

# Klonierung der D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von Markus Werner  
aus Hagen

Hauptberichter: Prof. Dr. C. Syldatk

Mitberichter: Prof. Dr. R. D. Schmid

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.2001

Institut für Bioverfahrenstechnik  
Lehrstuhl Physiologische Mikrobiologie  
Universität Stuttgart

2001

## Zusammenfassung

In Ganzzellaktivitätstests mit dem Bodenbakterium *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 konnte gezeigt werden, dass unter geeigneten Bedingungen racemische Gemische von Hydantoinderivaten spezifisch in die entsprechenden D-Aminosäuren umgewandelt werden können. In der vorliegenden Arbeit sollten die molekularbiologischen Grundlagen zur Produktion der an dieser Reaktion beteiligten D-Carbamoylase erarbeitet werden. Um das Gen für dieses Enzym, das in der Zelle nur in sehr geringen Konzentrationen vorlag, zu isolieren, wurde von der These ausgegangen, dass die am Hydantoinabbau beteiligten Enzyme in unmittelbarer Nachbarschaft auf einem gemeinsamen Operon lokalisiert sind. Zur Isolierung des Carbamoylasegens wurde daher zunächst die Aufreinigung der D-Hydantoinase angestrebt. Nach der Fermentation von *A. crystallopoietes* wurde die D-Hydantoinase, die den ersten Schritt der Biotransformation katalysiert, aufgereinigt und proteolytisch verdaut. Basierend auf den neu gewonnenen Proteinsequenzdaten wurden Primer abgeleitet, die anschließend in einer degenerierten Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Verwendung fanden. Das vollständige Gen und weitere flankierende Sequenzbereiche konnten über die Technik der inversen PCR kloniert werden. Durch Sequenzvergleiche mit Protein- und DNA-Datenbanken wurden insgesamt fünf offene Leserahmen identifiziert. Drei davon liegen vollständig vor und zeigen Homologien zu einer Hydantoinase (*hyuH*), D-Carbamoylase (*hyuC<sub>D</sub>*) und einer L-Carbamoylase (*hyuC<sub>L</sub>*). Die ansequenzierten Gene weisen Ähnlichkeiten zu einem Repressor (*orf1*) und einer Permease (*hyuP*) auf. Als Besonderheit gilt das ttg-Startcodon der D-Carbamoylase.

Die D-Carbamoylase wurde heterolog in *Escherichia coli* expremiert und die Funktion des rekombinanten Enzyms durch Aktivitätstests bestätigt. Anschließend wurde das Enzym nach einer Fusion mit einem His-tag über Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt und biochemisch charakterisiert. Dabei weichen die Eigenschaften des Fusionsproteins nicht von denen des Wildtyp-Enzyms ab. Die D-Carbamoylase weist eine breite Substratspezifität auf und setzt sowohl aliphatische als auch aromatische D-Carbamoyl-Aminosäuren um. Im Gegensatz zu bisher in der Literatur beschriebenen D-Carbamoylasen liegt die spezifische Aktivität für D-Carbamoyl-Alanin um den Faktor fünf höher als bei den übrigen Substraten. Weiterhin hebt sich das Enzym von den bisher isolierten D-Carbamoylasen durch ein Temperaturoptimum im unteren, mesophilen Bereich ab. Die übrigen Eigenschaften, wie Metallabhängigkeit, pH-Optimum oder das Molekulargewicht stimmen mit denen, der bisher isolierten D-Carbamoylasen überein.

Die D-Carbamoylase wurde zusammen mit einer D-Carbamoylase aus *Agrobacterium* sp. I IP-671 und einer L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens* zu Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus von D- bzw. L-Carbamoylasen eingesetzt. Hierzu wurden qualitative Assays für die Umsetzung verschiedener D,L-Carbamoyl-Phenylalanin-Derivaten etabliert, die an unterschiedlichen Positionen des Moleküls durch andere Atome oder Atomgruppen substituiert waren. Die Ergebnisse zeigen, dass D-Carbamoylasen die Decarbamoylierung durch einen Amidasemechanismus katalysieren, während L-Carbamoylasen eine „echte“ Decarbamoylierung des Substrates bewirken. Basierend auf den unterschiedlichen Umsetzungsdaten konnten für beide Katalysertypen die zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen beschrieben werden.

Die D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 wurde ebenfalls isoliert und heterolog expremiert, wobei die Expression des löslichen Proteins nachgewiesen werden konnte, nicht aber die Aktivität des Enzyms.

Besonderer Dank für das Zustandekommen dieser Arbeit gilt:

Herrn Prof. Dr. Syldatk und Prof. Dr. Reuss für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes, die wissenschaftliche Unterstützung sowie den Freiraum, den sie mir während meiner Arbeiten gewährt haben.

der Firma Degussa-Hüls für die finanzielle Förderung der Arbeit und Herrn Dr. Bommarius für sein stetiges Interesse und seine Mithilfe.

meinem Betreuer Dr. Martin Siemann, der mich während der Dissertation insbesondere in schwierigen Situationen neu motivierte.

Herrn Dr. Josef Altenbuchner (alias Joe) für die intensive Betreuung bei den genetischen und molekularbiologischen Arbeiten.

Oliver Vielhauer, ohne den der chemisch geprägte Teil der Arbeit nicht möglich gewesen wäre und mir die chemische Seite der Biotechnologie näher brachte (u.a. auch diejenigen, die sich mit Pyrotechnik beschäftigen).

den „Magic 4“ Hans-Jürgen (alias „Schorni“), Ralf Otto und Hans-Joachim, die mir als „naigeschmeckten“ Franken den schwäbischen Dialekt näher brachten und mich lange Zeit mit Uni-Kafeten-Jamiri-Sessions, 80-hours-power-weeks, mehr oder minder philosophische Gespräche und A81-Fahrten während meiner Dissertation begleiteten.

der S1-Besatzung: Kai & Sandra, Nikolaus, Christina und Kerstin, die mir das alltägliche Arbeiten durch die freundliche Atmosphäre und die Bundesliga-Wetten und - Fachgespräche immer sehr angenehm gemacht haben.

meinen Kollegen vom IBVT und ITB Sabine, Tomi, Schwiki, Markus Pietzsch, Till, Ester, Klaus, Stefan, Susi, Jo-Jo, Andreas, Alexej, Franz, Dirk, Toy, Kerstin, Andrea, Gerhard, Luciano, Harald und Frau Moser für eine sehr schöne Zeit am Institut. Sie standen immer mit Rat und Tat zur Seite.

den IIG'lern Dirk Engels, Iris Fischer, Albert Neutzner, Tina Stumpf, Anja Wiese und Burkhard Wilms für viele gute Tips und Ratschläge bei den genetischen Arbeiten. Bei Achim Hauck für die oft auch nächtliche Zusammenarbeit und Hilfe bei den Fermentationen, bei Volker für die Durchführung und die Einarbeitung zur Proteinsequenzierung.

Renate, die geduldig auch meine unausstehlichen Phasen ertragen hat und die nach der Arbeit zusammen mit meiner kleinen Tochter Jana für mein „seelisches Gleichgewicht“ sorgten - auch wenn es mich die ein oder andere Stunde Schlaf kostete.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und Großeltern, auf deren Unterstützung ich mich während meines Studiums und der Dissertation in allen Lebenslagen verlassen konnte.

Danke

Hiermit versichere ich, daß ich die Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.  
Stuttgart, den 11.6.2001

„Wir stehen selbst enttäuscht und sehn betroffen,  
den Vorhang zu und alle Fragen offen.“, Berthold Brecht (1896 - 1956)

## Inhaltsverzeichnis

<i>Abkürzungen und Einheiten</i> .....	4
<i>I Einleitung</i> .....	7
2 AM HYDANTOINABBAU BETEILIGTE ENZYME UND IHRE GENETISCHE ORGANISATION .....	9
2.1 HYDANTOINASE .....	11
2.2 D-CARBAMOYLASE .....	13
2.3 L-CARBAMOYLASE.....	14
3 HYDANTOINASE-PROZESS.....	15
4 BEDEUTUNG ENANTIOMERENREINER D-AMINOSÄUREN .....	16
5 ZIELSETZUNGEN DER ARBEIT .....	19
<i>II Material &amp; Methoden</i> .....	21
1 MATERIAL .....	21
1.1 Chemikalien .....	21
1.2 Enzyme .....	21
1.3 Antibiotika und Medienzusätze .....	22
1.4 Medien .....	22
1.5 Mikroorganismen.....	23
1.6 Plasmide .....	24
1.7 Primer .....	24
1.8 Puffer & Lösungen.....	25
2 METHODEN.....	29
2.1 Mikrobiologische Methoden .....	29
2.1.1 Stammhaltung .....	29
2.1.2 Ganzzellaktivitätstest .....	29
2.1.3 Kultivierung von <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117 .....	30
2.1.4 Kultivierung und Induktion von <i>Escherichia coli</i> .....	30
2.1.5 Zellaufschluss .....	30
2.1.5.1 Ultraschall.....	30
2.1.5.2 Homogenisator .....	31
2.1.5.3 Rührwerkskugelmühle.....	31
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	31
2.2.1 Isolierung genomischer DNA mittels CsCl <sub>2</sub> -Dichtegradientenzentrifugation.....	31
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA .....	32
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA-haltigen Lösungen .....	32
2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen .....	32
2.2.5 TSS-Transformation .....	32
2.2.6 Elektrophorese von Nukleinsäuren .....	33
2.2.7 Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen .....	33
2.2.8 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren.....	33
2.2.8.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	33
2.2.8.2 Ligation .....	34

2.2.8.3 Selbstligation.....	34
2.2.9 DNA-Markierung mit $\alpha$ - <sup>32</sup> P-ATP.....	34
2.2.10 Southern Blot.....	35
2.2.11 Hybridisierung.....	36
2.2.12 Detektion der radioaktiv markierten DNA mittels Röntgenfilm und Phosphoscreen.....	36
2.2.13 DNA-Sequenzierung.....	36
2.2.14 Standard-PCR.....	37
2.2.15 IPCR.....	38
2.2.16 PCR-Klonierung.....	38
2.3 <i>Proteinbiochemische Methoden</i> .....	40
2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford.....	40
2.3.2 Enzymaktivität.....	40
2.3.2.1 Hydantoinaseaktivität.....	40
2.3.2.2 Carbamoylaseaktivität.....	42
2.3.2.3 Qualitative Assays zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus von D- und L-Carbamoylase.....	43
2.3.3 Proteinaufreinigung der D-Hydantoinase aus <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117.....	44
2.3.3.1 Protaminsulfat-Fällung.....	45
2.3.3.2 Streamline-DEAE-Chromatographie.....	45
2.3.3.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie.....	45
2.3.3.4 Anionenaustauschchromatographie.....	46
2.3.4 Proteinaufreinigung der rekombinanten Enzymen.....	46
2.3.4.1 His-getagte Enzyme.....	46
2.3.4.2 Streptag-Enzyme.....	47
2.3.5 SDS-PAGE.....	47
2.3.6 Native Gelelektrophorese.....	48
2.3.7 Tryptischer Peptidverdau.....	49
2.3.8 Präperative HPLC zur Auftrennung eines Peptidgemisches.....	49
2.3.9 Western-Blot.....	50
2.3.10 N-terminale Proteinsequenzierung.....	50
2.3.11 Densitometrische Auswertung von Proteingelen.....	50
2.4 <i>Chemische Synthesen</i> .....	51
2.5 <i>Software</i> .....	52
2.6 <i>Geräte</i> .....	53
III <i>Ergebnisse</i> .....	54
1 BIOMASSEGEWINNUNG VON ARTHROBACTER CRYSTALLOPOIETES DSM 20117.....	54
2 GANZZELLAKTIVITÄTSTESTS.....	55
3 AUFREINIGUNG DER D-HYDANTOINASE AUS ARTHROBACTER CRYSTALLOPOIETES DSM 20117.....	57
4 TRYPTISCHER VERDAU DER D-HYDANTOINASE.....	59
5 KLONIERUNG DES HYU-GENCLUSTERS.....	61
5.1 <i>Isolierung chromosomaler DNA aus Arthrobacter crystallopoietes DSM 20117</i> .....	61
5.2 <i>PCR mit degenerierten Primern</i> .....	61
5.3 <i>Sequenzierung des hyu-Genclusters über Inverse PCR</i> .....	64

6 ANALYSE DER GESAMTSEQUENZ UND HOMOLOGIERECHERCHE .....	70
7 KLONIERUNG UND EXPRESSION DER STRUKTURGENE .....	72
7.1 <i>D-Carbamoylase</i> .....	72
7.1.1 Expression der D-Carbamoylase .....	72
7.1.2 Aufreinigung der D-Carbamoylase .....	76
7.1.3 Charakterisierung der D-Carbamoylase .....	77
7.1.3.1 Bestimmung des pH-Optimums .....	77
7.1.3.2 Temperaturstabilität .....	78
7.1.3.3 Bestimmung des Temperaturoptimums .....	79
7.1.3.4 Bestimmung kinetischer Parameter .....	79
7.1.3.5 Bestimmung des Molekulargewichtes .....	80
7.1.3.6 Cofaktorabhängigkeit .....	81
7.1.3.7 Substratspezifität .....	82
7.2 <i>L-Carbamoylase</i> .....	84
7.3 <i>D-Hydantoinase</i> .....	85
8 VERGLEICH DES REAKTIONSMCHANISMUS VON D-CARBAMOYLASEN UND L-CARBAMOYLASEN .....	86
<i>IV Diskussion</i> .....	90
1 GANZZELLAKTIVITÄTSTESTS .....	91
2 KULTIVIERUNG VON ARTHROBACTER CRYSTALLOPOIETES DSM 20117 .....	92
3 AUFREINIGUNG DER D-HYDANTOINASE .....	92
4 EXPRESSION DER D-CARBAMOYLASE .....	96
5 CHARAKTERISIERUNG DER D-CARBAMOYLASE .....	97
6 L-CARBAMOYLASE .....	100
7 D-HYDANTOINASE .....	102
8 HYDANTOINPERMEASE UND HYPOTETISCHES REGULATORGEN .....	102
9 DER REAKTIONSMCHANISMUS DER D- UND L-CARBAMOYLASEN .....	103
9.1 <i>Reaktionsmechanismus der D-Carbamoylase</i> .....	105
9.2 <i>Reaktionsmechanismus der L-Carbamoylase aus Arthrobacter aureescens</i> .....	106
9.3 <i>Einfluss der übrigen Positionen</i> .....	109
9.4 <i>Herstellung von enantiomerenreinen <math>\alpha</math>-Hydroxy-Carbonsäuren</i> .....	110
<i>V Ausblick</i> .....	111
<i>VI Literatur</i> .....	112
<i>VII Anhang</i> .....	123
1 PLASMIDE .....	123
2 DNA-SEQUENZ DES HYU-GENCLUSTERS AUS A. CRYSTALLOPOIETES DSM 20117 .....	125

