5 kDa bestimmt und der isoelektrische Punkt lag mit 9,1 im basischen Bereich. Die Kofaktoranalyse ergab einen Gehalt von 1 mol Pyrroloquinolin-Quinon (PQQ) und 1 mol Häm C pro mol Enzym. Weiterhin wird Ca^{2+} als Kofaktor benötigt, da es an der Bindung des PQQ beteiligt ist (Groen et al., 1986; Zarnt et al., 1997). Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass diese THFA-Dehydrogenase (THFA-DH) aus *R. eutropha* Bo zur Klasse der PQQ-abhängigen ADHs gehört (Anthony und Ghosh, 1998; Goodwin und Anthony, 1998). Je nach Kofaktoren lassen sich diese Enzyme in zwei Klassen einteilen. Die Quinoprotein-ADHs enthalten PQQ und Ca^{2+} als Kofaktoren, wohingegen die Quinohämoprotein-ADHs ein zusätzliches Häm c besitzen (Jongejan et al., 1998). Ein typischer Vertreter der Quinoprotein-ADHs ist die sehr intensiv untersuchte Methanol-Dehydrogenase aus methylotrophen Bakterien (Day und Anthony, 1990; Ghosh et al., 1995). Bei den Quinohämoprotein-ADHs unterscheidet man weiter zwischen ”Typ 1”- und ”Typ 2”-Enzymen (Jongejan et al., 1998). ”Typ 2”-Enzyme, die in Bakterien der Gattung *Acetobacter* und *Gluconobacter* gefunden wurden, bestehen aus mehreren verschiedenen Untereinheiten (Adachi et al., 1978; Matsushita et al., 1995). Die ”Typ 1”-Enzyme sind hingegen Monomere mit einem Molekulargewicht von ca. 70-80 kDa. Solche ADHs wurden bisher für *Comamonas testosteroni*, *P. putida* HK5, *Pseudomonas* sp. VM15C und *Rhodopseudomonas acidophila* beschrieben (Jong et al., 1995; Toyama et al., 1995; Shimao et al., 1996; Yasuda et al., 1996). Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften gehört auch die THFA-DH aus *R. eutropha* Bo zu den ”Typ 1”-Quinohämoprotein-ADHs und ist außerdem die erste PQQ-abhängige ADH, die für diese Gattung beschrieben wurde. Als charakteristische katalytische Eigenschaften dieser Enzyme, deren physiologischer Elektronenakzeptor bisher nicht bekannt ist, kann die Nutzung verschiedener künstlicher Elektronenakzeptoren und das extrem breite Substratspektrum angesehen werden (Goodwin und Anthony, 1998). Beides konnte auch für die THFA-DH bestätigt werden, die neben Ferrizyanid auch DCPIP und Cytochrom c reduzierte. Als Substrate wurden primäre, sekundäre und zyklische Alkohole ebenso umgesetzt wie Diole, Polyole und Aldehyde (Zarnt et al., 1997). Die Menge an verbrauchtem Elektronenakzeptor bei der Umsetzung verschiedener Alkohole durch die gereinigte THFA-DH deutete darauf hin, dass das Enzym

eine Oxidation des Alkohols über die Stufe des Aldehyds bis zur Carbonsäure katalysiert. Produktanalysen bestätigten diese Annahme, da in allen Fällen die entsprechende Carbonsäure als Reaktionsprodukt nachgewiesen wurde. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Aldehyd während der Katalyse als echtes Intermediat freigesetzt wird (Zarnt et al. 1997). Die THFA-DH katalysiert *in vivo* also mit großer Wahrscheinlichkeit die ersten beiden Oxidationsschritte beim THFA-Abbau (Abb. 12). THF-2-Aldehyd konnte als Zwischenprodukt nicht direkt nachgewiesen werden, da es kommerziell nicht verfügbar ist.

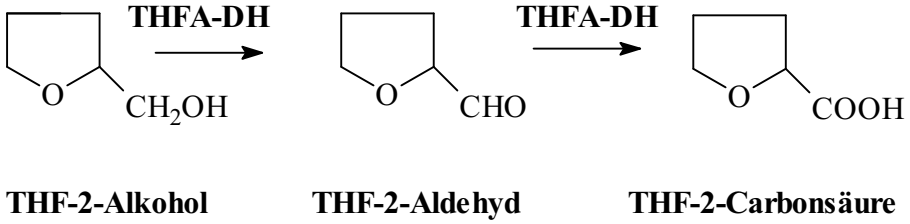


Abb. 12: Oxidation von THFA zur THF-2-Carbonsäure durch die THFA-DH aus *R. eutropha* Stamm Bo.

Eine Oxidation verschiedener Alkohole bis zur Stufe der Carbonsäure konnte auch für die Quinohämoprotein ADH (QH-ADH) aus *C. testosteroni* gezeigt werden (Geerlof et al., 1994). Auch die übrigen Eigenschaften dieses Enzyms, wie N-terminale Aminosäuresequenz, isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht waren denen der THFA-DH sehr ähnlich. Allerdings konnte die QH-ADH nur als Apoenzym isoliert werden, und eine Aktivität war erst nach externer Zugabe von PQQ meßbar (De Jong et al., 1995).

”Typ 1”-Quinohämoprotein ADHs wurden bisher sehr selten beschrieben. Die QH-ADH aus *C. testosteroni* ist bislang das einzige genauer charakterisierte Enzym aus dieser Familie (Jongejan et al., 1998). Aufgrund ihres breiten Substratspektrums und ihrer Stereoselektivität ist die QH-ADH auch aus biotechnologischer Sicht besonders interessant (Geerlof et al., 1994a; 1994b; 1994c). Aus diesen Gründen stand die eingehende kinetische und molekularbiologische Charakterisierung der THFA-DH im Mittelpunkt der weiteren Arbeiten.
Bei der Untersuchung des Substratspektrums der THFA-DH wurden insgesamt 33 verschiedene Alkohole und Aldehyde getestet. Nur Methanol, Glyzerin und Glucose konnten von dem Enzym nicht umgesetzt werden (Zarnt et al., 1997; 2001). Zur Überprüfung der katalytischen Effektivität wurden die k_{cat}/K_m-Werte für die meisten Substrate bestimmt. Die

für THFA ermittelten Umsatzraten waren niedriger als die k_{cat}/K_m-Werte für die primären und einige der sekundären aliphatischen Alkohole. Auch Furfuryl-2-alkohol wurde -wenn auch mit geringfügig höherer Rate- umgesetzt (Zarnt et al., 2001). Dieser Befund ließe sich unter der Annahme erklären, dass die THFA-DH *in vivo* an der Oxidation aller untersuchten Substrate beteiligt ist. Weitere Untersuchungen zur Induktion der THFA-DH beim Wachstum mit verschiedenen Alkoholen, zeigten jedoch, dass dies nicht der Fall ist (siehe nächstes Kapitel). Für die weitaus meisten der analysierten Verbindungen konnte eine Substratüberschusshemmung festgestellt werden, wobei Valeraldehyd den stärksten inbibitorischen Effekt hatte (Zarnt et al., 2001). Bei der Untersuchung der Stereoselektivität des Enzyms mit den reinen Enantiomeren verschiedener sekundärer aliphatischer Alkohole zeigte die THFA-DH eine deutliche Präferenz für das S(+)-Enantiomer. Im Gegensatz dazu wurde bei dem zyklischen Alkohol Solketal das R(-)-Enantiomer bevorzugt (Zarnt et al., 2001). Eine Analyse des kinetischen Mechanismus der THFA-DH, die mit verschiedenen Alkoholen und Aldehyden durchgeführt wurde, ergab für alle untersuchten Substrate einen Ping-Pong Mechanismus (Zarnt et al., 2001). Ein solcher Mechanismus scheint bei allen daraufhin untersuchten PQQ-abhängigen Dehydrogenasen vorzuliegen (Marcinkeviciene und Johanson, 1993; Geerlof et al., 1994a; Olsthoorn und Duine, 1998; Machado et al., 1999). Alle für die THFA-DH ermittelten kinetischen Daten stimmen im wesentlichen mit denen der QH-ADH aus *C. testosteroni* überein (Geerlof et al., 1994a; 1994b; 1994c; Stigter et al., 1997). Das breite Substratspektrum, die hohen katalytischen Aktivitäten und die Stereoselektivität lassen die THFA-DH als einen geeigneten Kandidaten zur Trennung razemischer Gemische optisch aktiver Alkohole erscheinen. Da *R. eutropha* Bo im Gegensatz zu *C. testosteroni* in der Lage ist, das Holoenzym zu synthetisieren, wäre eine externe Zugabe von PQQ bei der THFA-DH überflüssig.

Um weitere Informationen über die Struktur der THFA-DH zu erhalten, wurde das Gen kloniert und sequenziert. Das isolierte, als *tfaA* bezeichnete Gen ist in einfacher Kopie auf dem Chromosom lokalisiert und kodiert ein Protein, das aus 698 Aminosäuren besteht (TfaA). Die mittels Edman-Abbau bestimmte N-terminale Sequenz der THFA-DH entsprach exakt der TfaA Sequenz von Ala-28 bis Ala-57. Daher wurde vermutet, dass die THFA-DH ein Signalpeptid besitzt (Zarnt et al., 2001). Ein Sequenzanalyse dieses Peptids (van Heijne, 1983; Boyd und Beckwith, 1990) sowie ein multiples Alignment von ThfA mit den Sequenzen anderer Quino- und Quinohämoproteine bestätigten diese Annahme (Zarnt et al., 2001). Aufgrund ihrer engen Assoziation mit der Atmungskette sind die PQQ-abhängigen ADHs

gewöhnlich im Periplasma Gram-negativer Bakterien lokalisiert (Goodwin und Anthony, 1998). Dementsprechend wurde bei diesen Proteinen ein für die Translokation in den periplasmatischen Raum verantwortliches Signalpeptid gefunden. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist also auch die THFA-DH ein periplasmatisches Protein. Das theoretisch berechnete Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt von ThfA stimmten ebenfalls gut mit den experimentell für die THFA-DH ermittelten Daten überein. Die aus den erhaltenen Ergebnissen resultierende Schlussfolgerung, dass *tfaA* das für die THFA-DH kodierende Gen ist, wurde durch das multiple Sequenzalignment bestätigt (Zarnt et al., 2001). Die THFA-DH zeigte mit 67 % Sequenzidentität die größte Ähnlichkeit zur QH-ADH aus *C. testosteroni*. Aber auch die ”Typ 2”-Quinohämoproteine und die Methanol-Dehydrogenase wiesen signifikante Homologien zur THFA-DH auf. Im Gegensatz dazu war die Übereinstimmungen mit der Polyvinylalkohol-Dehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. VM15C, die zu den ”Typ 1”-Enzymen gehört, mit 24 % Identität, eher gering (Zarnt et al., 2001).