## Abkürzungen und Einheiten

### Abkürzungen

$\lambda$	Wellenlänge
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BFM	Biofeuchtmasse
BH	D,L-5-Benzylhydantoin
BSA	Rinderserumalbumin
C-Phe	D,L-Carbamoylphenylalanin
DEAE	Diethylaminoethyl
DHP	Dihydropyrimidinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNAP	DNA-Polymerase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
EB	Elution Buffer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
$E_x$	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
GTP/CTP/TTP/ATP	Guanosin-/Cytosin-/Thymidin-/Adenosin-5'-triphosphat
HIC	hydrobe Interaktionschromatographie
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
8-HQSA	8-Hydroxyquinolinsulfonäure
<i>hyu</i>	hydantoin utilization
IIG	Institut für industrielle Genetik
IPCR	Inverse Polymerase Chain Reaction
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LB	Luria-Bertani-Medium
LHRH	lutinizierende hormon releasing hormon
MW	Molekulargewicht
MWM	Molekular Weight Marker



nanopur	bidestilliertes H <sub>2</sub> O
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	open reading frame; offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
Phe	Phenylalanin
pI	Isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSC	Natriumchlorid, Natriumcitrat-Lösung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamid
T	Temperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transformation and storage solution
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VE-H <sub>2</sub> O	vollentionisiertes Wasser
w/v	weight per volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-Indolyl-β-Galactosid

**Einheiten**

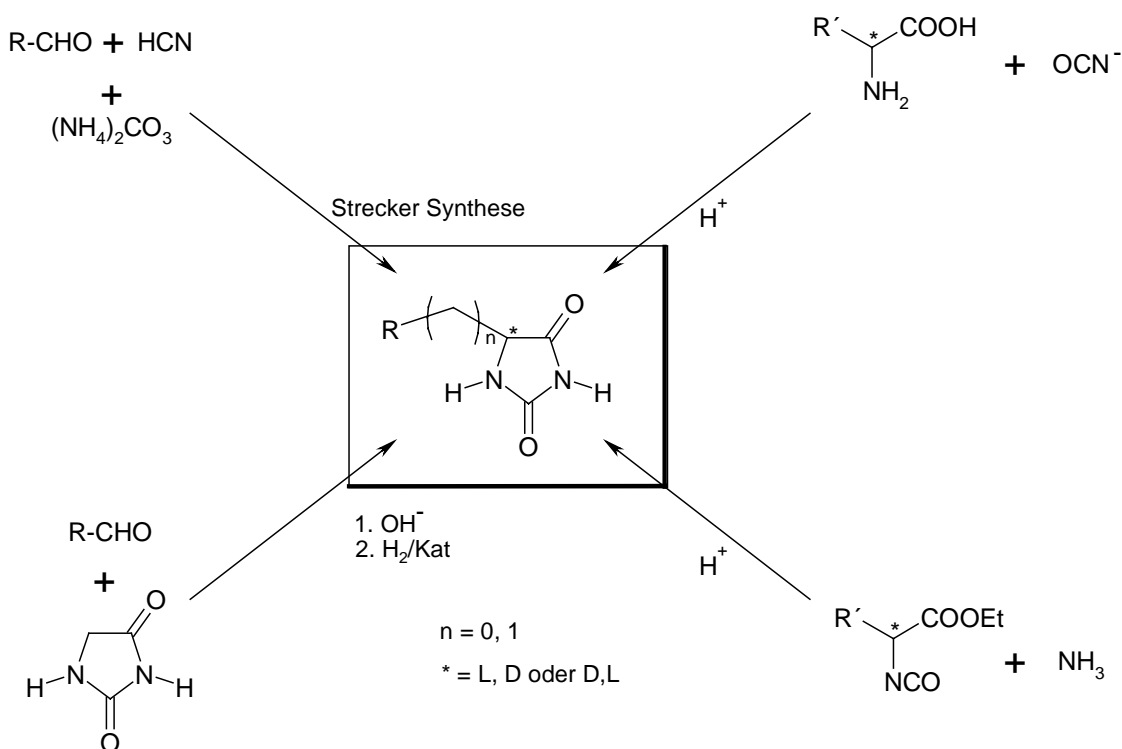
°C	Grad Celsius
cpm	counts per minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
bp	Basenpaare
g	Gramm
h	Stunde
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	mol/l
mA	Milliampère
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
nm	Nanometer
pmol	picomol
s	Sekunde
U	Units (µmol/min)
V	Volt

## I Einleitung

Im Jahre 1861 gelang erstmals die chemische Synthese von Hydantoin durch Reduktion von Allantoin, einem zyklischen Amid, das als Zwischenprodukt im Purinabbau auftritt. In den 30-er Jahren wurden für 5,5-disubstituierte Hydantoinderivate erstmals pharmakologische Wirkungen beschrieben. Diphenylhydantoin (Dilantin<sup>®</sup>) wird auch heute noch als Antikonvulsiva bei der Behandlung von Epilepsie und Parkinson eingesetzt (Kita et al., 2000).

Weil Hydantoine auch als cyclische Ureide von  $\alpha$ -Aminosäuren aufgefaßt werden können, wurden racemische 5-monosubstituierte Hydantoinderivate in den 60-er Jahren erstmals als Vorläufersubstanzen für die industrielle Produktion von optisch aktiven  $\alpha$ -Aminosäuren eingesetzt. Deshalb wuchs der Bedarf an einfachen und kostengünstigen Verfahren zur chemischen Synthese dieser Hydantoinderivate, sodass heute im Wesentlichen vier Verfahren zu deren Herstellung etabliert sind (siehe Abbildung 1).

Sowohl Struktur und Eigenschaften von Hydantoinen als auch deren Synthese und Anwendungsmöglichkeiten sind in der Literatur ausführlich beschrieben (Kleinpeter, 1997; Ogawa, 1999; Beller 1999).



**Abbildung 1: Herstellungsverfahren zur chemische Synthese von Hydantoinen**

Systematisch wird Hydantoin auch als Imidazolidin-2,4-dion bezeichnet und liegt unter physiologischen Bedingungen in einer durch Keto-Enol-Tautomerie stabilisierten Form vor (siehe Abbildung 2). Die meisten Hydantoinderivate racemisieren nur langsam, wobei Hydantoine mit

aromatischen und hydrophilen Resten aufgrund der höheren Elektronegativität schneller racemisieren als solche, mit aliphatischen Resten (Syldatk et al., 1992; siehe Tabelle 1). Die Racemisierung der Hydantoinderivate ist bei niedrigen pH-Werten und hohen Temperaturen begünstigt.

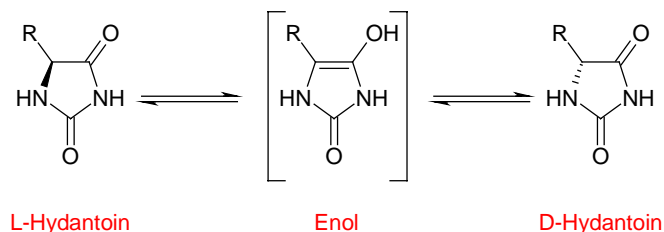


Abbildung 2: Keto-Enol-Tautomerie von 5-monosubstituierten Hydantoinderivaten

Tabelle 1: Racemisierungskonstanten  $k_{rac}$  und Halbwertszeiten  $t_{1/2rac}$  für unterschiedliche Hydantoinne bei pH 8.5 und 40°C

5-monosubstituierte Hydantoinne	korrespondierende D-Aminosäure	$k_{rac}$ (h <sup>-1</sup> )	$t_{1/2,rac}$ (h)
Substituent:			
Phenyl	D-Phenylglycin	2.59	0.27
Hydroxymethyl	D-Serin	0.43	1.60
Benzyl	D-Phenylalanin	0.14	5.00
Methylthioethyl	D-Methionin	0.12	5.82
1'-Hydroxyethyl	D- <i>allo</i> -Threonin	0.11	6.41
3'-Ureidopropyl	D-Citrullin	0.049	14.26
1'-Methylethyl	D- <i>allo</i> -Isoleucin	0.044	15.84
Imidazolylmethyl	D-Histidin	0.043	16.09
Isobutyl	D-Leucin	0.032	21.42
Methyl	D-Alanin	0.020	33.98
Isopropyl	D-Valin	0.012	55.90

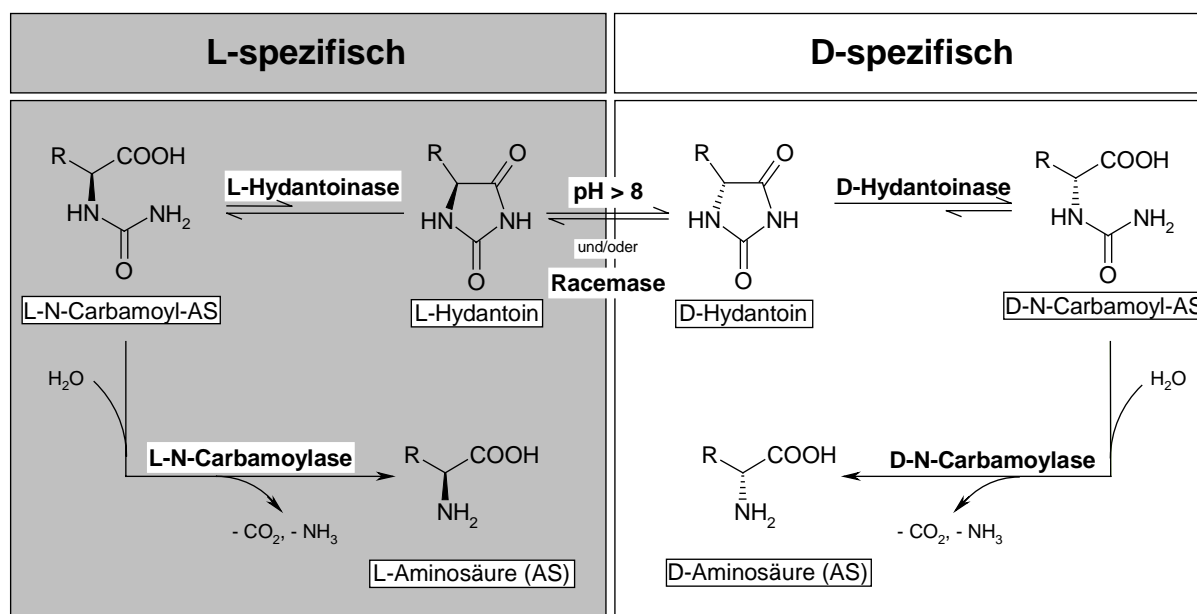
Bei der Berechnung der Daten wurde eine Reaktion 1. Ordnung angenommen:

$$\ln ([a]/[a]_0) = -k_{rac} \cdot t; t_{1/2,rac} = \ln 2/k_{rac}$$

Aktuelle Bemühungen im Bereich der chemischen Synthese von Hydantoinen befassen sich mit dem Ziel, „Eintopfreaktionen“ zu etablieren, die eine kostengünstige und einfache Synthese der Hydantoinderivate ermöglichen (Beller 1999).

## 2 Am Hydantoinabbau beteiligte Enzyme und ihre genetische Organisation

Nachdem man in den 40-er Jahren erkannt hatte, dass Mikroorganismen Hydantoinderivate als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nutzen können, fand man bald heraus, welche Enzyme für den Abbau verantwortlich sind. Im ersten Schritt katalysiert eine Hydantoinase die zumeist stereoselektiv verlaufende Ringöffnung. Die entstandene Carbamoylaminosäure wird dann in einem zweiten, irreversiblen Schritt durch eine *N*-Carbamoylaminosäure-Amidohydrolase (*N*-Carbamoylase) in die freie Aminosäure umgesetzt. In Abhängigkeit davon, ob D- oder L-spezifische Enzyme an dieser Umsetzung beteiligt sind, entstehen enantiomerenreine D- oder L- $\alpha$ -Aminosäuren. Den Transport des Substrates in das Zellinnere übernehmen vermutlich Permeasen. Racemasen ermöglichen eine vollständige Umsetzung des racemischen 5'-substituierten Hydantoin in die entsprechende Aminosäure. Das allgemeine Reaktionsschema ist in Abbildung 3 dargestellt.

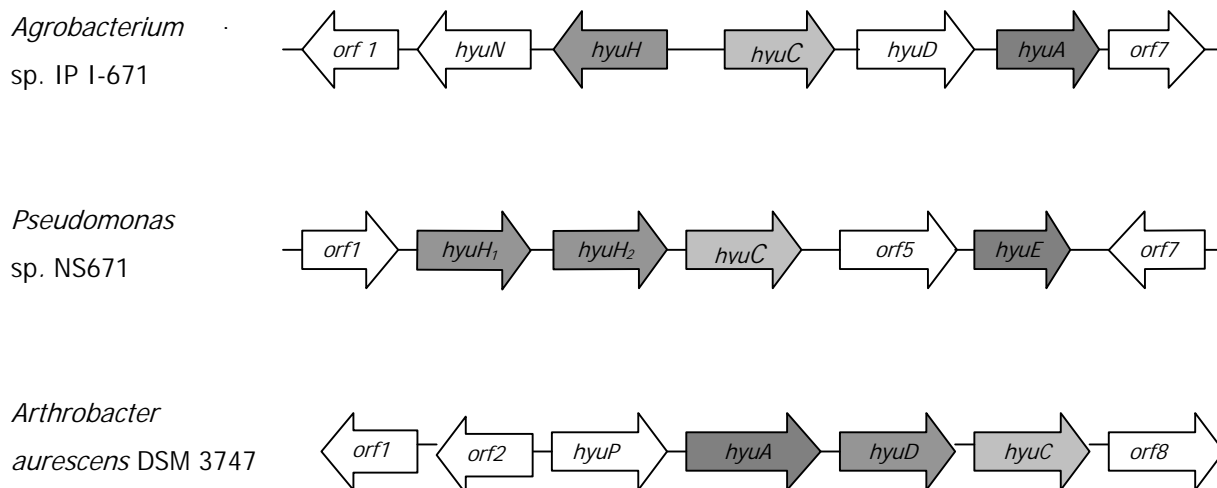


**Abbildung 3:** Allgemeines Reaktionsschema für die Herstellung optisch reiner D- oder L-Aminosäuren mit dem Hydantoinaseverfahren.

Beim Screening nach Hydantoin-verwertenden Mikroorganismen wurden bisher sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Prokaryonten aus fünf verschiedenen phylogenetischen Gruppen isoliert: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Blastobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Thermus* und *Agrobacterium*. Eine vollständige Anordnung der Gene, die für die am Abbau beteiligten Enzyme kodieren, ist bisher nur für drei Organismen beschrieben worden. Dabei sind die codierenden Strukturgene der Enzyme in Form eines sogenannten *hyu*<sup>1</sup>-Genclusters auf der genomischen DNA (*Arthrobacter* und *Agrobacterium*) oder auf einem Plasmid (*Pseudomonas*)

<sup>1</sup> *hyu* steht als Abkürzung für „hydantoin utilizing“; nach Watabe et al., 1992

nebeneinander angeordnet (siehe Abbildung 4). Von den drei *hyu*-Genclustern beinhalten *Agrobacterium* und *Pseudomonas* die Gene für eine D-selektive Spaltung und *Arthrobacter* Gene für eine L-selektive Spaltung.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der bekannten Sequenzbereiche der Hydantoin-Gencluster aus *Agrobacterium* sp. IP I-671 (Hils, 1998), *Pseudomonas* sp. NS671 (Watabe et al., 1992) und *Arthrobacter aureescens* DSM 3747 (Wiese, 2000); *hyuA*, *hyuB* und *hyuH* Hydantoinase, *hyuD* (hypothetische D-Aminosäure-Dehydrogenase), *hyuC* (Carbamoylase), *hyuN* (hypothetische NADPH-Flavin-Oxidoreduktase), *hyuA* und *hyuE* (hypothetische Racemasen), *hyuP* (Permease)

Ein genetisches Element, das an der Regulation der Gentranskription beteiligt ist, konnte bisher nicht identifiziert werden. Auch mit dem Genprodukt von *orf8* aus *Arthrobacter aureescens*, das Homologien zu Regulationsproteinen der *lacI*-Familie aufweist, konnte kein Einfluss auf die Transkription nachgewiesen werden (Wiese, 2000). Allerdings wird in der Literatur einigen Hydantoin- und Purinderivaten ein induktiver Effekt zugeschrieben, wenn diese Substanzen bei der Kultivierung im Medium enthalten sind (C. Sylđatk et al., 1990/1992 und Meyer et al., 1993).

Die physiologische Funktion der Hydantoin-spaltenden Enzyme ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben einer metabolischen Funktion innerhalb des Purin- und Pyrimidinkatabolismus, wird auch die Nutzung von Hydantoinderivaten als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle diskutiert. Dabei fallen Hydantoinderivate als Sekundärmetabolite und auch in Exkrementen von einigen Säugern an (Hils, 1998). Im folgenden werden die Eigenschaften und Charakteristika der Enzyme Hydantoinase, D-Carbamoylase und L-Carbamoylase näher beschrieben.

## 2.1 Hydantoinase

Die Hydantoinasen werden in der Enzymnomenklatur den zyklischen Amidasen (EC 3.5.2) zugeordnet und lassen sich dabei in zwei Gruppen unterteilen. Eine, die natürlicherweise vorkommende Hydantoinderivate als Substrate nutzt (z.B. Carboxymethyl-Hydantoinase (EC 3.5.2.4), Allantoinase (EC 3.5.2.5), 1-Methyl Hydantoinase (EC 3.5.2.14) und Carboxyethyl-Hydantoinase (EC 3.5.2.) und eine zweite, die zyklische Amide als Substrate umsetzt (z.B. Barbiturase (3.5.2.1), Dihydropyrimidinase (EC 3.5.2.2) und Dihydroorotase (EC 3.5.2.3).

Aufgrund phylogenetischer Stammbaumanalysen konnte gezeigt werden, dass die zyklischen Amidasen, mit Ausnahme der ATP-abhängigen Hydantoinasen, einer Proteinsuperfamilie angehören (May et al., 1998). Diese weist Verwandtschaftsbeziehungen zu Ureasen auf und kann als das Ergebnis einer divergenten Evolution angesehen werden (May et al., 1998 und Kim et al., 1998). Zusammen mit Nitrilasen und Amidasen könnte diese Enzymklasse ihren Ursprung vermutlich in den präbiotischen Bedingungen der frühen Entstehung des Lebens haben. Mittlerweile gibt es einige Hinweise darauf, dass in dieser Phase der Entstehung des Lebens nicht  $\alpha$ -Aminosäuren sondern *N*-Carbamoyl- $\alpha$ -Aminosäuren die ersten Bausteine für präbiotische Peptide darstellten (Taillades et al., 1998).

Die Verwandtschaft unter den zyklischen Amidasen wird unter anderem durch hoch konservierte Sequenzbereiche belegt. Ein Beispiel hierfür ist das Zinkbindungsmotiv der zyklischen Amidasen, das sowohl strukturelle als auch katalytische Funktionen im Protein übernimmt (May et al., 1998 und 1999).

Eine Klassifizierung der Hydantoinasen, die sich aufgrund der Anwendung in der chemischen Industrie lediglich an der Stereoselektivität orientiert, spiegelt nicht deren phylogenetische Beziehungen wieder (Ogawa et al., 1997).

Die Fähigkeit der Dihydropyrimidinase (EC 3.5.2.2), Sechsringsysteme wie 5,6-Dihydropyrimidin, 5,6-Dihydrouracil oder 5,6-Dihydrothymin zu öffnen, kann auf die physiologische Funktion des Enzyms im Purinabbau zurückgeführt werden. Dieses in Eu- und Prokaryonten weit verbreitete Enzym ist im Gegensatz zur L-selektiven Dihydroorotase (EC 3.5.2.3) strikt D-selektiv.

Eine alternative Bezeichnung für die Dihydropyrimidinase ist „D-Hydantoinase“, weil das Enzym auch in der Lage ist, D,L-5-monosubstituierte Hydantoinderivate mit hohen Aktivitäten zu spalten. Die Reaktionsschemata für beide Enzyme sind in Abbildung 5 dargestellt.

Runser und Meyer beschreiben eine D-Hydantoinase, die keine Dihydropyrimidinase-Aktivität besitzt (Runser et al., 1993), sodass die natürliche Funktion dieser und auch anderer Hydantoinasen vermutlich nicht im Bereich des Nukleotidstoffwechsels zu finden ist.

Aktivität für 5',5'-disubstituierte Hydantoine konnte bisher nur von Rai et al. für aus Papain und Linsen isolierte Pflanzenextrakte nachgewiesen werden (Rai et al., 1996 und 1998).

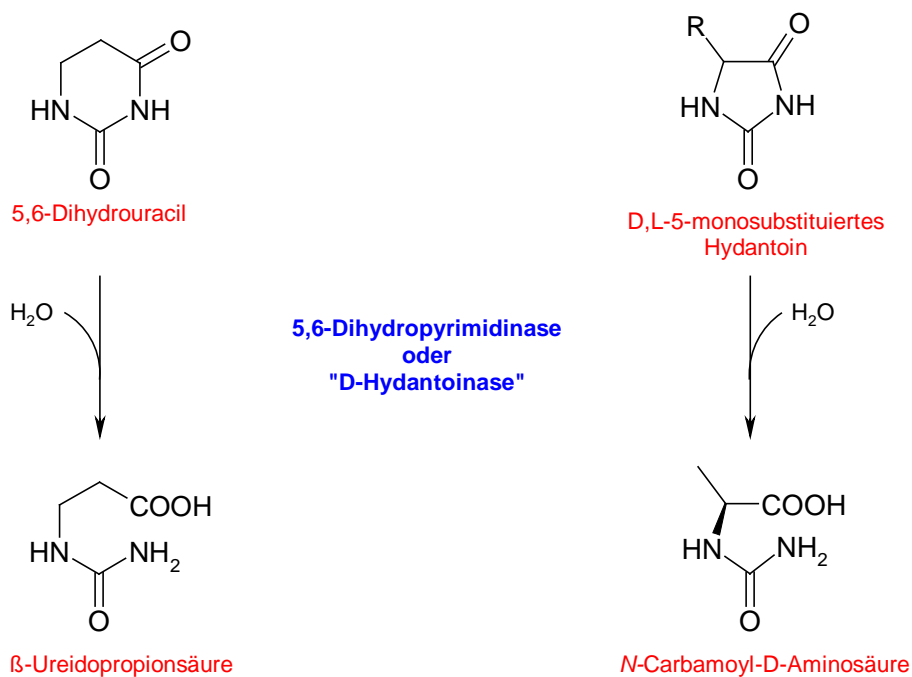


Abbildung 5: Analogie der Reaktionen von Dihydropyrimidinase (links) und D-Hydantoinase (rechts)

Trotz dieser Unterschiede weisen beide Enzyme auch eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf: sie sind metallabhängig, besitzen eine breite Substratspezifität bezüglich des 5'-substituierten Restes und sind strikt D-spezifisch.

Die bisherigen Hypothesen zum Reaktionsmechanismus der D-Hydantoinase (May et al., 1998 und Jahnke et al., 1993) könnten nun, nach der Aufklärung der ersten Röntgenstruktur einer D-Hydantoinase aus *Thermus* sp., näher untersucht werden (Abendroth et al., 2000). Durch die Modellierung von Substraten in das aktive Zentrum wäre es möglich, bisher ungeklärte Fragen zu lösen. So ist beispielsweise nicht bekannt, weshalb disubstituierte Hydantoine nicht von bakteriellen Hydantoinasen akzeptiert werden oder weshalb unterschiedliche Substrate von der L-Hydantoinase aus *Arthrobacter aurescens* zum einen L- und zum anderen D-selektiv umgesetzt werden.

Diese Fragestellungen liefern möglicherweise auch Ansatzpunkte für das rationale Proteindesign, mit dessen Hilfe Substratspektren erweitert und Selektivitäten verbessert werden könnten. Bisherige Beeinflussungen der Enzymeigenschaften wurden durch den Ansatz der gerichteten Evolution erreicht, mit dem sowohl die Selektivität als auch die Aktivität einer L-Hydantoinase gesteigert werden konnte (May et al., 2000).



## 2.2 D-Carbamoylase

In einigen Fällen wird die Assoziation der D-Hydantoinasen mit D-spezifischen *N*-Carbamoyl-D-Aminosäure-Amidohydrolasen (D-*N*-Carbamoylasen) beschrieben. Anfangs wurde vermutet, dass es sich bei diesem Enzym um eine  $\beta$ -Ureidopropionase (EC 3.5.1.6) handeln könnte, die die Decarbamoylierung von  $\beta$ -Ureidopropionat zu  $\beta$ -Alanin katalysiert. Allerdings konnte durch weitere Untersuchungen zur Stereoselektivität (Ogawa et al., 1994; Ogawa) und aufgrund des Vergleiches von Aminosäuresequenzen (Olivieri et al., 1981; Campbell, 1958, Watanabe et al., 1972) die Hypothese dieser Funktionsbeziehung nicht mehr aufrecht erhalten werden.

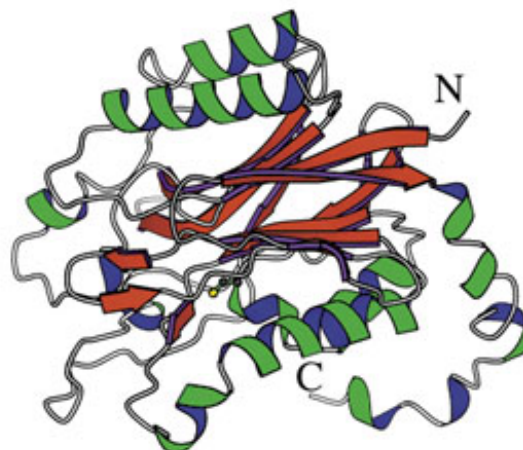
D-*N*-Carbamoylasen konnten sowohl aus eukaryontischen als auch aus mikrobiellen Organismen isoliert werden. Im Gegensatz zu den D-Hydantoinasen stellt die Instabilität dieser Enzyme eines der Hauptprobleme für die spätere Anwendung dar (Syldatk et al., 1992). Die aus Prokaryonten isolierten D-*N*-Carbamoylasen stammen aus unterschiedlichen Gattungen, wie *Agrobacterium* sp. (Olivieri et al., 1981; Kim et al., 1994; Buson et al., 1996; Nanba et al., 1998), *Blastobacter* sp. A17p-4 (Ogawa et al., 1994), *Clostridium uracilicum* (Campbell, 1958), *Comamonas acidovorans* (Ogawa et al., 1993), *Pseudomonas putida* 77 (Kim et al., 1986) und *Pseudomonas* sp. AJ-11220 (Takahashi et al., 1978). Die Induktion der Enzymsynthese erfolgte zuvor durch Zugabe von *N*-Carbamoylaminosäuren, Pyrimidin- oder Hydantoinderivate oder von nicht metabolisierbaren Thioderivaten dieser Verbindungen (Meyer et al., 1993).