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der PQQ-bindenden Untereinheit verschiedener Methanol-Dehydrogenasen führte zur Identifizierung von Aminosäureresten, die an der Bindung des PQQ und des Ca^{2+}-Ions beteiligt bzw. für die Bildung eines sogenannten achtblättrigen β-Faltblatt-Propellers verantwortlich sind (White et al., 1993; Xia et al., 1992; Ghosh et al., 1995; Goodwin und Anthony, 1998). Auf der Grundlage dieser Strukturdaten wurden von Jongejan et al. (1998) Homologiestudien mit der QH-ADH aus *C. testosteroni* durchgeführt. Da die Methanol-Dehydrogenasen keinen Häm-Kofaktor hat, wurde die C-terminale Häm-bindende Domäne des Proteins anhand von Cytochromen modelliert, deren Struktur bekannt war und die eine -wenn auch geringe- Sequenzhomologie zur QH-ADH aufwiesen. Die erhaltenen Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die Topologie des N-terminalen Bereichs der QH-ADH im wesentlichen der Topologie der Methanol-Dehydrogenase entspricht (Jongejan et al., 1998). Eine Cytochrom c ähnliche Struktur wurde unter Einschränkungen für den C-terminalen Bereich des Enzyms postuliert. Da die THFA-DH eine hohe Sequenzhomologie zur QH-ADH aufweist und der C-terminale Teil bis zu 38 % Identität zu verschiedenen c-Typ Cytochromen zeigt, könnte eine solche Struktur auch für die THFA-DH postuliert werden. Wie aus dem multiplen Alignment ersichtlich war, scheinen die folgenden Strukturmerkmale in der THFA-DH konserviert zu sein (Zarnt et al., 2001): 1.) Der Disulfidring und der Trp-Rest, die mit dem PQQ in Form einer sogenannten Sandwichstruktur das katalytische Zentrum des Enzyms bilden (Anthony und Ghosh, 1998). Der Disulfidring ist während der Katalyse wahrscheinlich direkt an der Elektronenübertragung beteiligt (Avezoux

et al., 1995). 2.) Die sieben Trp-Reste, die eine wesentliche Rolle bei der Stabilisierung des β-Faltblatt-Propellerstruktur spielen (Anthony und Ghosh, 1998). 3.) Der Glu- und der Asn-Rest, die für die Komplexierung des Ca^{2+}-Ions verantwortlich sind (Anthony und Ghosh, 1998). 4.) Der Asp-Rest, für den postuliert wird, dass er als Base im katalytischen Zentrum fungiert (Anthony und Ghosh, 1998). 5.) Die Aminosäurereste, für die eine Beteiligung an der PQQ Bindung postuliert wird (Anthony und Ghosh, 1998) und 6.) Das C-terminale Cys-X-X-Cys-His Motiv, das für die Bindung des Häm-Kofaktors verantwortlich ist (Meyer und Kamen, 1982). Damit sind alle für die Katalyse wichtigen Strukturmerkmale konserviert, was die Vermutung nahelegt, dass der katalytische Mechanismus der THFA-DH dem der Methanol-Dehydrogenase sehr ähnlich ist. Der Abfluß der Elektronen erfolgt laut Hypothese unter Beteiligung des Disulfids (Anthony und Ghosh, 1998). Bei den Quinohämoproteinen würden die Elektronen dann intramolekular auf den Häm-Kofaktor übertragen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es sich beim initialen Enzym des THFA-Abbaus in *R. eutropha* Bo um eine Quinohämoprotein-ADH vom ”Typ 1” handelt, die das Substrat bis zur Stufe der Carbonsäure oxidiert.

3.3. Untersuchungen zur Induktion von Alkohol- und Aldehyd-Dehydrogenasen beimWachstum von *R. eutropha* Bo auf verschiedenen Alkoholen

Wie im letzten Kapitel beschrieben, katalysiert die THFA-DH beim Wachstum von *R. eutropha* Bo auf THF die Oxidation des Alkohols bis zur Stufe der Carbonsäure. Aktivitätsmessungen mit verschiedenen Substraten ließen zudem vermuten, dass das Enzym auch beim Wachstum auf anderen Alkohole für deren Oxidation verantwortlich sein könnte. Es wäre aber ebenso denkbar, dass andere oder zusätzliche Ferrizyanid-abhängige Enzyme an der Umsetzung dieser Alkohole beteiligt sind. Die signifikant voneinander abweichenden Verhältnisse der spezifischen Aktivitäten in Extrakten von Zellen, die auf unterschiedlichen Alkoholen gewachsen waren, unterstützen letztere Hypothese.

Proteine mit einem Häm-Kofaktor können in Zellextrakten nach deren Trennung im SDS-Gel über eine spezifische Hämfärbung nachgewiesen werden (Thomas et al., 1976). Nach dem Wachstum von *R. eutropha* Bo auf THFA, Furfuryl-2-alkohol, Ethanol, 2-Propanol, n-Pentanol oder 1,5-Pentandiol ergab eine Hämfärbung das folgende Bild: 1.) Eine deutliche 73 kDa Bande (THFA-DH) konnte nur in THFA- und n-Pentanol-gewachsenen Zellen detektiert werden. 2.) In n-Pentanol- und Furfuryl-2-Alkohol- sowie in sehr geringen Mengen auch in

Ethanol-gewachsenen Zellen war eine zweite Bande bei ca. 67 kDa zu erkennen. 3.) Weitere Banden im Bereich von 25-40 kDa waren bei allen vier Alkoholen vorhanden (Schräder et al., 2001a). Wie schon die Aktivitätsmessungen in Extrakten nahelegten, wird die THFA-DH von *R. eutropha* Bo somit nur beim Wachstum auf THFA und n-Pentanol in signifikanten Mengen gebildet. Die theoretische Möglichkeit eines n-Pentanol-spezifischen 73 kDa Proteins sollte durch die hohen Aktivitäten der THFA-DH mit diesem Substrat ausgeschlossen sein. Interessant ist die Tatsache, dass die gereinigte THFA-DH Furfuryl-2-Alkohol mit hoher Rate umsetzt, aber keine Enzymaktivität in Extrakten aus Furfuryl-2-Alkohol-gewachsenen Zellen meßbar war. Bei der 67 kDa Bande könnte es sich um eine zweite Quinohämoprotein-ADH handeln, die an der Oxidation von Furfuryl-2-Alkohol und n-Pentanol beteiligt ist. Beim Wachstum von *P. putida* HK5 auf verschiedenen Alkoholen konnten zwei Quinohämoprotein- und eine Quinoprotein-ADH nachgewiesen werden, deren Induktion abhängig vom Wachstumssubstrat war (Toyama et al., 1995). Für die beiden Quinohämoprotein-ADHs wurde ein Molekulargewicht von 72 bzw. 69 kDa bestimmt, was sehr gut mit den 73 und 67 kDa Banden übereinstimmt. In Extrakten aus Furfuryl-2-Alkohol-gewachsenen Zellen war eine relativ geringe Ferrizyanid-abhängige ADH-Aktivität meßbar, obwohl keine THFA-DH nachgewiesen werden konnte (Schräder et al., 2001a). Eine zweite Quinohämoprotein-ADH, die aufgrund der nicht optimierten Testbedingungen geringe Aktivitäten mit diesem Substrat zeigt, würde diese Beobachtung erklären. Die physiologische Rolle der kleineren Häm-enthaltenden Proteine, die auf verschiedenen Alkoholen spezifisch induziert wurden, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Es bleibt ebenso offen, ob *R. eutropha* Bo, wie *P. putida* HK5 beim Wachstum auf verschiedenen Alkoholen eine zusätzliche Quinoprotein-ADH induziert. Auch die Frage, welche Quinohämoprotein ADH(s) jeweils beim Wachstum auf verschiedenen Alkoholen induziert werden, bedarf der weiteren Analyse.

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, waren nach dem Wachstum von *R. eutropha* Bo auf verschiedenen Alkoholen neben der Ferrizyanid-abhängigen ADH-Aktivität auch NAD-abhängige ADH-Aktivitäten in den entsprechenden Extrakten meßbar. Abhängig von den Wachstumsbedingungen wurden auch bei anderen *R. eutropha* Stämmen verschiedene NAD(P)-abhängige ADHs gefunden (Steinbüchel und Schlegel, 1984; Steinbüchel et al., 1987; Jendrossek et al., 1990; Madyastha und Gururaja, 1995). Bei molekularbiologischen Untersuchungen von *C. testosteroni* und *Pseudomonas aeruginosa* konnten in Nachbarschaft der PQQ-ADH Gene offene Leserahmen identifiziert werden, die für hypothetische Proteine mit großer Ähnlichkeit zu NAD(P)-abhängigen Aldehyd-Dehydrogenasen (AlDHs) kodieren

(Stoorvogel et al., 1996; Schobert und Görisch, 1999). Drei verschiedene Acetaldehyd-Dehydrogenasen konnten auch für *R. eutropha* H16 nachgewiesen werden (Jendrossek et al., 1987), und die putative AlDH aus *P. aeruginosa* zeigte eine hohe Sequenzhomologie zu einem dieser Enzyme (Priefert et al., 1992; Schobert und Görisch, 1999). Obwohl PQQ-abhängige ADHs eine Oxidation des Alkohols bis zur Carbonsäure katalysieren können, deuteten die beschriebenen Ergebnisse darauf hin, dass eventuell auch NAD(P)-abhängige ADHs und/oder AlDHs an deren Abbau beteiligt sein könnten. Die Lokalisation der PQQ-abhängigen ADHs im Periplasma könnte ebenfalls eine Grund für das zusätzliche Vorhandensein zytoplasmatischer NAD(P)-abhängiger ADHs und/oder AlDHs sein.

Nach dem Wachstum von *R. eutropha* Bo auf THFA, Furfuryl-2-alkohol, Ethanol, 2-Propanol, n-Pentanol oder 1,5-Pentandiol wurden die entsprechenden Zellextrakte mittels Chromatographie und nativer Gelelektrophorese getrennt. Bei der anschließenden Aktivitätsfärbung konnten in allen Extrakten vier NAD(P)-abhängige ADHs beobachtet werden, deren Banden sich lediglich in ihrer Intensität unterschieden (Schräder et al., 2001a). Daraus wurde geschlossen, dass keines dieser Enzyme spezifisch durch einen der untersuchten Alkohole induziert wird. Deshalb erfolgte keine weitere Charakterisierung der Enzyme.

Ein völlig anderes Bild ergab sich bei einer analog durchgeführten Analyse der NAD(P)-abhängigen AlDHs (Schräder et al., 2001a). Mit Acetaldehyd bzw. Valeraldeyd als Substrat konnten bei der Aktivitätsfärbung insgesamt vier verschiedene Enzyme detektiert werden (AlDH 1-4). Diese Enzyme unterschieden sich deutlich bezüglich ihres Induktionsmusters. Die AlDH 1 ist ein 240 kDa Protein, das in allen Extrakten vorhanden war. Eine sehr spezifische Induktion wurde im Gegensatz dazu für die AlDH 2 (185 kDa) beobachtet. Obwohl diese Enzym Valeraldehyd umsetzte, wurde es nur beim Wachstum auf THFA induziert. Diese Ergebnis ließ auf eine Beteiligung der AlDH 2 am THFA Abbau schließen. Leider war die Aktivität sehr instabil, so dass keine weiteren Untersuchungen mit dem aktiven Enzym durchgeführt werden konnten. Für die AlDH 3 (170 kDa) konnte eine deutliche Induktion nur in Furfuryl-2-alkohol-, Ethanol und 2-Propanol-gewachsenen Zellen beobachtet werden. Somit ist das Enzym am THFA-Katabolismus nicht beteiligt. Ein der THFA-DH entsprechendes Induktionsmuster wurde für die AlDH 4 (110 kDa) gefunden (Schräder et al., 2001a). Nur nach dem Wachstum auf THFA und n-Pentanol war eine entsprechende Aktivitätsbande nachweisbar. Um weitere Informationen über dieses Protein zu erhalten, wurde es aus THFA-Zellen isoliert. Für das gereinigte Protein konnte im SDS-Gel ein Molekulargewicht von 52 kDa bestimmt werden, woraus sich eine homodimere Struktur ableiten läßt. Im UV-Vis-

Spektrum zeigte das Enzym lediglich ein Absorptionsmaximum bei 279 nm, was darauf schließen läßt, dass es keine prosthetischen Gruppen besitzt. Ein Datenbankabgleich der N-terminalen Sequenz der AlDH 4 ergab die höchsten Homologien zu verschiedenen AlDHs eukaryontischen oder prokaryontischen Ursprungs (Schräder et al., 2001a). Da die meisten dieser Enzyme nur auf molekularbiologischer Ebene analysiert wurden, ließ sich aus diesem Vergleich keine Informationen über die physiologische Funktion der AlDH 4 ableiten. Die Sequenzhomologien zu den bereits erwähnten AlDHs aus *P. aeruginosa* und *R. eutropha* H16 waren mit weniger als 20 % sehr gering. Alle strukturellen Eigenschaften der AlDH 4 stimmen mit denen anderer AlDHs im wesentlichen überein (Jendrossek et al., 1987; Shaw und Harayama, 1990; Achterhold et al., 1998). Der höchste V_{max}-Wert der AlDH 4 wurde für Acetaldehyd bestimmt, und mit zunehmender Kettenlänge des Aldehyds von C_3 bis C_5 nahm dieser Wert ab. Dies war auf eine starke Substrathemmung der AlDH 4 zurückzuführen, die mit der Kettenlänge des Aldehyds zunahm (Schräder et al., 2001a). Da THF-2-Aldehyd kommerziell nicht verfügbar ist, konnte dessen Umsatz durch die AlDH 4 nicht direkt untersucht werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Bildung von THF-2-carbonsäure durch die THFA-DH in Gegenwart der AlDH 4 meßbar beschleunigt wird (Schräder et al., 2001a). Ähnliche Resultate wurden auch mit n-Pentanol als Substrat erhalten. Aus diesem Ergebnis und dem Induktionsmuster der AlDH 4 läßt sich ableiten, dass das Enzym *in vivo* an der Oxidation von THFA und n-Pentanol beteiligt sein muss.