Während die physiologische Funktion der *N*-Carbamoylsarcosin-Amidohydrolase innerhalb des Creatininstoffwechsels gesehen wird (Kim et al., 1986), bleibt die metabolische Funktion der anderen D-*N*-Carbamoylasen bisher unbekannt. Fast alle besitzen ein Molekulargewicht von ungefähr 35 kDa, ein pH-Optimum von 7 bis 9 und akzeptieren ein breites Substratspektrum an aliphatischen und aromatischen *N*-Carbamoyl-Aminosäurederivaten. Metallabhängigkeiten sind für diese Enzyme noch nicht beschrieben worden. Die D-*N*-Carbamoylasen aus *Agrobacterium* sp. und *Pseudomonas* sp. AJ-11220 sind weitgehend identisch. Die Enzyme aus beiden Organismen setzen jeweils nur das D-Enantiomer von aliphatischen und aromatischen Hydantoinensäuren um (Olivieri et al., 1979; Yokozeki et al., 1987), werden durch Ammoniumionen gehemmt und inaktivieren sehr schnell in Abwesenheit von Sulfhydryl-Schutzgruppen (Louwrier et al., 1997; Nanba et al., 1998).

Durch ortsgerichtete Mutagenese konnten Grifantini *et al.* beweisen, dass von fünf Cysteinen in *Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291 das Cystein 172 für die Enzymaktivität essentiell ist (Grifantini et al., 1996). Um die Stabilität dieser Enzyme zu erhöhen, wurden bereits zahlreiche Anstrengungen unternommen. Einen weiteren Ansatz zur Erhöhung der Stabilität verfolgten auch Nanba und Mitarbeiter, als sie durch Substitution des Prolin203 durch Leucin eine temperaturstabile Variante der rekombinanten D-Carbamoylase aus *Agrobacterium* sp. KNK712 erzielten (Nanba et al., 1998). Neben der Stabilisierung durch Immobilisierung versuchten Kim und Kim die

Endprodukthemmung durch adsorptives Entfernen der Ammoniumionen an Silikate zu verhindern (Kim und Kim, 1994).

Weitere Fortschritte bei der Optimierung der Enzymaktivität und der Interpretation der bisherigen Ergebnisse sind durch die vor kurzem aufgeklärte Röntgenstruktur der D-*N*-Carbamoylase aus *Agrobacterium* sp. KNK712 zu erwarten (Nakai et al., 2000; siehe Abbildung 6). In dieser Arbeit konnte auch das aktive Zentrum des Enzyms identifiziert werden. Es besteht aus einer Art katalytischer Triade, die von den Aminosäureresten Glutamat46, Lysin126 und Cystein171 gebildet wird. Nach einer Modellierung des D-Carbamoyl-Phenylalanins in das aktive Zentrum konnte der Cysteinrest



**Abbildung 6:** Dreidimensionale Darstellung der D-*N*-Carbamoylase aus *Agrobacterium* sp. KNK712 (aus Nakai et al., 2000)

als angreifendes Nukleophil identifiziert werden. Das Glutamat bewirkt durch eine allgemeine Basenaktivierung eine Stabilisierung des Übergangszustandes und macht so die Decarbamoylierung möglich. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Hypothese für den Reaktionsmechanismus der D-*N*-Carbamoylasen aufgestellt.

### 2.3 L-Carbamoylase

Wie die D-*N*-Carbamoylasen sind auch die L-*N*-Carbamoylasen in einer Reihe von Gattungen zu finden (*Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Blastobacter*, *Clostridium*, *Flavobacterium* und *Pseudomonas*) und treten immer in Assoziation mit L-Hydantoinasen auf. Im Gegensatz zu den häufig in Abhängigkeit vom Substrat D- oder L-selektiven Hydantoinasen sind die L-Carbamoylasen strikt L-spezifisch.

Auch die physiologische Funktion dieser Enzyme ist noch unbekannt. Eine Ausnahme macht die L-selektive  $\beta$ -Ureidosuccinase aus *Clostridium oroticum*, die vermutlich im Stoffwechsel die Umsetzung von *N*-Carbamoyl-Aspartat in L-Asparaginsäure katalysiert (Liebermann et al., 1954).

Alle L-*N*-Carbamoylasen sind meso- bis thermophil, besitzen ein pH-Optimum zwischen 7,5 und 8,5. Die Enzyme aus *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus brevis* AJ-12299, *Bacillus stearothermophilus* NS1122A, *Pseudomonas putida* IFO12996 und *Pseudomonas* sp. NS671 sind durch eines oder mehrere der folgenden Ionen aktivierbar:  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ .

Neben der Metallaktivierung weisen die L-*N*-Carbamoylasen noch einige andere Unterschiede gegenüber den D-Carbamoylasen: Die L-*N*-Carbamoylasen sind in der Lage, *N*-Acetyl- oder *N*-Formylaminosäuren umzusetzen (Ogawa et al., 1994 und 1995, Wilms et al., 1999) und unterscheiden

sich untereinander in ihrer Substratspezifität: Einige setzen vorzugsweise Substrate mit aliphatischen Resten um (*Alcaligenes*, *Bacillus* und *Pseudomonas*), andere mit aromatischen (*Arthrobacter* und *Flavobacterium*). Lediglich *Pseudomonas* NS671 akzeptiert sowohl aromatische als auch aliphatische *N*-Carbamoyl-Substrate (Ishikawa et al., 1996). Eine weitere Besonderheit weist die L-*N*-Carbamoylase aus *Pseudomonas putida* IFO 12996 auf, die als einzige das im Pyrimidinstoffwechsel auftretende *N*-Carbamoyl- $\beta$ -alanin als Substrat akzeptiert.

### **3 Hydantoinase-Prozess**

Wird die Umsetzung der Hydantoinderivate mittels ganzer Zellen oder mit isolierten Enzymen zur industriellen Herstellung enantiomerenreiner Aminosäuren durchgeführt, so spricht man vom „Hydantoinase-Prozess“. Gegenüber anderen Konkurrenzverfahren bietet dieses biokatalytische Verfahren den Vorteil, dass unter optimalen Bedingungen das racemisch vorliegende Substrat vollständig in das chirale Produkt überführt werden kann. Bei der chemischen Synthese liegen die Reaktionsprodukte als Racemate vor, und die Enantiomere müssen erst über Diastereomerentrennung voneinander getrennt werden.

Während zur Herstellung von L-Aminosäuren auch Extraktionsverfahren aus Proteinhydrolysaten und Fermentationsprozesse in Frage kommen, sind nicht proteinogene Aminosäuren durch diese Herstellungsverfahren nicht zugänglich. Daher kommt in diesem Produktbereich dem Hydantoinaseverfahren besondere Bedeutung zu.

Bis in die 90-er Jahre wurden zumeist aus Screeningprojekten hervorgegangenen Wildtypstämme als Ganzzellkatalysatoren eingesetzt (Ogawa et al., 1999), während später zunehmend auch Umsetzungen mit freien oder immobilisierten Enzymen durchgeführt wurden (Syldatk et al., 1992 und 1999).

Durch die Verwendung der Aminosäuren D-Phenylglycin und D-*para*-Hydroxyphenylglycin als Baustein zur Herstellung von semisynthetischen Penicillinen (siehe I-4), vergrößerte sich der Bedarf an diesen Aminosäuren auf mehrere Tausend Tonnen pro Jahr. Dies führte zur Etablierung unterschiedlicher Verfahrensweisen des Hydantoinase-Prozesses, wie sie in Abbildung 7 schematisch dargestellt sind. Der Vorteil des „Recordati“-Prozesses beruht darauf, dass eine chemische Decarbamoylierung unter Verwendung von  $\text{HNO}_2$  umgangen wird, indem der immobilisierte Biokatalysator neben der Hydantoinaseaktivität auch eine D-Carbamoylaseaktivität aufweist. Auf diese Weise kann die Umweltbelastung durch die ausbleibende Säurefracht reduziert und es können Kosten eingespart werden. Außerdem werden D-Aminosäuren wie D-Tryptophan, D-Citrullin oder D-Pyridylalanin zugänglich, die ansonsten durch die Behandlung mit salpetriger Säure zerstört werden würden.

Während sich die Hydantoinase als temperatur- und lagerstabiles Enzym erweist, das sich auch gut zur Immobilisierung einsetzen läßt, stellt jedoch die Instabilität der D-Carbamoylase auch in ruhenden Zellen eines der Hauptprobleme bei der Verbesserung der Raum-Zeit-Ausbeuten bei diesem Verfahren dar (Kim et al., 1994).

Um diese Limitation zu beseitigen, beschäftigen sich aktuelle Arbeiten mit der Schaffung von Fusionsproteinen aus Hydantoinase und Carbamoylase (Kim GJ et al., 2000), der Konstruktion von maßgeschneiderten, rekombinanten Ganzzellkatalysatoren (Wilms et al., 2000) und mit der Optimierung der Enzymeigenschaften durch gerichtete Evolution (May et al., 2000).

Die Enzyme der L-Route wurden von den Firmen Ajinomoto und Tanabe erstmals in Form von ruhenden Zellen zur industriellen Produktion von L-Tryptophan eingesetzt (Nishida et al., 1987). Zur Effizienzsteigerung dieses Prozesses wurde die L-*N*-Carbamoylase aus *Arthrobacter aureescens* in *Escherichia coli* im Hochzelllichtverfahren kultiviert. Die heterologe Expression erfolgte über einen *rha-BAD*-Promotor, mit dem die Bildung unlöslichen Proteins in Form von inclusion bodies zum größten Teil ausgeschlossen werden konnte. Durch den Einsatz eines *Escherichia coli* Ganzzellkatalysators, der die Gene der Racemase, Hydantoinase und L-*N*-Carbamoylase in rekombinanter Form auf drei verschiedenen Plasmiden vereint, konnte durch die jeweilige Kopienanzahl der Plasmidkonstrukte ein optimales Verhältnis zwischen den drei Enzymen in der Zelle eingestellt werden. Auf diese Weise konnte während der Biotransformation eine Akkumulation der *N*-Carbamoylaminosäure als Zwischenprodukt verhindert werden (Wilms et al., 2000).

#### **4 Bedeutung enantiomerenreiner D-Aminosäuren**

Aminosäuren, als Bausteine des Lebens, kommen in allen Lebewesen vor und besitzen, mit Ausnahme des Glycins, chiralen Charakter. In der Natur kommen Aminosäuren fast ausschließlich als L-Enantiomer vor und finden in dieser Form in der Industrie auch eine weitverbreitete Anwendung als Nahrungsmittelsupplement, Geschmacksverstärker, Süßungsmittel oder Bestandteil von Kosmetika und Arzneimitteln. Dagegen treten die D-Aminosäuren in der Natur nur in einigen Ausnahmefällen in Erscheinung, wie beispielsweise D-Aminosäuren in Pflanzenzellen, D-Alanin und D-Glutamat als essentieller Bestandteil des Peptidoglycan-Gerüsts vieler Prokaryonten und D-Aminosäuren in bakteriellen Peptidantibiotika, wie beispielsweise D-Phenylalanin in Gramicidin S.

Während die L-Aminosäuren ihren festen Platz im Bereich der Spezialitätenchemie einnehmen, ist die Erfordernis zur Produktion von enantiomerenreinen D-Aminosäuren weit weniger offensichtlich. Allerdings gewinnen D-Aminosäuren für eine ganze Reihe an Anwendungen im Bereich der pharmazeutischen-, Agro- und Lebensmittelindustrie immer mehr an Bedeutung.

Durch die Entwicklung neuer, pharmazeutisch aktiver Peptidmimetika, ist der Bedarf an proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren in der D-Konfiguration deutlich angestiegen. Die Substitution von L- durch D-Aminosäuren verleiht vor allem oral applizierten Medikamentbestandteilen höhere Stabilität gegenüber Abbaureaktionen im Verdauungstrakt und Blutstrom. Außerdem können durch den gezielten Aminosäureaustausch konformationelle Veränderungen herbeigeführt werden, die zu verbesserten Wirkstoffeigenschaften führen können. In Abbildung 8 sind als Beispiele eine Reihe von Decapeptiden gezeigt, die als Antagonisten des LHRH (luteinizing hormone releasing hormone)

fungieren. Beim Wirkstoff Cetrotirelix (Cetrotide®, Asta Medica) liegen beispielsweise fünf Aminosäuren in der D-Konfiguration vor (Kutscher et al., 1997).