Aus den dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass beim Wachstum von *R. eutropha* Bo auf THFA neben der THF-2-Aldehyd-umsetzenden THFA-DH zwei NAD(P)-abhängige AlDHs gebildet werden. Die AlDH 4 ist mit großer Wahrscheinlichkeit ebenfalls in der Lage, THF-2-Aldehyd zu oxidieren, und aufgrund der sehr spezifischen Induktion kann dies auch für die AlDH 2 angenommen werden. Damit würde der Organismus über drei Enzyme verfügen, die das gleiche Substrat umsetzen. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte die hohe Toxizität von Aldehyden sein, die es notwendig macht, auch geringe Spuren dieser Substanzen zu beseitigen. Jedes Enzym könnte in einem bestimmten Konzentrationsbereich die optimale Umsetzung des Aldehyds gewährleisten. Dies würde eine strenge Regulation der AlDHs voraussetzen, was wiederum die Ursache für die beobachtete Substrathemmung der THFA-DH und AlDH 4 sein könnte. Die Lokalisation der THFA-DH im Periplasma könnte ein weiterer Grund für die Induktion zusätzlicher zytoplasmatischer, NAD(P)-abhängiger Enzyme sein. Alternativ wäre denkbar, dass eine oder beide NAD(P)-abhängige AlDHs für die Oxidation von Aldehyden verantwortlich sind, die im weiteren Abbauweg entstehen. Die Aufklärung der

physiologischen Funktion der verschiedenen ADHs und AlDHs beim Wachstum von *R. eutropha* Bo auf THFA und anderen Alkoholen sowie deren Regulation bedarf weiterer intensiver Forschungsarbeit.

Ausblick

In den vorangegangenen Kapiteln wurden Untersuchungen zum Abbau bzw. zur Biotransformation von sieben verschiedenen Heterozyklen durch insgesamt sieben verschiedene Bakterienstämme vorgestellt. Vier dieser Verbindungen haben aromatischen Charakter und sind natürlich vorkommende Stoffwechselintermediate. Bei den drei verbleibenden handelt es sich um gesättigte Substanzen xenobiotischen Ursprungs. Von den beteiligten Bakterienstämmen sind zwei Gram-negativ und fünf Gram-positiv. Aufgrund der breiten thematischen Streuung der bearbeiteten Projekte, ist eine Eingrenzung des zukünftigen wissenschaftlichen Aktivitäten notwendig. Im folgenden wird dargelegt, wo die Schwerpunkte der weiteren Arbeiten liegen sollen.

Bei den Untersuchungen zur Biotranformation der aromatischen Heterozyklen Nikotinsäure, Isonikotinsäure und Xanthin konnte jeweils eine Molybdän-abhängige Dehydrogenase vom Xanthin-Oxidase Typ isoliert und charakterisiert werden, die eine Hydroxylierung des aromatischen Ringsystems katalysiert. Insbesondere die Selen-haltige Xanthin-Dehydrogenase aus *E. barkeri* und die Nikotinsäure-Dehydrogenase aus Stamm DSM 6920, die eine regioselektive Hydroxylierung des Substrats in Position zwei katalysiert, würden sich für weitere Untersuchungen anbieten. Ein Vergleich der dreidimensionalen Struktur der Xanthin-Dehydrogenase mit der Struktur der CO-Dehydrogenase aus *O. carboxidovorans* und die heterologe Expression der Nikotinsäure-Dehydrogenase zur Gewinnung großer Mengen dieses Biokatalysators für den biotechnologischen Einsatz wären interessante Forschungsprojekte. Andererseits ist der Abbauweg aller drei Verbindungen in der Literatur bereits eingehend beschrieben worden. Neue wissenschaftliche Aspekte ergeben sich somit nur für die weitere Analyse der isolierten Enzyme. Für keines der drei genannten Enzyme liegen bisher molekularbiologische Daten vor, was als notwendige Voraussetzung für eine detaillierte Untersuchung dieser komplex aufgebauten Dehydrogenasen angesehen werden muß. Die Daten der Nikotinsäure-Dehydrogenase unterliegen zudem einem patentrechtlichen Schutz. Aus diesen Gründen und zur Konzentrierung der Forschungsschwerpunkte sind weitere Untersuchungen zu diesen Enzymen zunächst nicht geplant.

Weitreichendere Perspektiven bieten sich bei der Fortführung der Projekte zum Abbau der heterozyklischen Substrate Pyrrol-2-carboxylat (P2C), Morpholin und Tetrahydrofuran (THF), die thematisch durch die beschriebenen initialen Monooxygenasen verknüpft sind. Für keine der drei Verbindungen ist es bisher gelungen, den Abbauweg vollständig aufzuklären. Auch über die daran beteiligten Enzyme ist nichts oder wenig publiziert. Sowohl die weitere Analyse jeder einzelnen Monooxygenase als auch eine vergleichende Untersuchung der vier Enzyme, die bezüglich ihrer strukturellen Eigenschaften beinahe das gesamte Spektrum bekannter Monooxygenase-Systeme abdecken, sollen ein Schwerpunkt der zukünftigen Forschungsarbeiten sein. Da die Gene dieser Monooxygenasen bereits kloniert und zum größten Teil auch sequenziert wurden, ist eine wesentliche Voraussetzung für diese Arbeiten bereits geschaffen. Bei den Bakterienstämmen, die auf den genannten heterozyklischen Substraten wachsen, handelt es sich ausschließlich um Gram-positive Eigenisolate, die zu den Actinomyceten gehören. Für diese Organismen konnte bisher lediglich die Gattung eindeutig bestimmt werden. Da die wachstumsphysiologischen Daten vermuten lassen, dass es sich um noch nicht beschriebene, neue Arten handeln könnte, soll dies in Kooperation mit der DSMZ geklärt werden.

Die zukünftigen Forschungsarbeiten sollen sich aus den dargelegten Gründen auf die weitere Untersuchung des P2C-, THF- und Morpholin-Abbaus sowie der daran beteiligten Enzyme konzentrieren. Die geplanten Schwerpunkte der einzelnen Projekte sind im folgenden kurz skizziert.

Die Ein- bzw. Zweikomponenten-P2C-Monooxygenasen aus *Arthrobacter* sp. Py1 bzw. *Rhodococcus* sp. Sedi2 gehören zu einer völlig neuen Klasse Flavin-abhängiger Monooxygenasen, über deren Eigenschaften bisher sehr wenig bekannt ist. Zur Identifizierung konservierter Aminosäurereste, die für die Funktion essentiell sind, sowie zur Aufdeckung struktureller Unterschiede, soll die Primärstruktur beider Enzyme untereinander und mit verwandten Enzymen verglichen werden. Die Etablierung eines Systems zur heterologen Expression der beiden Proteine, soll die Möglichkeit eröffnen, die Auswirkungen des gezielten Austausches einzelner Aminosäuren oder der Deletion ganzer Sequenzbereiche auf die Enzymaktivitäten zu untersuchen. Auf diese Weise könnten dann auch ausreichende Mengen der homogenen Enzyme für weitere biochemische Untersuchungen gewonnen werden. Aufgrund des hohen G+C-Gehalts der DNA bietet sich *Streptomyces lividans* TK24 als Wirtsorganismus an, der bereits zur heterologen Expression anderer Monooxygenase-Systeme eingesetzt wurde (Binnie et al., 1997; Smith et al., 1999). Eine Analyse der katalytischen

Aktivitäten nach kreuzweiser Komplementierung der P2C-Monooxygenasen untereinander oder mit FAD:NAD(P)H-Oxidoreduktasen anderer Organismen wie dem Fre-Protein aus *E. coli* könnte Aufschluß über die Funktion der Enzym-Komponenten geben. Auf biochemischer Ebene soll versucht werden, über eine spezifische chemische Modifikation der Enzyme Aminosäurereste zu identifizieren, die essentiell für die Katalyse sind. Auch Stop-Flow Experimente sollen zur Aufklärung des Katalysemechanismus eingesetzt werden. Da bisher nicht bekannt ist, welche weiteren Enzyme am P2C-Abbau beteiligt sind, liegt es nahe, die Sequenzbereiche stromauf- und stromabwärts der Monooxygenase-Gene zu analysieren. Sollten sich hieraus Informationen über katabole Enzyme ableiten lassen, könnten diese biochemisch analysiert werden.

Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen sind für Bakterien bisher relativ selten beschrieben worden. Dies scheint unter anderem an der extremen Instabilität der Enzymaktivität zu liegen. Insbesondere die P450-abhängige Monooxygenasen, für die eine Beteiligung am Abbau der zyklischen Amine Morpholin, Pyrrolidin und Piperidin postuliert wird, sind auf biochemischem Weg offenbar nicht zugänglich. Da die Gene von $P450_{mor}$ und Fd_{mor} aus *Mycobacterium* sp. HE5 inzwischen kloniert wurden, sind die Voraussetzungen für eine heterologe Expression des aktiven Enzyms zum *in vivo* Nachweis der Aktivität geschaffen. Als geeigneter Wirt würde sich *M. smegmatis* mc^2155 anbieten, das einer genetischen Manipulation zugänglich ist und Morpholin nicht verwerten kann (Guilhot et al., 1994; Poupin et al., 1999a). In diesem Organismus wurden auch die beschriebenen Gene *pipA* und *orf1* identifiziert, deren Produkte in den Abbau von Pyrrolidin und Piperidin involviert sind und hohe Homologien zu $P450_{mor}$ und Fd_{mor} aus *Mycobacterium* sp. HE5 haben (Poupin et al., 1999a). Ein Vergleich der Primärstruktur der Enzyme könnte Aufschluß darüber geben, welche Aminosären für die jeweilige Substratspezifität verantwortlich sind. Außerdem ließe sich die fehlende, offenbar unspezifische Reduktase durch entsprechende Enzyme des Wirts ersetzen. Da über die Reduktase-Komponente vieler P450-abhängiger Monooxgenasen bisher wenig bekannt ist, soll versucht werden dieses, unabhängig vom Wachstumssubstrat exprimierte Protein, aus Rohextrakten zu reinigen. Eine Identifizierung weiterer, am Morpholin-Abbau durch *Mycobacterium* sp. HE5 beteiligter Enzyme, sollte mittels molekularbiologischer oder enzymatischer Untersuchungen möglich sein. Die physiologische Rolle der isolierten L-Alanin-Dehydrogenase soll durch weitere Studien ebenfalls geklärt werden.