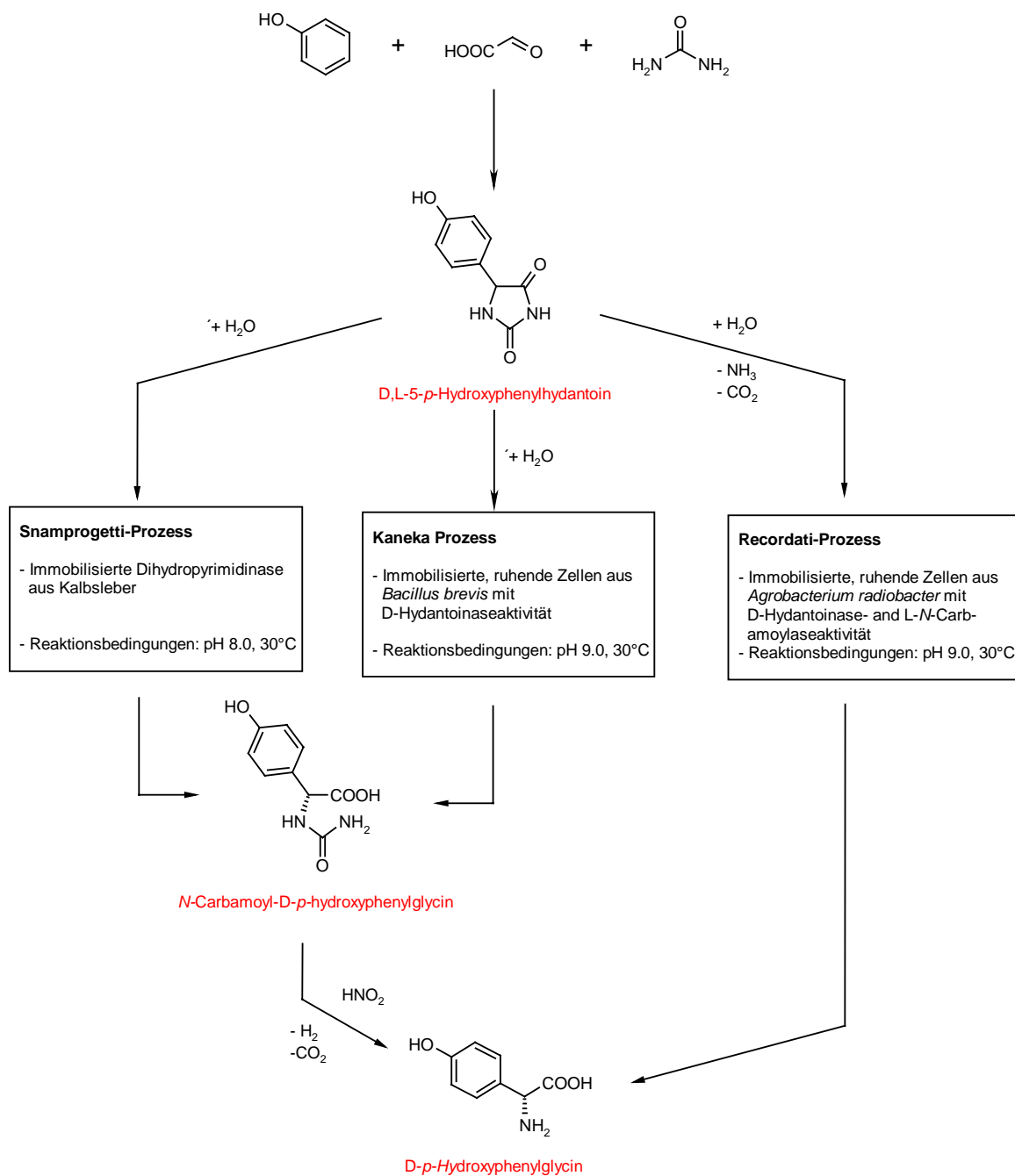
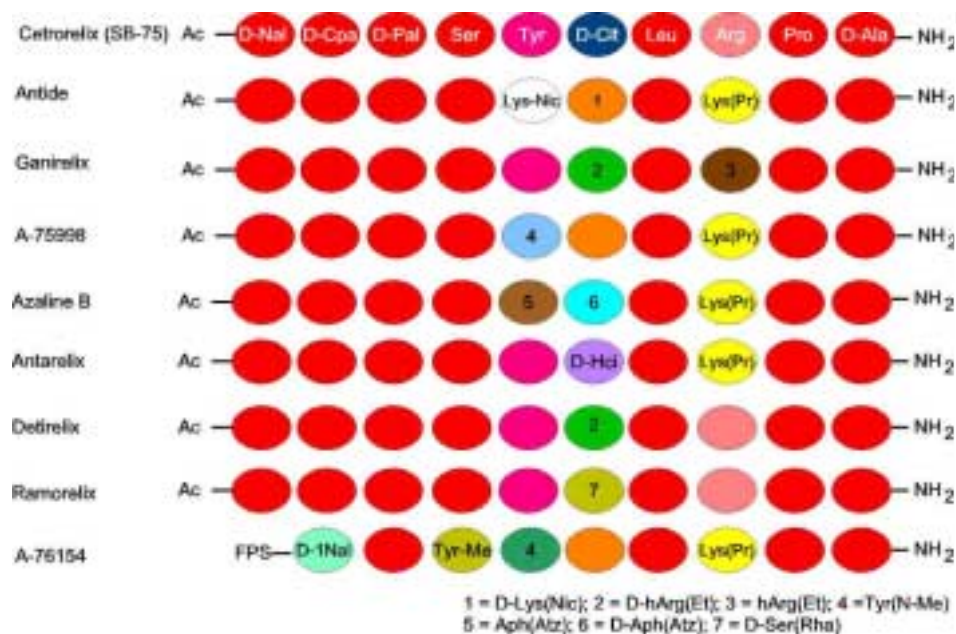


Abbildung 7: Unterschiedliche Verfahrensweisen zur industrielle Produktion von D-Aminosäuren: Snamprogetti-, Kaneka- und Recordati-Prozess (Drauz, 1991)

Dieser Wirkstoff wird bereits zur kontrollierten Ovulationsinduktion eingesetzt und gilt neben dem Einsatz in der männlichen Empfängnisverhütung auch als Hoffnungsträger im Kampf gegen Prostata- und Ovarienkarzinome.

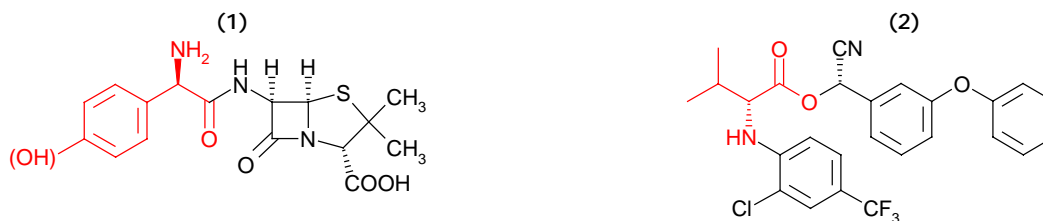
Auch in vielen weiteren Pharmazeutika werden D-Aminosäuren als sogenannte „building blocks“ genutzt. So wird beispielsweise D-Homophenylalanin als Ausgangsmaterial für eine wichtige Klasse von ACE(Acetylcholinesterase)-Inhibitoren eingesetzt (z.B. Enalapril, Linsinopril oder Benazepril) und D-Phenylalanin als Antikoagulans in der Thrombose-Therapie.

Seit der Entdeckung von L-Aspartyl-Phenylalanin-Methylester (Aspartam®) als nichtnutrigen Süßstoff, wurden auch andere Strukturanaloga mit D-Alanin und  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure als Ersatz für das L-Phenylalanin erfolgreich getestet (Tsang et al., 1984).



**Abbildung 8:** Verschiedene LHRH-Antagonisten; folgende Abkürzungen stehen für verschiedene unnatürliche Aminosäuren. D-Nal: D-Naldixinsäure, D-Cpa: D-*para*-Cl-Phenylalanin, D-Pal: D-Pyridylalanin, D-Cit: D-Citrullin (Kutscher et al., 1997)

Ein weiteres, sehr wichtiges Marktsegment besteht in der Herstellung von Penicillin- und Cephalosporin-Antibiotika. So werden D-Phenylglycin und D-*para*-Hydroxy-Phenylglycin für die Seitenketten semisynthetischer Antibiotika wie Ampicillin (Amoxicillin) und Cefadroxil benötigt. Der weltweite Bedarf an diesen abiotischen Aminosäuren übersteigt 1000 Tonnen im Jahr und zählt somit zu den wichtigsten, durch Biotransformation hergestellten Produkten.



**Abbildung 9: Strukturformel von Ampicillin (links) bzw. Amoxicillin und Fluvalinat (rechts); das Strukturelement der D-Aminosäure ist rot gekennzeichnet.**

Auch als „building block“ in Insektiziden, findet beispielsweise D-Valin in dem Pyrethroid Fluvalinat (siehe Abbildung 9) Verwendung. An diesem Molekül läßt sich auch eine weitere Anwendungsmöglichkeit veranschaulichen. Bei der Synthese einer Vorstufe dieses Insektizides ((R)-m-Phenoxybenzaldehydecyanohydrin) wird Cyclo-[D-Phe-D-His] als chirales Induktormolekül eingesetzt. In der Lebensmittelindustrie wird D-Alanin für die Herstellung von neuartigen, nichtnutrigen Süßstoffmitteln, wie Alitam® (L-Aspartyl-D-Alanyl-Amidotetramethylthietan) eingesetzt.

## 5 Zielsetzungen der Arbeit

Den Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die Isolierung des Strukturgenes der D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 und dessen rekombinante Expression in *Escherichia coli* bilden. Dies ist unter anderem deshalb wichtig, weil die Umsetzung von racemischen Hydantoinderivaten mit ruhenden Zellen zwar enantioselektiv, aber nur mit sehr geringen Raum-Zeit-Ausbeuten möglich ist.

Bei D-Carbamoylasen handelt es sich im allgemeinen um sehr instabile und oxidationsempfindliche Enzyme, die zudem im Wildstamm in sehr geringen Konzentrationen vorliegt. Deshalb sollte zur Klonierung des Strukturgenes nicht die D-Carbamoylase selbst aufgereinigt werden, sondern eine Operonhypothese formuliert werden. Diese postuliert die Existenz eines Genclusters, der die am Hydantoinabbau beteiligten in unmittelbarer Nachbarschaft zusammenfaßt. Dadurch wäre es auch möglich das D-Carbamoylasegen über die Klonierung der D-Hydantoinase zu erhalten. Bei D-Hydantoinasen handelt es sich in der Regel um wesentlich stabilere Enzyme und der N-Terminus der Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 konnte bereits von Marin (1997) sequenziert werden. Aufgrund der vorhandenen Proteininformation sollten Sonden abgeleitet werden, die zur Klonierung der D-Hydantoinase und anschließend zu der des gesamten, vermeintlichen Genclusters führen müssten.

Zur Enzymaufreinigung sollte zuerst eine ausreichende Menge aktiver Biofeuchtmasse durch Kultivierung auf halbsynthetischen Medium durchgeführt und der induktive Effekt von Hydantoin untersucht werden.

Nach dem Erhalt der DNA-Sequenz der D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 sollte die heterologe Expression des Enzym vorzugsweise in *Escherichia coli* untersucht und optimiert werden. Nach der aktiven Expression, sollte die D-Carbamoylase bezüglich Substratspezifität, Enantioselektivität und einer eventuellen Cofaktorabhängigkeit zu charakterisiert werden. Zusätzlich sollte ein Beweis für den seit langem postulierten Amidase-ähnlichen Reaktionsmechanismus der D-Carbamoylase erbracht werden.

Weiterhin sollte die genetische Organisation des postulierten Genclusters der Enzyme untersucht werden, die am Hydantoinabbau beteiligt sein könnten.

Dadurch wären die Grundlagen für eine spätere kostengünstige Herstellung sowie eine einfache Reinigung des Enzyms geschaffen, um dieses für die Herstellung von enantiomerenreinen D-Aminosäuren im Hydantoinase-Prozess einzusetzen. Solche nichtproteinogene D- $\alpha$ -Aminosäuren werden zum Beispiel als essentieller Bestandteil von zahlreichen Medikamenten und Wirkstoffen eingesetzt.



## II Material & Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Chemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Fluka Chemie (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel-deHaen/Sigma-Chemie (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe), Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) und Serva Feinbiochemikalien (Heidelberg) bezogen.

Fa. Roth (Karlsruhe):	Tris-HCl, Albumin Fraktion V
Fa. Bio-Rad (München):	Bromphenolblau, Bradford-Reagenz, 10x Tris/Glycerin/SDS-Puffer, TEMED, 30 % Acrylamid
Fa. Degussa-Hüls (Hanau):	L-allo-Threoninhydantoin, D,L-Serinhydantoin, D,L-Carbamoyl-tert-Leucin, D,L-Carbamoyl-Naphtylalanin
Fa. Merck (Darmstadt):	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, β-Mercaptoethanol, Coomassie Brillantblue G250
Fa. Sigma (Steinheim):	Ethylenglykolmonomethylether, APS
Fa. Aventis (Strasbourg):	Rhamnose
Fa. GibcoBRL (Karlsruhe):	Hefe-Extrakt
Boehringer Mannheim (Mannheim):	Blocking Reagenz, Agarose MP
Difco Laboratories GmbH (Augsburg):	Europäischer Agar
Schleicher & Schuell (Dassel):	Whatman-Papier (GB002), Sterilfilter
Amersham Life Sciences (Freiburg):	Sephadex G-50, [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dATP
Biomol Feinchemikalien (Hamburg):	CsCl
Tetanal Photowerk (Norderstedt):	Fotochemikalien
Cronex 4, DuPont (Baden-Baden):	Röntgenfilm

#### 1.2 Enzyme

Die in den Versuchen verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie die T4-Ligase, die *Taq*- und *Pwo*-Polymerase werden mit folgenden Ausnahmen von der Firma Boehringer Mannheim bezogen:

Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (Schwalbach): *Bsp*HI, *Nru*I, *Xho*I und *Sac*II

Restriktionsendonukleasen der Firma MBI Fermentas: *Mun*I

### 1.3 Antibiotika und Medienzusätze

Die Antibiotika und Medienzusätze werden nach dem Lösen mittels eines 0,2 µm FP30/0,2 CA-S-Filters der Firma Schleicher und Schnell (Dassel) sterilfiltriert und aliquotiert bei – 20 °C gelagert.

	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml	100 µg/ml
X-Gal	80 mg/ml in DMSO	80 µg/ml
IPTG	50 mg/ml (in 50 % EtOH)	50 µg/ml
Rhamnose	200 mg/ml (20 %-ig)	2 mg/ml (0,2 %-ig)
Agarose		15 g/l

### 1.4 Medien

<u>TSS-Lösung</u> (Chung et al., 1989)	LB <sub>0</sub> (pH 7,0)	90 ml
	PEG 6000	10 g
	DMSO	5 ml
	2 M MgCl <sub>2</sub>	2,5 ml
<u>LB<sub>0</sub> pH 7,5</u> (Luria et al., 1960)	Bacto-Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
		ad 1 l (VE-H <sub>2</sub> O)
<u>Natriumlactat-Medium pH 7,2</u> (Brans, 1991)	Zitronensäure	1,5 g
	Hefeextrakt	2,0 g
	FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,02 g
	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g
		ad 1500 ml (VE-H <sub>2</sub> O)
	CaSO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,44 g
	MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0,11 g
	ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,01
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12,0 g
	D,L-Methionin	0,1 g
	Hydantoin	2,0 g
	ad 1874 ml (VE-H <sub>2</sub> O)	

	50 %-iges D,L-Lactat	80 ml
	1 M K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	46 ml
<u>2x YT pH 7,0</u>	Bacto-Trypton	16 g
(Sambrook et al., 1987)	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	Agar	15 g

## 1.5 Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten und im folgenden beschriebenen Stämme wurden von der DSMZ in Braunschweig bezogen:

- *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 (ATCC 15481)

*Arthrobacter* ist ein coryneformes Bodenbakterium (Schlegel, 1999) mit hohem GC-Gehalt (Skyring, 1970), das sich durch einen sogenannten Polymorphismus auszeichnet. In der exponentiellen Wachstumsphase formt *Arthrobacter* stäbchenförmige Zellen, während sich der Organismus in der stationären Phase durch eine vorwiegend kokkoide Morphologie auszeichnet (Ensign et al., 1964). Der Name *crystallopoietes* leitet sich von einem blauen Pigment ab, dessen Biosynthese sich von 2-Hydroxypyridin ableitet (Ensign etl al., 1963 ).

Bezüglich seiner Zellwandzusammensetzung (Schleifer et al., 1972), der Verwandtschaft zu anderen *Arthrobacter* Spezies (Stackebrandt et al., 1979), der 16S-RNA-Klassifizierung (Koch et al., 1994) und weiterer biochemischer Eigenschaften ist *Arthrobacter* ausführlich beschrieben worden.

Für die Kultivierung von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 wurde auf die Arbeiten von Brans et al. (1991) zurückgegriffen, in denen eine Mediumsoptimierung und Induktionsstudien für den verwandten Stamm *Arthrobacter crystallopoietes* AM2 durchgeführt wurden.

- *Escherichia coli*

*Escherichia coli* JM109 besitzt eine Rekombinations-Defizienz und kann als Empfängerorganismus Plasmide aufnehmen. Im Gegensatz zu anderen Bakterien muß *Escherichia coli* zur DNA-Aufnahme vorbereitet werden, da er kein natürliches Aufnahmesystem besitzt. Dies erfolgt durch eine Behandlung mit PEG (siehe II-2.2.5).

*Escherichia coli* JM 109: *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB)* (Sambrook et al., 1987)

## 1.6 Plasmide

Mit Ausnahme der TOPO-Serie, die eine Kanamycin-Resistenz integriert hat, besitzen alle anderen Plasmide eine  $\beta$ -Lactamase für die Ampicillin-Resistenz.

**Tabelle 2: Verwendete Plasmide**

Bezeichnung	Eigenschaften	beteiligte Primer
OpMW1	pJOE4036 + DC (ttg-Start) mit His-tag	K_DCn2/c2
pMW2	pJOE4036 + DC (ttg-Start) ohne His-tag	K_DCn2/c3
pMW3	pJOE4036 + DC (atg-Start) mit His-tag	K_DCn1/c2
pMW10	pJOE3078 + DHP mit Strep-tag	K_DHPn2/c5
pMW11	pJOE3078 + DHP ohne Strep-tag	K_DHPn2/c2
pJOE4036	Rhamnoseexpressionsvektor	
pJOE3078	Rhamnoseexpressionsvektor	
pJW1	pCRTOPOBluntII mit Hydantoinasefragment aus PCR mit degenerierten Primern	51.61a/73.31b
pJW2	pCRTOPOBluntII mit Amplikon aus IPCR 1	IPCR1+/-
pRW	pCRTOPOBluntII mit Amplikon aus IPCR 2	IPCR5+/5-
pCF1	pCRTOPOBluntII mit Amplikon aus IPCR 3	IPCR1+/-
PCF2	pCRTOPOBluntII mit Amplikon aus IPCR 4	IPCR1+/-
pCR TOPO BluntII <sup>®</sup>	kommerziell von Invitrogen bezogen	

## 1.7 Primer

Bei den folgenden Sequenzen sind die Restriktionsschnittstellen unterstrichen, *Stop-* oder *Startcodons* kursiv, Shine-Dalgarno punktiert und **Affinitäts-tags** fett dargestellt.

**Tabelle 3: Primer für IPCR**

Bezeichnung	Sequenz	T <sub>m</sub> , °C
IPCR1+	5' <u>-GAT GTT CAC GCA CCT TCT TTC ACT TC</u> -3'	63,2
IPCR1-	5'-GGT GTT GTA GCC CAG GAC GAC GAG C -3'	69,5
IPCR5+	5'-GAG GGC GAT GAA GTC GTC GTT GTG AA -3'	66,4
IPCR5-	5'-GTT CTG GTA TGC CCC TGC CTG AAG T -3'	66,3
IPCR7+	5'-ATC GTG GTC GAC CCC AAC GGA AC-3'	66,0
IPCR7-	5'-GCA TCG GAG CCC GGT GCA ATT GTT-3'	66,1
IPCR11+	5'-ATG CGG TCG CAA CCA CAA CCC A-3'	64,0
IPCR11-	5'-AGC GCC AGG GCC GGA AGA AGC A-3'	67,7

Tabelle 4: Primer für die degenerierte PCR

Bezeichnung	Sequenz	T <sub>m</sub> , °C
61.61a	5'-GT(GCT) ATG TA(CT) GA(AG) AC(AGC) GG-3'	45,5
73.31b	5'-GT(AG) TA(AG) TCC AT(AG) TT(CT) TC-3'	50,7

Tabelle 5: Primer zur Sequenzierung von DNA in Rhamnoseexpressionsvektoren

Bezeichnung	Sequenz	T <sub>m</sub> , °C
S1995 (n-term)	5'-GGC CCA TTT TCC TGT CAG T-3'	56,7
S998 (c-term)	5'-AGG CTG AAA ATC TTC TCT-3'	49,1

Tabelle 6: Primer für die Klonierung von Strukturgenen

Bezeichnung	Sequenz	T <sub>m</sub> , °C
K_DCn1	5'-AAC ATA TGC TCG CGG TCG CTC AAG TC-3'	60,1
K_DCn2	5'-AAC ATA TGG CGA AAA ACT TGA TGC TC-3'	66,4
K_DCc2	5'-AAG GAT CC GTC ATT CAC GTT GAA CGG-3'	60,0
K_DCc3	5'-AAG GAT CCT TAG TCA TTC ACG TTG AAC GG-3'	65,3
K_LCn1	5'-AAC ATA TGG AAA CAA TTG ACG GCA TTT C-3'	60,7
K_LCc1	5'-AAG GAT CCG GGC CGT GAC TCG TCG AC-3'	71,1
K_DHP n2	5'-AAAA GGATCC GA AGGAGA TATACA ATG GAZGCGAAACTCCTTGTT-3'	71,2
K_DHPc2	5'-AAAA AAGCTT CTA CCGCTTGATGAATTCGCCGC-3'	68,2
K_DHPc5	5'-AA AAGCTT TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG G CT CCA AGC GCT CCGCTTGATGAATTCGCCGC-3'	> 75

## 1.8 Puffer & Lösungen

### HPLC-Laufmittel

Methanol	250 ml
85 %-ige H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	7,9 ml
H <sub>2</sub> O <sub>nanapur</sub>	2,25 l
Filtration (0,45 µm Gelman Science); Heliumentgasung	

### Denaturierungslösung

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M

<u>Hybridisierlösung</u>	Blocking Reagenz	5 g
	20x SSC	25 ml
	VE-H <sub>2</sub> O	24 ml
	Na- <i>N</i> -Laurolyl-Sarcosinat	1 ml
	10 % SDS	0,2 ml
	Formamid	50 ml
	bei 65 °C für 30 min rühren	
<u>20x SSC</u>	NaCl	3 M
	Tri-Natiumcitrat	0,3 M
<u>50x TAE</u>	Tris-Base	2 M
	Essigsäure	5,7 %
	EDTA pH 8,0	0,05 mM
<u>10x SDS-PAGE Laufpuffer</u>	Tris-HCl	30,2 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	mit VE-H <sub>2</sub> O ad 1 l	
<u>TE 10.01</u>	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	0,1 mM
<u>TE 10.1</u>	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM
<u>6x DNA-Probenpuffer</u>	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Sucrose	40 %
<u>5x PAGE-SDS-Probenpuffer</u>	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	3 ml
	87 %-iges Glycerin	13,8 ml
	10 %-iges SDS	4,8 ml
	β-Mercaptoethanol	1,2 ml
	0,1 %-iges Bromphenolblau	0,6 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>nanopur</sub>	0,6 ml
<u>Ethidiumbromidlösung</u>	Ethidiumbromid	10 mg/ml
(Lösung vor Licht geschützt aufbewahrt)		

<u>Lysozymlösung</u>	Lysozym aus Hühnereiweiß (Sigma) ad 2 ml TE 10.01	200 mg
<u>Lysispuffer</u>	0,5 mM EDTA pH 8,0 0,5 mM Tris-HCl pH 8,0 Sucrose ad 20 ml mit VE-H <sub>2</sub> O	1 ml 1 ml 2 g
<u>Ehrlich`s Reagenz</u>	<i>p</i> -Dimethylaminobenzaldehyd VE-H <sub>2</sub> O 6 N HCl (Lösung vor Licht geschützt aufbewahrt)	1 g 5 ml 5 ml
<u>Ninhydrin-Reagenz</u>	Ninhydrin Hydrindantin x 2H <sub>2</sub> O Ethylenglykolmonomethylether (Lösung vor Licht geschützt aufbewahrt)	116 mg 116 mg 10 ml
<u>PAGE-Coomassie-Färbelösung</u>	Coomassie Brilliant Blue R250 Methanol : VE-H <sub>2</sub> O (1:1) Eisessig	0,25 g 90 ml 10 ml
<u>PAGE-Entfärbelösung</u>	Methanol VE-H <sub>2</sub> O Eisessig	450 ml 450 ml 100 ml
<u>Anodenpuffer 1 Western-Blot</u>	1 M Tris Methanol VE-H <sub>2</sub> O	75 ml 25 ml 150 ml
<u>Anodenpuffer 2 Western-Blot</u>	1 M Tris Methanol VE-H <sub>2</sub> O	6,25 ml 25 ml 219 ml

<u>Kathodenpuffer Western-Blot</u>	1 M Tris	6,25 ml
	Methanol	25 ml
	6-Aminocapronsäure	1,3 g
	VE-H <sub>2</sub> O	219 ml
<u>Membranfärbung Western-Blot</u>	Coomassie Blue R-250	0,125 g
	Methanol	100 ml
	VE-H <sub>2</sub> O	150 ml
	Lösung abfiltrieren	
<u>Membranentfärbung Western-Blot</u>	Essigsäure	25 ml
	Methanol	125 ml
	VE-H <sub>2</sub> O	100 ml



## **2 Methoden**

### **2.1 Mikrobiologische Methoden**

#### 2.1.1 Stammhaltung

Zu 700 µl der jeweiligen Kultur werden 300 µl sterilisiertes, 50 %-iges Glycerin zugegeben und zur gleichmäßigen Verteilung des Glycerins gevortext. Die Kultur wird in ein steriles Stammhaltungsröhrchen überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei - 70 °C gelagert.

Zum Aufwecken der Kulturen wird mit einer sterilen Impföse die gefrorene Oberfläche der Kultur angekratzt und die Zellen auf einer Agarplatte mit dem entsprechendem Antibiotikum ausplattiert oder auf Flüssigkultur angeimpft (Sambrook et al., 1989).

#### 2.1.2 Ganzzellaktivitätstest

Es werden zwei Formen des Ganzzell-Aktivitätstest durchgeführt. Zum einen der Standard Ganzzell-Aktivitätstest zum anderen ein nach A. Möller (1986) modifizierter Standard-Ganzzellaktivitätstest.

##### Standard-Aktivitätstest

Der Ganzzell-Aktivitätstest wird zur Ermittlung der Substratspezifität von *A. crystallopoietes* DSM 20117 durchgeführt. Für einen Versuchsansatz werden 20 mg des jeweiligen Substrates in einem Schüttelkolben vorgelegt und mit der Zellsuspension versetzt. Diese besteht aus 1,0 g Biofeuchtmasse von DSM 20117, die in 20 ml 20 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8, gelöst ist. Für den Kontrollansatz wird 0,2 g BFM in 4 ml Puffer gelöst. Die Ansätze werden bei 37 °C in einem Schüttelbad (180 upm) für 24 Stunden inkubiert. Die Reaktionsansätze werden während der Reaktion mit Stickstoff begast, um den oxidativen Abbau der gebildeten Aminosäure zu verhindern. Nach 0, 1, 3, 5, 7 und 24 Stunden werden jeweils 500 µl Probe entnommen, die zum Abstoppen der Reaktion für 10 Minuten bei 13000 upm abzentrifugiert werden. Die Substratabnahme, eventuelle Zwischenproduktakkumulationen und die Aminosäureproduktion wird anschließend mittels HPLC-Analytik und Ninhydrintest untersucht.

##### Modifizierter Standard-Aktivitätstest nach A. Möller (1986)

Es gelten die gleichen Bedingungen wie beim Standard-Aktivitätstest, außer, dass die Substratkonzentration auf 10 g/l und die BFM-Konzentration auf 0,1 g/l eingestellt wird.

### 2.1.3 Kultivierung von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117

Zur Kultivierung werden zweimal 20 ml Natriumlactat-Medium mit je 200 µl einer Glycerinkultur von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 angeimpft. Die Vorkulturen werden für 24 Stunden bei 30 °C und 110 upm inkubiert. Zweimal 1000 ml Hauptkultur werden 1:50 mit den Vorkulturen angeimpft und für 24 Stunden unter den Bedingungen der Vorkultur inkubiert.