Im Mittelpunkt der zukünftigen Untersuchungen zum THF-Abbau steht zunächst der Nachweis der THF-Monooxygenase-Aktivität. Wie die bisherigen Experimente gezeigt haben, kommt es beim Zellaufschluß offenbar zum vollständigen Verlust dieser Aktivität. Mittels heterologer Expression der THF-Monooxygenase soll deshalb versucht werden, die Aktivität in ganzen Zellen nachzuweisen. Die Multikomponenten-Alken-Monooxygenase aus *R. rhodochrous* konnte in *Streptomyces lividans* TK24 aktiv exprimiert werden, so dass dieses System auch für die THF-Monooxygenase aus *Pseudonocardia* sp. K1 geeignet sein sollte (Smith et al., 1999). Nach der Etablierung eines solchen Expressions-Systems, könnten auch sehr interessante Experimente zur Reduktase-Komponente der THF-Monooxygenase durchgeführt werden. Sollte der FAD-Kofaktor auch nach der heterologen Expression kovalent gebunden sein, so wäre dies ein Beweis für einen autokatalytischen Prozeß. Unabhängig davon soll der genaue Ort der FAD-Bindung im Enzym bestimmt werden. Direkt neben den *thm*-Genen der THF-Monooxygenase liegt das *sad*-Gen einer Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase, die für die Oxidation eines beim THF-Abbau gebildeten Intermediates verantwortlich ist. Es ist somit anzunehmen, dass in diesem Gen-Cluster noch weitere Enzyme des THF-Abbaus kodiert sind. Auch die Frage, ob und wenn ja welche Proteine durch *orfY*, *orfZ* und *aldH* kodiert werden und welche Funktion diese Proteine haben, bedarf der weiteren Analyse. Die Regulation der Transkription der *thm*- und des *sad*-Gens ist scheinbar sehr komplex und soll ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Da der Fokus der zukünftigen Forschungsarbeiten zunächst auf den beschriebenen Monooxygenase-Systemen liegen soll, sind weiterführende Untersuchungen zum Tetrahydrofurfuryl-Alkohol (THFA)-Abbau durch *R. eutropha* Bo vorerst nicht geplant. Für einen späteren Zeitpunkt würde sich aufgrund des breiten Substratspektrums, der hohen katalytischen Aktivität und Stabilität eine heterologe Expression der PQQ-abhängigen THFA-Dehydrogenase zur biotechnologischen Herstellung reiner Enantiomere optisch aktiver Alkohole anbieten. Mit großen Mengen dieses Biokatalysators ließe sich eine wirtschaftliches Produktionsverfahren etablieren. Aus wissenschaftlicher Sicht ist auch der weitere Weg des THFA-Abbaus interessant, der bisher nicht aufgeklärt werden konnte.

Die vergleichende Analyse der verschiedenen Monooxygenase-Systeme eröffnet die Möglichkeit, wichtige Fragen in Bezug auf die evolutionäre Entwicklung ihrer katalytischen und strukturellen Eigenschaften zu klären. Warum unterscheiden sich die Monooxygenasen so deutlich in ihrer Struktur? Sind die verschiedenen Monooxygenase-Systeme durch divergente oder convergente Evolution entstanden? Welches System ist aus welchem hervorgegangen?

Welche Rolle spielen Genfusionen und Gendeletionen? Warum werden identische Substrate durch vollkommen verschiedene Monooxygenasen umgesetzt? Wie haben sich die Enzym-Systeme entwickelt, die am Abbau xenobiotischer Substanzen beteiligt sind? Gibt es Monooxygenase-Systeme, die spezifisch für bestimmte Organismen-Gruppen sind? Ein Beitrag zur Beantwortung dieser schwierigen Fragen soll durch eine detaillierte Analyse der beschriebenen Monooxygenase-Systeme geleistet werden. Auch die Untersuchung des weiteren Abbaus der Verbindungen bzw. der daran beteiligten Enzyme, kann hierfür wichtige Informationen liefern.

Die hier isolierten und in der Literatur beschriebenen Bakterienstämme, die zum Abbau der Lösungsmittel THF oder Morpholin befähigt sind, besitzen eine Gram-positive Zellwand. Die Morpholin-abbauenden Bakterien scheinen sogar ausschließlich zur Familie der Mycobacterien zu gehören. Hieraus ergibt sich die Frage, ob und wenn ja, welcher Zusammenhang zwischen der Struktur der Zellwand und der Resistenz gegenüber den Lösungsmitteln besteht. Das Gram-negative Bakterium *R. eutropha* Bo ist ebenfalls in der Lage auf einem Lösungsmittel (THFA) zu wachsen. Somit bietet sich eine vergleichende Studie zu den jeweiligen Resistenzmechanismen an.

Literatur

Achterholt, S., Priefert, H. & Steinbüchel, A. (1998) Purification and characterization of the coniferyl aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas* sp. strain Hr199 and molecular characterization of the gene. J. Bacteriol. 180, 4387-4391.

Adachi, O., Miyagawa, E., Shinagawa, E., Matsushita, K. & Ameyama, M. (1978) Purification and properties of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti.* Agric. Biol. Chem. 42, 2331-2340.

Adams, E. & Frank, L. (1980) Metabolism of proline and the hydroxyprolines. Ann. Rev. Biochem. 49, 1005-1061.

Aharonowitz, Y. & Friedrich, C. G. (1980) Alanine dehydrogenase of the ß-lactam antibiotic producer *Streptomyces clavuligerus.* Arch. Microbiol. 125, 137-142.

Alvarez, M. E. & McCarthy, C. M. (1984) Glutamine synthetase from *Mycobacterium avium.* Can. J. Microbiol. 30, 353-359.

Andersen, A. B., Andersen, P. & Ljungqvist, L. (1992) Structure and function of a 40,000-molecular-weight protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis.* Infect. Immun. 60, 2317-2323.

Anon (1989) Final report on the safety assessment of morpholine. J. Amer. Coll. Toxicol. 8, 707-748.

Anthony, C. & Ghosh, M. C. (1998) The structure and function of the PQQ-containing quinoprotein dehydrogenases. Progr. Biophys. Mol. Biol. 69, 1-21.

Arisawa, A., Tsunekawa, H., Okamura, K. & Okamoto, R. (1995) Nucleotide sequence analysis of the carbomycin biosynthetic genes including the 3-O-acyltransferase gene from *Streptomyces thermotolerans.* Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 582-588.

Arnold, F. H. & Volkov, A. A. (1999) Direct evolution of biocatalysts. Curr. Opin. Biol. 3, 54-59.

Arunachalam, U., Massey, V. & Vaidyanathan, C. S. (1992) p-Hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase. J. Biol. Chem. 267**,** 25848-25855**.**

Arunachalam, U. & Massey, V. (1994) Studies on the oxidative half-reaction of p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase. J. Biol. Chem. 269, 11795-11801.

Arunachalam, U., Massey, V. & Miller, S. M. (1994) Mechanism of p-hydroxyphenylacetate-3-hydroxylase. J. Biol. Chem. 269, 150-155.

Avezoux, A., Goodwin, M. G. & Anthony, C. (1995) The role of the novel disulphide ring in the active site of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens.* Biochem. J. 307, 735-741.

Balou, D. P. (1984) Flavoprotein monooxygenases. In: Flavins and flavoproteins, S. 605-618, de Gruyter Verlag, Berlin, New York.

Becker, D., Schräder, T. & Andreesen, J. R. (1997a) Pyrrole-2-carboxylate monooxygenase from *Rhodococcus* sp. belongs to the new type of two component flavin aromatic monooxygenases. In: Flavins and Flavoproteins, S. 375 - 378, UBC Press, Vancouver.

Becker, D. Schräder, T. & Andreesen, J. R. (1997b) Two-component, flavin-dependent pyrrole-2-carboxylate monooxygenase from *Rhodococcus* sp. Eur. J. Biochem. 249, 739 - 747.

Beltrametti, F., Marconi, A., Bestetti, G., Colombo, C., Calli, E., Ruzzi, M. & Zennaro, E. (1997) Sequencing and functional analysis of styrene catabolism genes from *Pseudomonas fluorescens ST.* Appl. Environ. Microbiol. 63, 2232-2239.

Bernhardt, B. and Diekmann, H. (1991) Degradation of dioxane, tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental *Rhodococcus* strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 120-123.

Binnie, C., Cossar, J. D & Stewart, D. I. (1997) Heterologous biopharmaceutical protein expression in *Streptomyces.* Trends. Biotechnol. 15, 315-320.

Blanc, V., Lagneaux, D., Didier, P., Gil, P., Lacroix, P. & Crouzet, J. (1995) Cloning and analysis of structural genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the conversion of pristinamycin II_B to pristinamycin II_A(PII_A): PII_A synthase and NADH:riboflavin 5`-phosphate oxidoreduktase. J. Bacteriol. 177, 5206-5214

Bock, C., Kroppenstedt, R. M. & Diekmann, H. (1996) Degradation and bioconversion of aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Rhodococcus ruber* 219. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45, 408-140.

Boyd, D., & Beckwith, J. (1990) The role of charged amino acids in the localization of secreted and membrane proteins. Cell 62,1031-1033.

Brune, G. Schoberth, S. M. & Sahm, H. (1983) Growth of a strictly anaerobic bacterium on furfural (2-furaldehyde). Appl. Environ. Microbiol. 46, 1187-1192.

Buc, J., Santini, C. L., Giordani, R., Czjzek, M., Wu, L. F. & Giordano, G. (1999) Enzymatic and physiological properties of the tungsten-substituted molybdenum TMAO reductase from *Eschericia coli.* Mol. Microbiol. 32, 159-168.

Bull, A. T., Bunch, A. W. & Robinson, G. K. Biocatalysts for clean industrial products and processes. Curr. Opin. Microbiol. 2, 246-251.

Byrne, A. B., Kukor, J. J. & Olsen, R. H. (1993) Sequence analysis of the gene cluster encoding toluene-3-monooxygenase from *Pseudomonas pickettii* PKO1. Gene 154, 65-70.

Cacciari, I., Lippi, D., Pietrosanti, T. & Pietrosanti, W. (1986) Ammonium assimilation in an *Arthrobacter* sp. "*fluorescens*". Arch. Microbiol. 145, 113-115.

Cech, J.S., Hartmann, P., Slosarek, M. & Chudoba, J. (1988) Isolation and identification of a morpholine degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 54, 619-621.

Cleere, W. F. & Coughlan, M. P. (1975). Avian xanthine dehydrogenase I. Isolation and characterization of the turkey liver enzyme. Comp. Biochem. Physiol. 50B, 311-322.

Combourieu, B., Besse, P., Sancelme, M., Verschambre, H., Delort, A. M., Poupin, P. & Truffaut, N. (1998) Morpholine degradation pathway of *Mycobacterium aurum* MO1: Direct evidence of intermediates by in situ ^1H nuclear magnetic resonance. Appl. Environ. Microbiol. 64, 153-158.

Day, D. J. & Anthony, C. (1990) Methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1. Methods Enzymol. 188, 210-216.

Decker, K. F. & Brandsch, R. (1991) Flavoproteins with a covalent histidyl(N3)-8α-ribovlavin linkage. Biofactors 3, 69-81.

Decker, K. F. (1993) Biosynthesis and function of enzymes with covalently bound flavin. Annu. Rev. Nutr. 13, 17-41.

Degtyarenko, K. N. (1995) Structural domains of P450-containing monooxygenase systems. Protein. Eng. 8, 737-747.

De Jong, G. A. H., Geerlof, A., Stoorvogel, J., Jongejan, J. A., de Vries, S., & Duine, J. A. (1995) Quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*: Purification, characterization, and reconstitution of the apoenzyme with pyrroloquinoline quinone analogues. Eur. J. Biochem. 230, 899-905.

Dickens, M. L. & Strohl, W. R. (1996) Isolation and characterization of a gene from *Streptomyces* sp. strain C5 that confers the ability to convert daunomycin to doxorubicin on *Streptomyces lividans* TK24. J. Bacteriol. 178, 3389-3395.

Dilworth, G. L. (1982) Properties of the selenium-containing moiety of nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri*. Arch. Biochem. Biophys. 219, 30-38.

Dobbek, H., Gremer, L., Meyer, O. & Huber, R. (1999) Crystal structure of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selanylcysteine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 8884-8889.

Duffner, F. M., Kirchner, U., Bauer, M. P. & Müller, R. (2000) Phenol/cresol degradation by the themophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. Gene, 256, 215-221.

Duffner, F. M. & Müller, R. (1998) A novel phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic *Bacillus thermoleovorans* strain A2: nucleotide sequence and analysis of the genes. FEMS Microbiol. Lett. 161, 37-45.