Für die Ernte der Kulturen wird die Kulturflüssigkeit in einer Zentrifuge des Typs J 2-21 ME (Rotortyp: JA 10) der Firma Beckman bei 5000 upm und 4 °C für 15 Minuten abzentrifugiert.

### 2.1.4 Kultivierung und Induktion von *Escherichia coli*

Zur Kultivierung von *Escherichia coli* werden von einer Glycerinkultur Einzelausstriche angefertigt und anschließend mit Einzelkolonien in Reagenzgläsern auf 5 ml Kulturvolumen mit dem entsprechenden Selektionsmarker angeimpft. Nach einer Inkubation über Nacht im Roller bei 37 °C werden die Hauptkulturen im Verhältnis 1:100 angeimpft und auf dem Schüttler bei 37 °C und 200 upm inkubiert. Für eine Induktion wird die Inkubation bei einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,3 und 0,5 unterbrochen, und eine Endkonzentration von 2 g/l Rhamnose im Medium eingestellt. Im folgenden wird die Kultur für weitere 6 bis 8 h bei 30 °C inkubiert, um die Bildung von inclusion bodies zu reduzieren.

Bei der Induktion von T7-Promotoren mit dem Lactose-Analogon IPTG wird in gleicher Weise verfahren wie bei der Rhamnoseinduktion, wobei die Induktorkonzentration im Medium 1 mM beträgt.

### 2.1.5 Zellaufschluss

#### 2.1.5.1 Ultraschall

Um einen effektiven Aufschluss zu gewährleisten wird eine entsprechende Zellmenge in 1 ml Puffer resuspendiert, sodass eine OD<sub>600</sub> von 10 vorliegt. Die Zellen werden dann zweimal eine Minute im Ultraschall (50 % duty cycle; 40 % output control) auf Eis aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand vom Pellet abgehoben. Für weitere Analysen wird das Pellet in 1 ml Puffer resuspendiert und zusammen mit dem Überstand bei – 20 °C aufbewahrt. Für *Escherichia coli* können nach dem Aufschluss Proteinkonzentrationen von bis zu 2 g/l erreicht werden.

### 2.1.5.2 Homogenisator

Mit dem Homogenisator werden Zellsuspensionen mit einem Mindestvolumen von 8 ml und ab einer Konzentration von 10 % (w/v) aufgeschlossen. Der Aufschluß erfolgt mit dem EmulsiFlex®-C5 Hochdruckhomogenisierer (Avestin, Kanada) bei 120.000 Psi unter Eiskühlung. Für *Escherichia coli* können mit diesem Aufschlussverfahren Proteinkonzentrationen von 7 bis 10 g/l erreicht werden, wobei die Methode auch auf grampositive Bakterien wie *Arthrobacter* angewandt werden kann.

### 2.1.5.3 Rührwerkskugelmühle

Der Aufschluß in der Rührwerkskugelmühle (Dyno®-Mill Type KDL, Willy A. Bachhofen) dient der Bereitstellung grösserer Mengen an Zellaufschluß für die Proteinaufreinigung der D-Hydantoinase. Dazu werden 80 ml einer 30 %-igen Zellsuspension in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 mit 80 ml Glasperlen (Durchmesser 0,25 - 0,3 mm) für 20 min unter Salinekühlung (ca. 4 °C) bei 3200 rpm absatzweise desintegriert.

Für *Arthrobacter* konnten Proteinkonzentrationen von bis zu 16 g/l erreicht werden.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolierung genomischer DNA mittels CsCl<sub>2</sub>-Dichtegradientenzentrifugation

In zwei Ansätzen werden jeweils 0,56 g der Biofeuchtmasse von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 eingewogen und mit 8 ml des Lysispuffers und 1 ml der Lysozymlösung versetzt. Die Ansätze werden in einem Wasserbad bei 37 °C für 60 min inkubiert. Alle 15 Minuten muß das am Boden gebildete Pellet resuspendiert werden, um eine vollständige Lyse der Bakterienzellen zu gewährleisten. Anschließend wird jedem Ansatz 1 ml Natrium-*N*-Lauroyl-Sarcosinat zugegeben und erneut für 15 Minuten bei 37 °C und weitere 15 Minuten bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Dann wird 1 ml einer vorverdauten (30 min bei 37 °C) Protease zugesetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Zu 10 ml eines jedes Ansatzes werden exakt 10 g CsCl<sub>2</sub> eingewogen und mit 400 µl Ethidiumbromid versetzt. Die Ansätze werden zentrifugiert (48 h bei 13000 upm und 17 °C Sorvall Ultrazentrifuge OTD-75B, DuPont) und anschließend die DNA-Bande unter UV-Licht mit einer Kanüle abgezogen. Zur Entfernung des Ethidiumbromids sowie des CsCl<sub>2</sub> wird die DNA für 2 h in 2 l TE 10.1 in einem Dialyseschlauch in Dunkelheit inkubiert (siehe II-1.8). Bei der anschließenden Phenolextraktion wird TE 10.01 gesättigtes Phenol zu gleichen Teilen mit DNA gemischt. Nach 7-minütiger Zentrifugation der Proben bei 6000 up (Sorvall) wird die wässrige, obere Phase abgenommen und die Phenolextraktion

erneut durchgeführt. Zur vollständigen Entfernung des Ethidiumbromid, des  $\text{CsCl}_2$  sowie des Phenols wird die bei der Phenolextraktion erhaltene Phase in einen Dialyseschlauch gefüllt und für mehrere Stunden in TE 10.01 Puffer dialysiert. Hierbei muß der Puffer zwei- bis dreimal ausgetauscht werden.

### 2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wird mittels des QIA prep Spin Miniprep-Kit der (Firma QIAgen, Hilden) isoliert. Die Isolierung wird wie in der Anleitung beschrieben durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA von der Säule erfolgt mit 50  $\mu\text{l}$  10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,5 (EB-Puffer nach QIAgen).

### 2.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA-haltigen Lösungen

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration sowie deren Reinheitsgrad, wird das Absorptionsspektrum von 220 bis 320 nm aufgenommen. Für die Qualität der DNA wird die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen. Reine DNA zeigt ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm und der Quotient aus  $E_{260}/E_{280}$  liegt ungefähr bei 1,8. Verunreinigungen der DNA mit Phenol erzeugen ein zweites Maximum bei ca. 270 nm. Bei der Bestimmung der DNA-Konzentration wird davon ausgegangen, dass ein  $E_{260} = 1$  einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}$  DNA/ml entspricht.

### 2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen

Mit einer Übernachtskultur werden 70 ml LB Medium 1:100 angeimpft und bei einer dem Mikroorganismus entsprechenden Temperatur auf dem Schüttler bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von 0,3 bis 0,4 inkubiert. Jeweils 30 ml werden in einem JA18-Zentrifugenbecher gefüllt und bei 4 °C 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 2 ml TSS-Puffer resuspendiert. Von den kompetenten Zellen werde 200  $\mu\text{l}$  Aliquots in Eppendorf Cups gefüllt und bis zur Transformation auf Eis gelagert.

### 2.2.5 TSS-Transformation

Für die Transformation werden 100 bis 300 ng DNA zu frischen, kompetenten Zellen pipettiert (ein Ansatz als Nullkontrolle ohne DNA, ein weiterer als Postivkontrolle z.B. mit pUC18) und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt eine Inkubation für 90 Sekunden bei 42 °C und anschließend sofortiges Kühlen auf Eis. Nach der Vorgabe von 2 ml LB in einem Zentrifugenröhrchen wird der jeweilige Ansatz dazugegeben und 1 Stunde bei 37 °C gerollert. Auf Selektionsplatten werden 100  $\mu\text{l}$  Transformationsansatz ausplattiert und über Nacht inkubiert.

Die Transformationsrate wird über die Anzahl der Transformanten pro ng DNA (pUC18) bestimmt.

## 2.2.6 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Die Agarosegelelektrophorese wird zur Reinheitsprüfung, Trennung, Identifizierung, Längenbestimmung von Nukleinsäuren und zur Reinigung von Restriktions- oder PCR-Fragmenten eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit werden je nach der Größe des zu trennenden Fragmentes 0,8 bis 3 %-ige Gele eingesetzt. Die eingewogene Menge Agarose wird im entsprechenden Volumen 1x TAE gelöst, in der Mikrowelle gelöst und in den Gelträger gegossen. Die DNA-Proben werden vor dem Lauf mit 6x Auftragspuffer versetzt und in die Probenaschen pipettiert. Nachdem das Gel mit 1x TAE überschichtet wurde, wird eine Spannung bis zu einer Feldstärke von 5 V/cm angelegt. Wenn das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau ungefähr zwei Drittel der Gellänge durchlaufen hat, wird das Gel in ein Ethdiumbromidbad (0,7 µg/ml) transferiert, 20 min inkubiert und anschließend auf einem UV-Transilluminator analysiert. Zur Dokumentation wird das Gel mit einer Kamera photographiert. Als Längenstandard dient der Molekulargewichtsmarker MWM II (2310, 9416, 6557, 4361, 2332, 2027, 564 bp) oder MWM VII (8576, 7427, 5105, 4999, 3539, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 992, 710, 492, 359 bp) (beide Roche Diagnostics, Mannheim).

## 2.2.7 Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Die Elution von DNA aus einem Agarosegel wird mit Hilfe des QIA quick gel extraction Kit (Firma Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die DNA wird wie in der Anleitung beschrieben isoliert und abschließend mit 50 µl 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8 (EB-Puffer) von der Säule eluiert.

## 2.2.8 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

### 2.2.8.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsverdau von Plasmid-DNA werden bei der Herstellung von Sonden für den Southern Blot, zur Isolierung eines DNA-Fragments aus einem Plasmid oder als Kontrollverdau durchgeführt. Wenn vom Hersteller nicht anders beschrieben, werden die Restriktionsverdau bei 37 °C 45 min inkubiert. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für einen Plasmidverdau ist in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: Standardansatz für einen Restriktionsverdau von Plasmid-DNA**

Plasmid DNA (~ 0,2 µg/ml)	4 bis 8 µl
VE-H <sub>2</sub> O	4 bis 0 µl
10x Puffer des jeweiligen Restriktionsenzym	1 µl
Restriktionsenzym (10 bis 50 U/µl)	1 µl

### 2.2.8.2 Ligation

Bei der Ligation von Inserts in Vektoren werden die Geleluate der beiden Komponenten in äquimolaren Verhältnissen oder 3:1 (Insert:Vektor) eingesetzt. Daher variiert die einzusetzende Menge an den einzelnen Komponenten abhängig von der vorliegenden Insert- bzw. Vektorkonzentration. Der Ansatz wird bei 15 °C für 12 h inkubiert:

**Tabelle 8: Ligation von Inserts in Vektoren**

Vektor	8 µl
Insert	8 µl
10x T4 Ligase-Puffer	2 µl
T4 Ligase (1 U/µl)	2 µl

### 2.2.8.3 Selbstligation

Die Selbstligation von DNA-Fragmenten dient der Rezirkularisierung von DNA-Fragmenten eines genomischen Restriktionsverdaues. Die entstandenen Plasmide werden dann als Matrize für die inverse PCR verwendet. Zur Selbstligation werden zwei Ansätze verwendet: Ansatz A wird bei Raumtemperatur innerhalb von 2 h durchgeführt, Ansatz B bei 15 °C über Nacht.

**Tabelle 9: Ligationsansatz für die Herstellung eines IPCR-Templats**

Komponente	Ansatz A	Ansatz B
Genomischer Verdau (ca. 50 µg/ml)	10 µl	6 µl
H <sub>2</sub> O <sub>nanopur</sub>	430 µl	2 µl
10x T4-Ligase-Puffer	50 µl	1 µl
T4 Ligase (1 U/µl)	10 µl	1 µl
Inkubation	2 h bei RT	16 h bei 15 °C

### 2.2.9 DNA-Markierung mit $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP

Die radioaktive Markierung von DNA mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP erfolgt mit dem Nick-Translation-Kit (Firma Roche Diagnostics, Mannheim) und wird für die radioaktive Markierung von DNA-Sonden und Molekulargewichtsmarkern durchgeführt. Der folgende Ansatz wird für die Markierung eingesetzt.

**Tabelle 10: Ansätze für die radioaktive Markierung mittels Nick Translation Kit**

Komponente	Menge
Sonde bzw. Marker	ca. 250 ng DNA
dG/C/TTP	je 1 µl
10x Puffer	2 µl
<sup>32</sup> P-α-ATP	4 µl
VE-H <sub>2</sub> O	ad 18 µl
Enzymmix <sup>2</sup>	2 µl

Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT werden die Proben mit 2 µl 0,2 M EDTA-Lösung pH 8 abgestoppt. Die durch die Reaktion erhaltene radioaktiv markierte DNA wird über G 250 Sephadex Säulen von den noch freien Nukleotiden befreit. Die Ansätze werden zunächst mit 500 µl VE-H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit 700 µl VE-H<sub>2</sub>O von der Sephadex Säule eluiert. Dabei wird die Radioaktivität der Waschschritte und des Eluates mit einem Bench-counter kontrolliert.

### 2.2.10 Southern Blot

Zur Übertragung einzelsträngiger DNA aus einem Agarosegel auf eine Membran wird das Gel zunächst in 0,25 M HCl depuriniert (zweimal 15 min). Dann erfolgt nach kurzem Spülen mit Wasser die Denaturierung in 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH- Lösung (zweimal 15 min). Anschließend wird die DNA über ein Vacuumblotting-Verfahren (Vacu-Blot Mini<sup>®</sup> der Firma Biometra) auf eine Nylonmembran transferiert. Vor dem Transfer wird die Nylonmembran 5 min in VE-H<sub>2</sub>O und weitere 5 min in einer 1,5 M NaCl/0,5 M NaOH-Lösung inkubiert. Der Blot ist aus einem durchlässigen, porösen Träger, Whatmanpapier und einer Nylonmembran aufgebaut. Das Whatmanpapier wird mit einer undurchlässigen Gummimaske abgedeckt, auf die das Gel aufgelegt wird. Für den Transfer der DNA aus dem Gel auf die Membran wird die Apparatur an eine Vakuumpumpe angeschlossen und das Gel mit einer Transferlösung (2x SSC-Lösung) überschichtet. Die Dauer des Blots beträgt ca. 20 min. Nach Beendigung des Transfers wird die Nylonmembran nochmals kurz in 2x SSC-Lösung gewaschen und getrocknet. Die Fixierung der DNA auf der Membran erfolgt durch UV-crosslinking mit dem UV-Stratalinker 1800 der Firma Stratagen (siehe II-1.8).