Draper, A. J., Manda, A. and Parkinson, A. (1997) Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 341, 47-61.

Eaton, R. W. (1997) *p*–Cymene catabolic pathway in *Pseudomonas putida* F1: Cloning and characterization of DNA encoding conversion of *p*–cumene to *p*–cumate. J. Bacteriol. 179, 3171–3180.

Eggink, G., Engel, H., Vriend, G., Terpstra, P. & Witholt, B. (1990) Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. J. Mol. Biol. 212, 135-142

Eltis L. D., Karlson U. & Timmis K. N. (1993). Purification and characterization of cytochrome P450RR1 from Rhodococcus rhodocrous. Eur. J. Biochem 213, 211-216.

Ensing, J. C. and Rittenberg, S. C. (1965) The formation of a blue pigment in the bacterial oxidation of isonicotinic acid. Arch. Microbiol. 51, 384-392.

Entsch, B. & van Berkel, W. J. (1995) Structure and mechanism of *para*-hydroxybenzoate hydroxylase. FASEB J. 9, 476-483.

Enzmann, H., Zerban, H., Kopp-Schneider, A., Loser, E. & Bannasch, P. (1995). Effect of low doses of N-nitrosomorpholine on the development of early stages of hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis 16, 1513-1518.

Eppink, M. H. M., Schreuder, H. A. & van Berkel, W. J. H. (1997) Identification of a novel conserved sequence motif in flavoprotein hydroxylases with putative dual function in FAD/NAD(P)H binding. Protein Science 6, 2454-2458.

Evans, J. S. & Venables, W. A. (1990) Degradation of thiophene-2-carboxylate, furan-2-carboxylate, pyrrole-2-carboxylate and other thiophene derivatives by the bacterium *Vibrio* YC 1, Appl. Microbiol. Biotechnol. 32, 715-720.

Fetzner, S. (1998) Bacterial degradation of pyridine, indol, quinoline, and their derivatives under different redox conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49, 237-250.

Fetzner, S. (2000) Enzymes involved in the aerobic bacterial degradation of N-heteroaromatic compounds: Molybdenum hydroxylases and ring-opening 2,4-dioxygenases. Naturwissenschaften 87, 59-69.

Fetzner, S., Tshisuaka, B., Lingens, F., Kappl, R., & Hüttermann, J. (1998) Bacterial degradation of quinoline and derivatives-pathways and theit biocatalysts. Angew. Chem. Int. Ed. 37, 4000-4021.

Galan, B., Diaz, E., Priete, M. A. & Garcia, J. L. (2000) Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3.monooxygenase of *Escherichia coli* W: a prototype of a new flavin:NAD(P)H reductase subfamily. J. Bacteriol. 182, 627-636.

Geerlof, A., Rakels, J. J. L., Straathof, A. J. J., Heijnen, J. J., Jongejan, J. A., & Duine, J. A. (1994a) Description of the kinetic mechanism and the enantioselectivity of quinohaemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni* in the oxidation of alcohols and aldehydes. Eur. J. Biochem. 226, 537-546.

Geerlof, A., Stoorvogel, J., Jongejan, J. A., Leenen, E. J. T. M., Dooren, T. J. G. M. V., Tweel, W. J. J. V. D. & Duine, J. A. (1994b) Studies on the production of (S)-(+)-solketal (2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol) by enantioselective oxidation of racemic solketal with *Comamonas testosteroni.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 42, 8-15.

Geerlof, A., Tol, J. B. A. V., Jongejan, J. A. & Duine, J. A. (1994c) Enantioselective conversions of the racemic C-3-alcohol synthons, glycidol (2,3-epoxy-1-propanol), and solketal (2,2-dimethyl-4-(hydroxymethyl)-1,3-dioxolane) by quinohaemoprotein alcohol dehydrogenases and bacteria containing such enzymes. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58, 1028-1036.

Ghosh, M., Anthony, C., Harlos, K., Goodwin, M. G. & Blake, C. (1995) The refined structure of the quinoprotein methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* at 1.94 Å. Structure 3, 177-187.

Gladyshev, V. N., Khangulov, S. V. & Stadtman, T. C (1996). Properties of the selenium- and molybdenum-containing nicotinic acid hydroxylase from *Clostridium barkeri.* Biochemistry 35, 212-223.

Goodwin, P. M. and Anthony, C.(1998) The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. Adv. Microb. Physiol. 40, 1-80.

Greenlee, L. & Handler, P. (1964). Xanthine oxidase VI. Influence of pH on substrate specificity. J. Biol. Chem. 239, 1090-1095.

Gremer, L. & Meyer, O. (1996). Characterization of xanthine dehydrogenase from the anaerobic bacterium *Veillonella atypica* and identification of a molybdopterin-cytosine-dinucleotide-cotaining molybdenum cofactor. Eur. J. Biochem. 238, 862-866.

Groen, B., van Kleef, M. A. G. & Duine J. A. (1986) Quinoprotein alcohol dehydrogenase apoenzyme from *Pseudomonas testosteroni.* Biochem. J. 234, 611-615.

Guilot, C., Otal, I., van Rompaey, I., Martin, C. & Gicquel, B. (1994) Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. J. Bacteriol. 176, 535-539.

Gupta, R. C. & Shukla, O. P. (1979) Microbial transformation of isonicotinic acid hydrazide and isonicotinic acid by *Sarcina* sp. J. Biosci. 1, 223-234.

Hänzelmann, P., Dobbek, H., Gremer, L. Huber, R. & Meyer, O. (2000) The effect of molybdenum in Hydrogenophaga pseudoflava on the crystallographic structure of the seleno-molybdo-iron-sulfor flavoenzyme carbon monoxide dehydrogenase. J. Mol. Biol. 301, 1221-1235.

Harayama, S., Kok, M. & Neidle, E. L. (1992) Functional and evolutionary relationship among diverse oxygenases. Annu. Rev. Microbiol. 46, 565-601.

Herrmann, H., Müller, C., Schmidt, I., Mahnke, J., Petruschka, L. & Hahnke, K. (1995) Localization and organization of phenol degradation genes of *Pseudomonas putida* strain H. Mol. Gen. Genet. 247, 240-246.

Hille, R. (1996). The mononuclear molybdenum enzymes. Chem. Rev. 96, 2757-2816.

Hille, R., Rétey, J., Bartlewski-Hof, U., Reichenbecher, W. & Schink, B. (1999) Mechanistic aspects of molybdenum-containing enzymes. FEMS Microbiol. Rev. 22, 489-501.

Hochheimer, A., Linder, D., Thauer, R. K. & Hedderich, R. (1996) The molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase operon and the tungsten formylmethanofuran dehydrogenase operon from *Methanobacterium thermoautotrophicum.* Structures and transcriptional regulation. Eur. J. Biochem. 242, 156-162.

Hochheimer, A., Hedderich, R. & Thauer, R. K. (1998) The formylmethanofuran dehydrogenase isoenzymes in *Methanobacterium wolfei* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*: induction of the molybdenum isoenzyme by molybdate and constitutive synthesis of the tungsten isoenzyme. Arch. Microbiol 170, 389-393.

Horinouchi, M., Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., & Omori, T (1997) Cloning and charakterization of genes encoding an enzyme which oxidizes dimethyl sulfide in *Acinetobacter* sp. strain 20B. FEMS Microbiol. Lett. 155, 99-105.

Horman, K. & Andreesen, J. R. (1991) A flavin-dependent oxygenase reaction initiates the degradation of pyrrole-2-carboxylate in *Arthrobacter* strain Py1 (DSM 6386), Arch. Microbiol. 157, 43 - 48.

Hormann, K. & Andreesen, J. R. (1994) Purification and characterization of a pyrrole-2-carboxylate oxygenase from *Arthrobacter* strain Py1, Biol. Chem. Hoppe-Seyler 375, 211-218.

Hübner, A., Danganan, C. E., Xun, L., Chakrabarty, A. M. & Hendrickson, W. (1998) Genes for 2,4,5-trichlorophenolacetic acid metabolism in *Burkholderia cepacia* AC 1100: Characterization of the *tft*C and *tft*D genes and location of the *tft* operon on multiple replicons. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2086-2093.

Huber, C., Caldeira, J., Jongejan, J. A. & Simon, H. (1994) Further characterization of two different, reversible aldehyde oxidoreductases from *Clostridium formicoaceticum*, one containing tungstate and the other molybdenum. Arch. Microbiol. 162, 303-309.

Huber, R., Hof, P., Duart, R. O., Moura, J. J. G., Moura, I., LeCall, J., Hille, R., Archer, M. & Romao, M. (1996) A structure-based catalytic mechanism for the xanthine oxidase family of molybdenum enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 8846-8851.

Hur, H.-G., Newman, L. M., Wackett, L. P. & Sandowsky, M. J. (1997) Toluene 2-monooxygenase-dependent growth of *Burkholderia cepacia* G4/PR1 on diethyl ether. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1606-1609.

Hurh, B., Yamane, T. & Nagasawa, T. (1994) Purification and characterization of nicotinic acid dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens.* J. Ferm. Bioeng. 78, 19-26.

Imhoff, D. & Andreesen, J. R. (1979) Nicotinic acid hydroxylase *from Clostridium barkeri*: Selenium-dependent formation of active enzyme. FEMS Microbiol. Lett. 5, 155-158.

Jaacks Siranosian, K. J., Ireton, K. & Grossman, A. D. (1993) Identification and characterization of genes controlled by the sporulation-regulatory gene spo0H in *Bacillus subtilis.* J. Bacteriol. 175, 6789-6796.

Jacoby, W. B. & Fredericks, J. (1959) Pyrrolidine and putrescine metabolism g-amino butyraldehyde dehydrogenase. J. Biol. Chem. 234, 2145-2150.

Jefcoate, C. R. (1978) Measurement of substrate and inhibitor binding to microsomal cytochrome P-450 by optical-difference spectroscopy. Methods Enzymol. 52, 166-188.

Jendrossek, D., Krüger, N. & Steinbüchel, A. (1990) Characterization of alcohol dehydrogenase genes of derepressible wild-type *Alcaligenes eutrophus* H16 and constitutive mutants. J. Bacteriol. 17,: 4844-4851.

Jendrossek, D., Steinbüchel, A. & Schlegel, H. G. (1987) Three different proteins exhibiting NAD-dependent acetaldehyde dehydrogenase activity from *Alcaligenes eutrophus.* Eur. J. Biochem. 167, 541-548.

Johnson, G. R., and Olson, R. H. (1995) Nucleotide sequence analysis of genes encoding a toluene/benzene-2-monooxygenase from *Pseudomonas* sp. strain JS150. Appl. Environ. Microbiol. 61, 3336-3346.

Johnson, J. L., Rajagopalan, K. V. & Cohen, H. J. (1974) Molecular basis of the biological function of molybdenum. Molybdenum-free sulfite oxidase from livers of tungsten-treated rats. J. Biol. Chem 249, 5046-5055.

Jongejan, A., Jongejan, J. A. & Duine, J. A. (1998) Homology model of the quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni.* Protein Eng. 11, 185-198.

Joo, H., Lin, Z. & Arnold, F. H. (1999) Laboratory evolution of peroxide-mediated cytochrome P450 hydroxylation. Nature 399, 670-673.

Kaiser, J. P., Feng, Y. & Bollag, J. M. (1996). Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions. Microbiol. Rev. 60, 483-498.

Kisker, C., Schindelin, H., Baas, D., Rétey, J., Meckenstock, R.U. & Kroneck, P.M.H. (1999). A structural comparison of molybdenum-cofactor-containing enzymes. FEMS Microbiol Rev. 22, 503-521.

Kisker, C., Schindelin, H. & Douglas, C. R. (1997). Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. Ann. Rev. Biochem. 66, 233-267.

Knapp, J. S. & Brown, V. R. (1988) Morpholine biodegradation. Int. Biodeterioration 24, 299-306.

Knapp, J. S., Callely, A. G. & Mainprize, J. (1982) The microbial degradation of morpholine. J. Appl. Bacteriol. 52, 5-13.

Koenig, K. & Andreesen, J. R. (1990) Xanthine dehydrogenase and 2-furoyl-coenzyme A dehydrogenase from *Pseudomonas putida* Fu1: two molybdenum-containing dehydrogenases of novel structural composition. J. Bacteriol. 172, 5999-6009.

Koenig, K. & Andreesen, J. R. (1992) Aerobic and anaerobic degradation of heterocyclic aromatic compounds by bacteria. Bioengineering 8, 78-84.

Kohlweyer, U., Thiemer, B., Schräder, T. & Andreesen, J. R. (2000) Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia* sp. strain K1. FEMS Microbiol. Lett. 186, 301-306.

Kretzer, A. & Andreesen, J. R. (1991) A new pathway for isonicotinate degradation by *Mycobacterium* sp. INA1. J. Gen. Microbiol. 137, 1073-1080.

Kropp, K.G., & Fedorak, P. M. (1998) A review of the occurrence, toxicity, and biodegradation of condensed thiophenes found in petroleum. Can. J. Microbiol. 44, 605-622.

Kuhn, E. P. & Suflita, J. M. (1989) Microbial degradation of nitrogen, oxygen and sulfur heterocyclic compounds under anaerobic conditions. Studies with aquifer samples. Environ. Toxicol. Chem. 8, 1149-1158.

Kuroda, S., Tanizawa, K., Sakamoto, Y., Tanaka, H. & Soda, K. (1990) Alanine dehydrogenases from two *Bacillus* species with distinct thermostabilties: Molecular cloning, DNA and protein sequence determination, and structural comparison with other $NAD(P)^+$-dependent dehydrogenases. Biochemistry 29, 1009-1015.

Lee, S. D., Kim, E. S. and Hah, Y. C. (2000) Phylogenetic analysis of the genera *Pseudonocardia* and *Actinobispora* based on 16S ribosomal DNA sequences. FEMS Microbiol. Lett. 182, 125-129.

Lehmann, M., Tshisuaka, B., Fetzner, S., Röger, P. & Lingens, F. (1994). Purification and characterization of isoquinoline 1-oxidoreductase from *Pseudomonas diminuta* 7, a novel molybdenum-containing hydroxylase. J. Biol. Chem. 269, 11254-11260.

Lettau, H. (1980) Chemie der Heterocyclen. Deutscher Verlag für Grundstoffindistrie, Leipzig, Germany.

Liu, Y., Nesheim, J. C., Lee, S. K. & Lipscomb, J. D. (1995) Gating effects of component B on oxygene activation by the methan monooxygenase hydroxylase component. J. Biol. Chem. 270, 24662-24665.

Machado, S. S., Wandel, U., Jongejan, J. A., Straathof, A. J. J. & Duine, J. A. (1999) Characterization of the enantioselective properties of the quinohemoprotein alcohol dehydrogenase of *Acetobacter pasteurianus* LMG 1635. 1. Different enantiomeric ratios of whole cells and purified enzyme in the kinetic resolution of racemic glycidol. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 10-20.

Madyastha, K. M. & Gururaja, T. L. (1995) Purification and some of the properties of a novel secondary alcohol dehydrogenase from *Alcaligenes eutrophus.* Biochem. Biophys. Res. Com. 211, 540-546.

Marcinkeviciene, J., & Johansson, G. (1993) Kinetic studies of the active sites functioning in the quinohemoprotein fructose dehydrogenase. FEBS Lett. 318, 23-26.

Martinis, S. A., Blake, S. R., Hager, L. P. & Sligar, S. G. (1996) Probing of the heme iron coordination structure of pressure-induced cytochrome P420cam. Biochemistry 35, 14530-14536.

Mason, J. R., & Cammack, R. (1992) The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. Annu. Rev. Microbiol. 46, 277-305.

Massay, V., Schopfer, L. M. & Anderson, R. F. (1988) Sructural determinants of the oxygen reactivity of different classes of flavoproteins. In: Oxidases and related redox systems, S. 147-166, Alan R. Liss, New York.

Matsushita, K., Yakushi, T., Takaki, Y., Toyama, H. & Adachi, O. (1995) Generation mechanism and purification of an inactive form convertible *in vivo* to the active form of quinoprotein alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter suboxydans.* J. Bacteriol. 177, 6552-6559.

May, S. W. (1999) Application of oxidoreductases. Curr. Opin. Biotechnol. 10, 370-375.

Mazure, N., & Truffaut, N. (1994). Degradation of morpholine by *Mycobacterium aurum* MO1. Can. J. Microbiol. 40, 761-765.

Mewies, M., McIntire,W. S. & Scrutton, N. (1998) Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: The current state of affairs. Protein Sci. 7, 7-20.

Meyer, O., Gremer, L., Ferner, R., Ferner, M., Dobbek, H., Gnida, M., Meyer-Klaucke, W. & Huber, R. (2000) The role of Se, Mo and Fe in the structure and function of carbon monoxide dehydrogenase. Biol. Chem. 381, 865-876.

Meyer, T. E. & Kamen, M. D. (1982) New perspectives on c-type cytochromes. Adv. Prot. Chem. 35, 105-212.

Mijos, K. (1978) Cyclic amines. In: Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 2, S. 295-308. Wiley Interscience, New York.

Miura, A. & Dalton, H. (1995) Purification and characterization of the alkene monooxygenase from *Nocardia corallina*. Biosci. Biotech. Biochem. 59, 853-859.

Moody, D. E. (1991) The effect of tetrahydrofuran on biological systems: does a hepatotoxic potential exist? Drug Chem. Toxicol. 14, 319-342.

Munro, A. W. & Lindsay, J. G. (1996) Bacterial cytochromes P-450. Mol. Microbiol. 20, 1115-1125.

Nagel, M. & Andreesen, J. R. (1990). Purification and characterization of the molybdoenzyme nicotinate dehydrogenase and 6-hydroxynicotinate dehydrogenase from *Bacillus niacini.* Arch. Micribiol. 154, 605-613.

Nagy, I., Schoofs, G., Compernolle, F., Proost, P., Vanderleyden, J. & de Mot, R. (1995) Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S–ethyl dipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involves an inducible cytochrome P–450 system and aldehyd dehydrogenase. J. Bacteriol. 177, 676–687.

Nakayama, Y., Yasui, M., Sugahara, K., Hayashi, M. & Unemoto, T. (2000) Covalently bound flavin in the NqrB and NqrC subunits of Na^+-translocating NADH-quinone reductase from *Vibrio alginolyticus*., FEBS Lett. 474, 165-168.

Neidle, E. L., Hartnett, C., Ornston, L. N., Bairoch, A., Rekik, M. & Harayama, S. (1991) Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus benABC* genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationship among multicomponent oxygenases. J. Bacteriol. 173, 5385-5395.

Nielsen, A. K., Gerdes, K. Degn, H. & Murrell, J. C. (1996) Regulation of bacterial methane oxidation: transcription of soluble methane monooxygenase operon of *Methylococcus capsulatus* (Bath) is repressed by copper ions. Microbiology 142, 1289-1296.

Nielsen, A. K., Gerdes, K. & Murrell, J. C. (1997) Copper-dependent reciprocal transcriptional regulation of methane monooxygenase genes in *Methylococcus capsulatus* and *Methylosinus trichosporium.* Mol. Microbiol. 25, 399-409.

Nivière, V., Fieschi, F., Décout, J.-L. & Fontecave, M. (1999) The NAD(P)H:Flavin Oxidoreductase from Escherichia coli. J. Biol. Chem. 274, 18252-18260.

Nordlund, I., Powlowski, J., & Shingler, V. (1990) Complete nucleotide sequence and polypeptide analysis of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. J. Bacteriol. 172, 6826-6833.

O'Keefe, D. P., Gibson, K. J., Emptage, M. H., Lenstra, R., Romesser, J. A., Litle, P.J. & Omer, C. A. (1991) Ferredoxins from two sulfonylurea herbicide monooxygenase systems in *Streptomyces griseolus.* Biochemistry 30, 447-455.

O'Keefe, D. P. & Harder P. A. (1991) Occurence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the actinomycetes. Mol. Microbiol. 5, 2099-2105.

Olsthoorn, A. J. J., & Duine, J. A. (1998) On the mechanism and specificity of soluble, quinoprotein glucose dehydrogenase in the oxidation of aldose sugars. Biochemistry 37, 13854-13861.

Omer, C. A., Lenstra R., Litle P. J., Dean C., Tepperman, J. M., Leto, K. J., Romesser, J. A. & O'Keefe D.P. (1990). Genes for two herbicide-inducible cytochromes P-450 from *Streptomyces griseolus.* J. Bacteriol. 172, 3335-3345.

Otaka, E. & Ooi, T. (1989) Examination of protein sequence homologies. V. New perspectives on evolution between bacteria and chloroplast-type ferredoxins inferred from sequence evidence. J. Mol. Evol. 29, 246-254.

Padden, A. N., Donovan, P. K. & Wood, A. P. (1998) Chemolithoautotrophy and mixotrophy in the thiophene-2-carboxylic acid-utilizing *Xanthobacter tagetidis.* Arch. Microbiol. 169, 249-256.

Palfey, B. A, Moran, G. R., Entsch, B., Ballou, D. P. & Massey, V. (1999) Substrate recognition by "password" in p-hydroxybenzoate hydroxylase. Biochemistry 26, 1153-1158

Patterson, J. A. & Hespell, R. B. (1985) Glutamine synthetase activity in the ruminal bacterium *Succinivibrio dextrinosolvens.* Appl. Environ. Microbiol. 50, 1014-1020.

Parales, R. E., Adamus, J. E., White, N. and May, H. D. (1994) Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture. Appl. Environ. Microbiol. 60, 4527-4530.

Pessione, E., Divari, S., Griva, E. Cavaletto, M., Rossi, G. L., Gilardi, G. & Giunta, C. (1999) Phenol hydroxylase from *Acinetobacter radioresistens* is a multicomponent enzyme. Eur. J. Biochem. 265, 549-555.

Poulos, T. L., Finzel, B. C. & Howard, A. J. (1986) Crystal structure of substrate-free *Pseudomonas putida* cytochrome-P450. Biochemistry 18, 5314-5322.

Poupin, P., Ducrocq, V., Hallier-Soulier, S. & Truffaut, N. (1999a) Cloning and characterization of the genes encoding a cytochrome P450 (PipA) involved in piperidine and pyrrolidine utilization and its regulatory protein (PipR) in *Mycobacterium smegmatis* mc^2155. J. Bacteriol. 181, 3419-3426.

Poupin, P., Godon, J. J., Zumstein, E., Truffaut, N. (1999b) Degradation of morpholine, piperidine, and pyrrolidine by mycobacteria: evidences for the involvement of a cytochrome P450. Can. J. Microbiol. 45, 209-216.

Poupin, P., Mazure, N. & Truffaut, N. (1996) Morpholine degradation by strain *Mycobacterium aurum* MO1: improvement of cells growth and morpholine degradation rate by cells immobilization. In: Immobilized Cells: Basics and Applications, 1. Ausgabe, pp. 770-776, Amsterdam, Elsevier Science B.V.

Poupin, P., Truffaut, N., Combourieu, B., Besse, P., Sancelme, M., Veschambre, H. & Delort, A. M. (1998) Degradation of morpholine by an environmental *Mycobacterium* strain involves a cytochrome P-450. Appl. Environ. Microbiol. 64, 159-165.

Powlowski, J. & Shingler, V. (1990) In vitro analysis of polypeptide requirements of multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. J. Bacteriol. 172, 6834-6840.

Powlowski, J. & Shingler, V. (1994) Genetics and biochemistry of phenol degradation by *Pseudomonas* sp. CF600. Biodegradation 5, 219-236.

Priefert, H., Krüger, N., Jendrossek, D., Schmidt, B. & Steinbüchel, A. (1992) Identification and molecular characterization of the gene coding for acetaldehyde dehydrogenase II (acoD) of *Alcaligenes eutrophus.* J. Bacteriol. 174, 899-907.

Prieto, M. A. & Garcia, J. L. (1994) Molecular characterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase of *Escherichia coli.* J. Biol. Chem. 269, 22823-22829.

Reichert, K., Lipski, A., Pradella, S., Stackebrandt, E. and Altendorf, K. (1998) *Pseudonocardia asaccharolytica* sp. nov. and *Pseudonocardia sulfidoxydans* sp. nov., two new dimethyl disulfide-degrading actinomycetes and emended description of the genus *Pseudonocardia.* Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 441-449.

Romao, M. J. Archer, M., Moura, I., LeCall, J., Engh, R., Schneider, M., Hof, P. & Huber, R. (1995) Crystal structure of the xanthine oxidase-related aldehyde oxido-reductase from *Desulfovibrio gigas.* Science 270, 1170-1176.

Rosenzweig, A. C., Brandstetter, H., Whittington, D. A., Nordlund, P., Lippard, S. J. & Frederick, C. A. (1997) Crystal structures of the methane monooxygenase hydroxylase from *Methylococcus capsulatus* (Bath): Implication for substrate gating and component interactions. Proteins 29, 141–152.

Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A., Lippard, S. J. & Nordlund, P. (1993) Crystal structure of a bacterial non–haem iron hydroxylase that catalyses the biological oxidation of methane. Nature 366: 537–543.

Rowan, S. J. & Sanders, J. K. M. (1997) Enzyme models. design and selection. Curr. Opin. Chem. Biol. 1, 483-490.

Saeki, H. & Furuhashi, K. (1994) Cloning and characterization of a *Nocardia corallina* B-276 gene cluster encoding alkene monooxygenase. J. Ferment. Bioeng. 78, 399-406.

Sarada, K. V., Rao, N. A. & Venkitasubramanian, T. A (1980) Isolation and characterization of glutamate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* CDC 46. Biochim. Biophys. Acta 615, 299-308.

Sawa, Y., Tani, M., Murata, K., Shibata, H. & Ochiai, H. (1994) Purification and characterization of alanine dehydrogenase from a cyanobacterium *Phormidium lapideum.* J. Biochem. 116, 995-1000.

Schräder, T., Hillebrand, C. & Andreesen, J. R. (1998) 2-Hydroxyisonicotinate dehydrogenase isolated from *Mycobacterium* sp. INA1. FEMS Microbiol. Letters 164, 311 - 316.

Schräder, T., Rienhöfer, A. & Andreesen, J. R. (1999) Selenium-containing xanthine dehydrogenase from *Eubacterium barkeri.* Eur. J. Biochem. 264, 862-871.

Schräder, T., Schuffenhauer, G., Sielaff, B. & Andreesen, J. R. (2000) High morpholine degradation rates and formation of cytochrome P450 during growth on different cyclic amines by newly isolated *Mycobacterium* sp. strain HE5. Microbiology 146, 1091-1098.

Schräder, T., Zarnt, G. & Andreesen, J. R. (2001a) Alcohol- and aldehyde dehydrogenases induced during growth of *Ralstonia eutropha* strain Bo on different alcohols. (fertig zum Einreichen bei J. Bacteriol.)

Schräder, T., Thiemer, B. & Andreesen, J. R. (2001b) A molybdenum-containing dehydrogenase catalyzing an unusual 2-hydroxylation of nicotinic acid. (fertig zum Einreichen bei Eur. J. Biochem.)

Schreuder, H. A., Prick, P. A. J., Wierenga, R. K., Vriend, G., Wilson, K. S., Hol, W. G. J. & Drenth, J. (1989) Crystal structure of the p-hydroxybenzoate hydroxylase-substrate complex refined at 1.9 A resolution, J. Mol. Biol. 208, 679-696.

Schuffenhauer, G., Schräder, T. & Andreesen, J. R. (1999) Morpholine-induced formation of L-alanine dehydrogenase activity in *Mycobacterium* strain HE5. Arch. Microbiol. 171, 417-423.

Shaw, J. P. & Harayama, S. (1990) Purification and characterization of tol plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida.* Eur. J. Biochem. 191, 705-714.

Shimao, M., Tamogami, T., Nishi, K. & Harayama, S. (1996) Cloning and characterization of the gene encoding pyrroloquinoline quinone-dependent poly(vinyl alcohol) dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. strain VM15C. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60, 1056-1062.

Sielaff, B., Andreesen, J. R. & Schräder, T. (2001) A cytochrome P450 and a 3Fe-4S-ferredoxin isolated from *Mycobacterium* sp. strain HE5 after growth on morpholine (akzeptiert bei Appl. Microbiol. Biotechnol.)

Singh, R. P. & Shukla, O. P. (1986) Isolation, characterization, and metabolic activities of *Bacillus brevis* degrading isonicotinic acid. J. Ferment. Technol. 64, 109-117.

Small, F. J. & Ensign, S. A. (1997) Alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2. J. Biol. Chem. 272, 24913-24920.

Smith, T.J., Lloyd, J. S., Gallagher, S. C, Fosdike, W. L, Murrell, J. C, & Dalton, H. (1999) Heterologous expression of alkene monooxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* B-276. Eur. J. Biochem. 260, 446-452.

Stainthorpe, A. C., Lees, V., Salmond, G. P. C., Dalton, H. & Murrell, J. C. (1990) The methane monooxygenase gene cluster of *Methycoccus capsulatus* (Bath). Gene 91, 27–34.

Steinbüchel, A., & Schlegel, H. G. (1984) A multifunctional fermentative alcohol dehydrogenase from the strict aerobe *Alcaligenes eutrophus*: purification and properties. Eur. J. Biochem. 14, 555-564.

Steinbüchel, A., Fründ, C., Jendrossek, D. & Schlegel, H. G. (1987) Isolation of Mutants of *Alcaligenes eutrophus* unable to derepress the fermentative alcohol dehydrogenase. Arch. Microbiol. 148, 178-186.

Stigter, E. C. A., van den Lugt, J. P., and Somers, W. A. C. (1997) Enantioselective oxidation of secondary alcohols by quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni.* J. Mol. Catal. B-Enzym. 2, 291-297.

Stirling, D. I. & Dalton, H. (1980) Oxidation of dimethyl ether, methyl formate and bromomethane by *Methylococcus capsulatus* (Bath). J. Gen. Mircobiol. 116: 277-283.

Strohl, W. R. (1992) Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. Nucl. Acids Res. 20, 961–974.

Westerheide, L., Pascaly, M. & Krebs, B. (2000) Methane monooxygenase and its related biomimetic models. Curr. Opin. Chem. Biol. 4, 235-241.

Wösten, M. M. S. M. (1998) Eubacterial sigma-factors. FEMS Microbiol. Rev. 22, 127-150.

Swain, A., Waterhouse, K. V., Venables, W. A., Callely, A. G. & Lowe, S. E. (1991) Biochemical studies of morpholine catabolism by an enviromental *Mycobacterium.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 35, 110-114.

Takizawa, N., Yokoyama, H., Yanagihara, K., Hatta, T. & Kiyohara, H. (1995) A locus of *Pseudomonas pickettii* DTP0602, *had*, that encodes 2,4,6-trichlorophenol-4-dechlorinase with hydroxylase activity, and hydroxylation of various chlorophenols by the enzyme. J. Ferment. Bioeng. 80, 318-326.

Testa, B. & Jenner, P. (1981) Inhibitors of cytochrome P450s and their mechanism of action. Drug. Metab. 12, 1-117.

Testa, B. (1995) The nature and functioning of cytochrome P450 and flavin-containing-monooxygenases. In: The metabolism of drugs and other xenobiotics:biochemistry of redox reactions. S. 70-121, Academic Press., San Diego.

Thibaut, D., Ratet, N., Bisch, D., Faucher, D., Debussche, L. & Blanche, F. (1995) Purification of the two-enzyme system catalyzing the oxidation of the D-proline residue of pristinamycin II_B during the last step of pristinamycin II_A biosynthesis. J. Bacteriol. 177, 5199-5205.

Thiemer, B., Andreesen, J. R. & Schräder, T. (1999) A covalently bound flavin discovered in the reductase component of a tetrahydrofuran-induced multicomponent monooxygenase. Beitrag zum Tagungsband "Flavins and Flavoproteins - 1999" S. 879 - 882 (S. Ghisla, P. Kroneck, P. Macheroux, H. Sund, Eds.) Agency of Scientific Publ., Berlin.

Thiemer, B., Andreesen, J. R. & Schräder, T. (2001a) Molecular analysis of a gene cluster encoding a monooxygenase and a semialdehyde dehydrogenase involved in tetrahydrofuran degradation by *Pseudonocardia* sp. strain K1. (fertig zum Einreichen bei J. Bacteriol.)

Thiemer, B., Andreesen, J. R. & Schräder, T. (2001b) The reductase component of a tetrahydrofuran induced multicomponent monooxygenase contains a covalently bound FAD. (eingereicht bei Eur. J. Biochem.)

Thomas, P. E., Ryan, D. & Levin, W. (1976) An improved staining procdure for the detection of the peroxidase activity of cytochrom P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. Anal. Biochem 75, 168-176.

Toyama, H., Fujii, A., Matsushita, K., Shinagawa, E., Ameyama, M. Adachi, O. (1995) Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. J. Bacteriol. 177, 2442-2450.

Trower, M. K., Lenstra, R., Omer, C., Buchholz, S. E. & Sariaslani, F. S. (1992) Cloning, nucleotide sequence determination and expression of the genes encoding cytochrome P-450$_{soy}$ (soyC) and ferredoxin$_{soy}$ (soyB) from *Streptomyces griseus.* Mol. Microbiol. 6**,** 2125-2134.

Trudgill, P. W. (1984) The microbial metabolism of furans, In: Microbial degradation of organic compounds (Gibson, D. T. Ed.), S. 295-307, Marcel Decker Inc., New York.

Tully, R. E. & Keister, D. L. (1993) Cloning and mutagenesis of a cytochrome P-450 locus from *Bradyrhizobium japonicum* that is expressed anaerobically and symbiotically. *Appl* Environ. Microbiol. 59, 4136-4142.

Tyler, B. **(**1978) Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Annu. Rev. Biochem. 47, 1127-1162.

Ueda, M. & Sashida, R. (1998) Microbial production of 2-hydroxynicotinic acid from nicotinic acid by intact cells of MCI3289. J. Mol. Catal. B Enzyme 4, 199-204.

Uetz, T., Schneider, R., Snozzi, M. & Egli, T. (1992). Purification and characterization of a two component monooxygenase that hydroxylates nitrilotriacetate from "*Chelatobacter*" strain ATCC 29600, J. Bacteriol 174, 1179-1188.

Van Berkel, W. J. H. & Müller, F. (1991) Flavin-dependent monooxygenases with special reference to p-hydroxybenzoate hydroxylase. In: Chemistry and biochemistry of flavoenzymes, Vol. II S. 1-24, CRC Press, Boca Raton.

Van der Bolt, F. J, Vervoort, J. & van Berkel, W. J. (1996) Flavin motion in p-hydroxybenzoate hydroxylase. Substrate and effector specificity of the Tyr22-->Ala mutant. Eur. J. Biochem. 237, 592-600.

Van der Meer, J. R., de Vos , W. M., Harayama, S. & Zehnder, A. J. B. (1992) Molecular mechanism of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiol. Rev. 56, 677-694.

Van Heijne, G. (1983) Pattern of amino acids near signal-sequences cleavage sites. Eur. J. Biochem. 133, 17-21.

Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Leemhuis, H., Lutje Spelberg, J. H. & Janssen, D. B. (2000) Characterization of the gene cluster involved in isoprene metabolism in *Rhodococcus* sp. strain AD45. J. Bacteriol. 182, 1956-1963.

Velasco, A., Alonso, S., Garcia, J. L., Perera, J. & Diaz, E. (1998) Genetic and functional analysis of the styrene catabolic cluster of *Pseudomonas* sp. strain Y2. J. Bacteriol. 180, 1063-1071.

Wackett, L. P. (1998) Direct evolution of new enzymes and pathways for environmental biocatalysis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 864, 142-152.

Walczak, R. J., Dickens, M. L., Priestley, N. D. & Strohl W. R. (1999) Purification, properties, and characterization of recombinant *Streptomyces* sp. strain C5 DoxA, a cytochrome P-450 catalyzing multiple steps in doxorubicin biosynthesis. J. Bacteriol. 181, 298-304.

Wang, P., Brenchley, J. E. & Humphrey, A. E. (1994) Screening microorganisms for utilization of furfural and possible intermediates in its degradative pathway. Biotechnol. Letters. 16, 977-982.

Weber, F. J., van Berkel, W. J. H., Hartmans, S., and de Bont, J. A. M. (1992) Purification and properties of the NADH reductase component of alkene monooxygenase from *Mycobacterium* strain E3. J. Bacteriol. 174, 3275-3281.

White, G. F., Russell, N. J. & Tidswell, E. C. (1996) Bacterial scission of ether bonds. Microbiol. Rev. 60, 216-232.

White, S., Boyd, G., Mathews, F. S., Xia, Z. X., Dai, W. W., Zhang, F. Y & Davidson, V. L. (1993) The active site structure of the calcium-containing quinoprotein methanol dehydrogenase. Biochemistry 32, 12955-12958.

Wierenga, R. K., Terpstra, P. & Hol, W. G. J. (1986) Prediction of the occurrence of the ADP-binding βαβ-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. J. Mol. Biol. 187, 101-107.

Wieser, M., Wagner, B., Eberspächter, J. & Lingens, F. (1997) Purification and characterization of 2,4,6-trichlorophenol-4-monooxygenase, a dehalogenating enzyme from *Azotobacter* sp. strain GP1, *J. Bacteriol.* 179, 202-208.

Xia, Z. X., Dai, W. W., Xiong, J. P., Hao, Z. P., Davidson, V. L., White, S. & Mathews, F. S. (1992) The three-dimensional structures of methanol dehydrogenase from two methylotrophic bacteria at 2.6 Å resolution. J. Biol. Chem. 267, 22289-22297.

Xia, M., Zhu, Y., Cao, X., You, L. & Chen, Z. (1995) Cloning, sequencing and analysis of a gene encoding *Escherichia coli* proline dehydrogenase. FEMS Microbiol. Lett. 127: 235-242.

Xun, L. (1996) Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100. J. Bacteriol. 178, 2645-2649.

Xun, L. & Sandvik, E. R. (2000) Charakterization of 4-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase (HpaB) of *Escherichia coli* as a reduced flavin adenine dinucleotide-utilizing monooxygenase. Appl. Environ. Microbiol. 66, 481-486.

Yasuda, M., Cherepanov, A. & Duine, J. A. (1996) Polyethylene glycol dehydrogenase activity of *Rhodopseudomonas acidophila* derives from a type I quinohaemoprotein alcohol dehydrogenase. FEMS Microbiol. Lett. **138:**23-28.

Zarnt, G., Schräder, T. & Andreesen, J. R. (1997) Degradation of tetrahydrofurfuryl alcohol by *Ralstonia europha* is initiated by an inducible pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4891 - 4898.

Zarnt, G., Schräder, T. & Andreesen, J. R. (2001) Catalytic and molecular properties of quinohemoprotein tetrahydrofurfuryl alcohol dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* strain Bo. (akzeptiert bei J. Bacteriol.)

Zhou, N.-Y., Jenkins, A., Chion, C. K. N. & Leak, D. (1999) The alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2 is closely related to aromatic monooxygenases and catalyzes aromatic monohydroxylation of benzene, toluene, and phenol. Appl. Environ. Microbiol. 65,1589-1595.

Verzeichnis der für diese Arbeit relevanten eigenen Veröffentlichungen

1. D. Becker, T. Schräder & J. R. Andreesen (1997): Two-component, flavin-dependent pyrrole-2-carboxylate monooxygenase from *Rhodococcus* sp. European Journal of Biochemistry 249, 739 - 747.

2. G. Zarnt, T. Schräder & J. R. Andreesen (1997): Degradation of tetrahydrofurfuryl alcohol by *Ralstonia europha* is initiated by an inducible pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase. Applied and Environmental Microbiology 63, 4891 - 4898.

3. D. Becker, T. Schräder & J. R. Andreesen (1997): Pyrrole-2-carboxylate monooxygenase from *Rhodococcus* sp. belongs to the new type of two component flavin aromatic monooxygenases. Beitrag zum Tagungsband "Flavins and Flavoproteins - 1996", 375 - 378, (K. J. Stevenson, V. Massay, C. H. Williams, Eds.) UBC Press, Vancouver, Kanada.

4. T. Schräder, C. Hillebrand & J. R. Andreesen (1998): 2-Hydroxyisonicotinate dehydrogenase isolated from *Mycobacterium* sp. INA1. FEMS Microbiology Letters 164, 311 - 316.

5. G. Schuffenhauer, T. Schräder & J. R. Andreesen (1999): Morpholine-induced formation of L-alanine dehydrogenase activity in *Mycobacterium* strain HE5**.** Archives of Microbiology 171, 417-423.

6. T. Schräder, A. Rienhöfer & J. R. Andreesen (1999): Selenium-containing xanthine dehydrogenase from *Eubacterium barkeri*. European Journal of Biochemistry 264, 862-871.

7. B. Thiemer, J. R. Andreesen & T. Schräder (1999): A covalently bound flavin discovered in the reductase component of a tetrahydrofuran-induced multicomponent monooxygenase. Beitrag zum Tagungsband "Flavins and Flavoproteins - 1999", 879 – 882, (S. Ghisla, P. Kroneck, P. Macheroux, H. Sund, Eds.) Agency of Scientific Publ., Berlin.

8. T. Schräder, G. Schuffenhauer, B. Sielaff & J. R. Andreesen (2000): High morpholine degradation rates and formation of cytochrome P450 during growth on different cyclic amines by newly isolated *Mycobacterium* sp. strain HE5. Microbiology 146, 1091-1098.

9. U. Kohlweyer, B. Thiemer, T. Schräder & J. R. Andreesen (2000): Tetrahydrofuran degradation by a newly isolated culture of *Pseudonocardia* sp. strain K1. FEMS Microbiology Letters 186, 301-306.

10. G. Zarnt, T. Schräder & J. R. Andreesen (2001): Catalytic and molecular properties of quinohemoprotein tetrahydrofurfuryl alcohol dehydrogenase from *Ralstonia eutropha* strain Bo. Journal of Bacteriology 183, 1954-1960.

11. B. Sielaff, J. R. Andreesen & T. Schräder (2001): A cytochrome P450 and a ferredoxin isolated from *Mycobacterium* sp. strain HE5 after growth on morpholine. Applied Microbiology and Biotechnology 56, 458-464.

12. B. Thiemer, J. R. Andreesen & T. Schräder (2001): The NADH-dependent reductase of a putative multicomponent mono-oxygenase contains a covalently bound FAD. European Journal of Biochemistry 268, 3774-3782.

13. T. Schräder, G. Zarnt & J. R. Andreesen (2001): NAD(P)-dependent aldehyde dehydrogenases induced during growth of *Ralstonia eutropha* strain Bo on tetrahydrofurfuryl alcohol. Journal of Bacteriology 183, 7408-7411.

14. T. Schräder, B. Thiemer & J. R. Andreesen (2001): A molybdenum-containing dehydrogenase catalyzing an unusual 2-hydroxylation of nicotinic acid. Applied Microbiology and Biotechnology, im Druck.

15. B. Thiemer, J. R. Andreesen & T. Schräder (2001): Molecular analysis of a gene cluster involved in tetrahydrofuran degradation in *Pseudonocardia* sp. strain K1. (fertig zur Einreichung bei Arch. Microbiol.)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe. Alle verwendeten Quellen und Hilfsmittel bzw. die daraus entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Halle an der Saale, Januar 2001

Thomas Schräder

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Dr. Thomas Schräder
Anschrift:	Bernhardystr. 2 06110 Halle
Geburtsdatum/-ort:	11. Dezember 1960 in Oedelsheim
Familienstand:	verheiratet
Nationalität:	deutsch

Schulbildung

1967 bis 1971	Grundschule in Oedelsheim
1971 bis 1977	Gesamtschule in Bad Karlshafen
1977 bis 1980	Gymnasium in Hofgeismar Abschluß: Abitur

Zivildienst

Aug. 1980 bis Nov. 1981	Zivildienst im Reha-Zentrum Lippoldsberg

Studium an der Universität Göttingen

Apr. 1982 bis Sep. 1984	Grundstudium der Sozialwissenschaften
Okt. 1984 bis Sep. 1986	Grundstudium Biologie Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Botanik, physikalische und anorganische Chemie
Okt. 1986 bis Sep. 1989	Hauptstudium Biologie mit dem Hauptfach Mikrobiologie und den Nebenfächern organische Chemie und Biochemie
Jan. 1990 bis Apr. 1991	experimentelle Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen Thema: Isolierung und Charakterisierung von Protein C der Glycin-Reduktase aus *Eubacterium acidaminophilum*

Wissenschaftliche Tätigkeit

Juli 1991 bis Juni 1994	Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen Thema: Isolierung, Charakterisierung und Untersuchungen zum Mechanismus der Inaktivierung der D-Aminosäure Oxidase aus *Trigonopsis variabilis.*
Juni 1994	Promotionsprüfung Fächer: Mikrobiologie, organische Chemie und Botanik Gesamtnote: magna cum laude
Juli 1994 bis Jan. 1995	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen
Seit März 1995	Wissenschaftlicher Assistent und Leiter eines mikrobiologisch/biochemisch/molekularbiologischen Labors am Institut für Mikrobiologie der Universität Halle

Halle an der Saale, Januar 2001

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem akademischen Lehrer Herrn Prof. Dr. J. R. Andreesen danken, der es mir ermöglichte, mit einer eigenen Arbeitsgruppe die Grundlagen für die vorgelegte Arbeit zu schaffen. Durch sein stetes Interesse, seine konstruktive Kritik, seine Anregungen und sein Vertrauen hat er meinen wissenschaftlichen Werdegang wesentlich gefördert. Ohne seine Unterstützung wäre die vorgelegte Arbeit nicht möglich gewesen.

Für seine ständige Diskussionsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima im Büro möchte ich Herrn Dr. A. Pich danken. Frau Dr. U. Lechner danke ich für die gewährte Unterstützung bei der Identifizierung verschiedener Mikroorganismen. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. P. Rücknagel danken, der durch die für uns durchgeführten Sequenzierungen und sein stetes Interesse an unserer Arbeit einen wesentlichen Beitrag zu den vorgelegten Ergebnissen geleistet hat. Herrn Andreas Anton danke ich besonders für die kompetente und geduldige Unterstützung in allen Computer-Fragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch allen jetzigen und früheren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die durch ihr Interesse, ihre Leistungsbereitschaft, ihren Fleiß und ihr Engagement die Grundlage für die vorgelegte Arbeit geschaffen haben. Namentlich bedanken möchte ich mich bei: Dorit Becker, Grit Schuffenhauer, Grit Zarnt, Ulrike Kohlweyer, Yvonne Kerwitz, Barbe Schulz, Bernhard Sielaff, Klara Schmitz, Katja Mann, Thomas Wolsch und der technischen Assistentin Karola Otto. Besonders hervorheben möchte ich Frau Barbara Thiemer, die durch die Etablierung neuer Methoden, die Organisation des Labors sowie die Einarbeitung neuer Mitarbeiter einen wesentlichen Beitrag zum Fortgang der Arbeiten geleistet hat. Selbstverständlich gilt mein Dank auch allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Für die finanzielle Unterstützung der vorgelegten Arbeit danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Land Sachsen-Anhalt und dem Fond der Chemischen Industrie.

Last but not least möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung der Ausbildung und bei meiner Frau Elke für ihre Unterstützung in allen Bereichen bedanken.