---

<sup>2</sup> enthält DNase I und Klenow-Polymerase I

### 2.2.11 Hybridisierung

Für die Hybridisierung der Sonde mit der auf der Nylonmembran haftenden DNA wird die Membran zunächst für 60 min bei 42 °C in 20 ml Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Anschließend erfolgt die Hybridisierung der Sonde und der Molekulargewichtsmarker mit der auf der Membran befindlichen ssDNA. Die Nylonmembran wird mit 5 ml der Hybridisierungslösung sowie mit je 50 µl frisch radioaktiv markierter MWM (entspricht 300 cpm) und einer entsprechenden Menge Sonde, die von der Effektivität der radioaktiven Markierung abhängig ist, über Nacht bei 42 °C inkubiert. Nach der Hybridisierungsphase wird die Membran von den nicht hybridisierten DNA-Fragmenten befreit. Die Membran wird dann bei RT kurz in 300 ml einer 2x SSC/0,1 % SDS-Lösung und anschließend 5 min in 50 ml der selben Lösung gewaschen. Die Nylonmembran wird vor dem Waschen sowie nach den einzelnen Waschschrritten mit einem Geiger-Müller-Zähler gemessen, so dass Rückschlüsse auf die auf der Membran verbleibende Radioaktivität gemacht werden können. Um eine Auswertung der Membran vornehmen zu können sollten mindestens 100 cpm auf der Membran mit dem Geiger-Müller-Zähler nachzuweisen sein.

### 2.2.12 Detektion der radioaktiv markierten DNA mittels Röntgenfilm und Phosphoscreen

Für die Detektion der radioaktiven DNA über einen Röntgenfilm wird die Membran anschließend bei - 70 °C in einer Kassette mit einem Röntgenfilm exponiert. Die Expositionsdauer beträgt je nach Effektivität der radioaktiven Markierung 48 bis 96 Stunden. Ein alternatives Verfahren zur Detektion über einen Röntgenfilm ist der Nachweis der radioaktiv markierten DNA über einen Phosphoscreen. Dies geschieht mit Hilfe des Phosphoimagers der Firma Molecular Dynamics (Krefeld). Aufgrund der wesentlich höheren Sensitivität kann die Expositionsdauer gegenüber dem Röntgenfilm wesentlich verkürzt werden.

### 2.2.13 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen werden durch die Firmen Biolux (Stuttgart), MWG Biotech (München) oder am IIG (Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart) durchgeführt.



### 2.2.14 Standard-PCR

Die PCR wird genutzt, um ausgehend von DNA-Matrizen, sogenannten Templates, die gewünschten DNA-Sequenzen zu amplifizieren (Mullis et al., 1986). Bei Plasmid-DNA wird maximal 1 ng, bei genomischer DNA werden maximal 50 ng DNA als Template eingesetzt. Die übrigen Komponenten werden wie in Tabelle 11 dargestellt zugegeben. Als Enzym kommen die *Taq*- und die *Pwo*-DNAP zum Einsatz, die Amplikons mit Adenin-Überhängen bzw. mit glatten Enden (sog. „blunt ends“) erzeugen. Die *Pwo*-DNAP hat dabei die höhere Genauigkeit (proof reading activity) und synthetisiert nach einer Elongationszeit von 1 min ein PCR-Fragment mit ca. 1,5 kb Länge.

Die Annealing-Temperatur wird ca. 3 °C unter der berechneten Schmelztemperatur der Primer angesetzt; unterscheiden sich die Schmelztemperaturen der beiden Primer, dann wird dabei die niedrigere berücksichtigt. Deshalb wird darauf geachtet, dass die Schmelztemperaturen der beiden Oligos ausgeglichen sind. Die Berechnung der Schmelztemperatur der Oligos erfolgt nach der „2+4“-Regel (4 °C für G und C; 2 °C für A und T), wobei Überhänge, die während des ersten Primingzyklus nicht paaren können, unberücksichtigt bleiben. Alternativ wird zur Berechnung ein über das Internet zugängliches Programm verwendet (<http://134.174.243.149/core/oligocalc.html>). Zur Optimierung von PCR-Reaktionen kann DMSO in Konzentrationen von 0 bis 10 % eingesetzt oder die Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von 0,5 bis 10 mM variiert werden (Newton et al., 1994). Als Negativkontrollen werden zwei Ansätze mit jeweils nur einem Primer durchgeführt.

**Tabelle 11: Zusammensetzung der Standard-PCR**

Komponente	Menge
10 mM dNTP-Mix	1 µl
10x DNAP-Puffer	5 µl
Primer A und B (100 pmol/µl)	je 1 µl (= 1 - 50 ng)
Matrize	1 µl
DMSO	0 - 10 %
DNAP	1 U
ad 50 µl mit VE-H <sub>2</sub> O	

**Tabelle 12: Temperaturprofil für eine Standard-PCR**

Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur
1	2 min	94 °C
30	15 s	94 °C
	30 s	berechnete Annealing-Temp.
	2 min	72 °C
1	12 min	72 °C
1	48 h	4 °C

### 2.2.15 IPCR

Die inverse PCR (IPCR) führt zur Amplifikation unbekannter, sogenannter „up-“ oder „downstream-“ Regionen, die ein DNA-Fragment mit bekannter Sequenz flankieren (Tiglia et al., 1988, Riley et al., 1990). Dazu wird zunächst ein Verdau genomischer DNA mit Restriktionsenzymen durchgeführt, die definierte Schnittstellen am Ende der bekannten Sequenz besitzen. Die Verdau werden in einem Agarosegel aufgetrennt und über einen Southern Blot auf einer Nylonmembran fixiert. Mit einer Sonde, die spezifisch für den bekannten Sequenzbereich ist, wird gegen den Blot hybridisiert. Verdau, deren Hybridisierungssignal eine Größe von 2 bis 2,5 kb nicht überschreitet, können für die IPCR verwendet werden. Diese Verdau werden erneut über Agarosegele aufgetrennt und anschließend DNA-Fragmente, deren Größe der des Hybridisierungssignals entsprechen, aus dem Gel eluiert. Die Fragmente werden einer Selbstligation unterzogen und können nach einer Isopropanolfällung als Matrize für die IPCR verwendet werden. Als Primer werden zwei Oligonukleotide eingesetzt, die im bekannten Sequenzbereich hybridisieren, an den jeweils entgegengesetzten Strang paaren und in gegenläufiger („inverser“) Richtung orientiert sind. Das entstandene Amplikon sollte die Größe des jeweiligen Hybridisierungssignals des Southern Blots aufweisen. Es wird anschließend eluiert und in einen TOPO-Vektor kloniert und sequenziert. Die inverse PCR wird mit einer *Pwo*-DNA-Polymerase und nach dem folgenden Temperaturprofil durchgeführt. Die übrigen Bedingungen entsprechen denen der Standard-PCR.

**Tabelle 13: Bedingungen für die inverse PCR**

Anzahl der Zyklen	Zeit	Temperatur
1	2 min	94 °C
10	15 s	94 °C
	30 s	Annealing-Temp. variabel
	2 min	72 °C
20	15 s	94 °C
	30 s	Annealing-Temp. variabel
	2 min increment 5 s	72 °C
1	7 min	72 °C

### 2.2.16 PCR-Klonierung

Die Klonierung von PCR-Amplikons wird mit dem TOPO-Klonierungskit (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad Kanada) durchgeführt. Der linearisierte TOPO-Klonierungsvektor besitzt an beiden Enden kovalent gebundene Topoisomerase I, die die Ligation der Inserts in den Vektor katalysiert. Der Kit existiert in zwei Varianten: Je nachdem ob bei der PCR eine DNAP verwendet wurde, die glatte Enden (z.B. *Pwo*) oder

A-Überhänge produziert (z.B. *Taq*), wird der Blunt- oder TA-Kit benutzt. Mit dem Blunt-System lassen sich auch PCR-Fragmente mit Überhängen ligieren, allerdings verringert sich dabei die Anzahl der positiven Transformanten. Die größte Effizienz weist die Klonierung für Inserts mit einer Länge von bis zu 2 kb auf.

Zur Klonierung wird der PCR-Reaktionsansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt und die zu klonierende Bande aus dem Gel geschnitten und eluiert. 4 µl des Eluats werden zusammen mit dem TOPO-Klonierungsvektor für 5 min bei RT inkubiert und nach Zugabe von 2 µl des Ligationsansatzes in ein Aliquot kompetenter TOP10-Zellen (Invitrogen®) 20 min auf Eis gestellt. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 s wird der Ansatz wieder auf Eis gekühlt und anschließend zusammen mit 250 µl LB-Medium bei 37 °C für 1 h horizontal geschüttelt. Die Zellsuspension wird dann auf LB<sub>Kan</sub>-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es werden ca. 6 Kolonien gepickt und von deren Übernachtskulturen Plasmidisolierungen durchgeführt. Zur Kontrolle wird ein DNA-Verdau mit *EcoRI*<sup>3</sup> oder anderen im Insert enthaltenen Restriktionsschnittstellen durchgeführt.

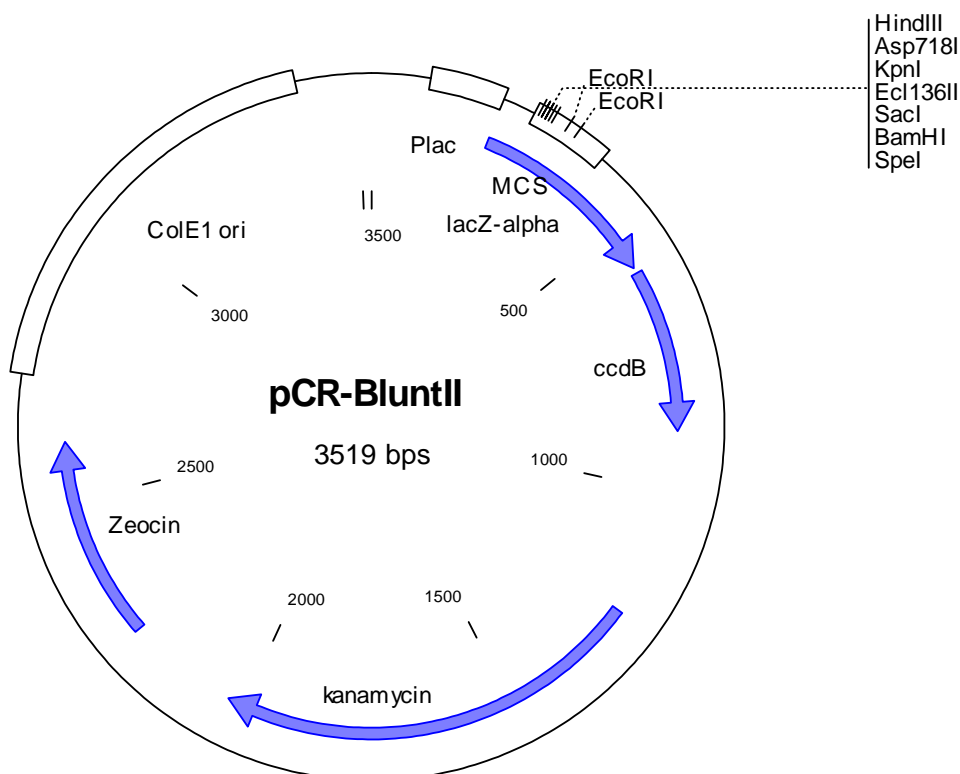


Abbildung 10: pCR TOPO Blunt II Plasmid (Invitrogen, Carlsbad, Canada) zur Klonierung von PCR-Fragmenten mit glatten Enden.

<sup>3</sup> Das klonierte Insert wird im TOPO-Vektor von zwei *EcoRI*-Schnittstellen flankiert

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung werden 50 µl der jeweiligen Probe mit 2,5 ml Bradford-Reagenz gemischt. Die Probe wird so verdünnt, dass deren Proteinkonzentration zwischen 0,3 g/l und 0,8 g/l liegt. Das käuflich erworbene Bradford-Reagenz der Firma BIO-RAD wird vor Gebrauch 1:5 mit H<sub>2</sub>O<sub>nanopur</sub> verdünnt. Die Inkubationsdauer beträgt 10 Minuten bei RT. Nach dieser Reaktionszeit wird die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgt durch Doppelbestimmung mit dem Standardprotein „Albumin Fraktion V“ im jeweiligen Puffer zwischen 0 und 1 g/l.

### 2.3.2 Enzymaktivität

#### 2.3.2.1 Hydantoinaseaktivität

A Photometrisch mittels Ehrlichs` Test

Der photometrische Nachweis von *N*-Carbamoylderivaten wird als Schnelltest zur Bestimmung der Hydantoinaseaktivität eingesetzt.

800 µl 250 mM Hydantoin werden mit Enzymlösung bzw. Zellsuspension bei 50 °C inkubiert, und die Reaktion nach 10 min mit 400 µl 12 %-iger TCA abgestoppt. Unlösliche Bestandteile werden abzentrifugiert und 500 µl Überstand mit 300 µl Ehrlichreagenz gemischt.

Anschließend erfolgt zur qualitativen Aktivitätsbestimmung eine visuelle Beurteilung der Proben. Eine gelbe Färbung deutet auf Aktivität hin, eine rosa Färbung dagegen auf inaktives Protein.

Eine quantitative Konzentrationsbestimmung des *N*-Carbamoylglycins kann bei 430 nm erfolgen (Kalibrierung von 0 bis 10 mM *N*-Carbamoyl-Glycin).

B HPLC

Als Standardsubstrat für die Bestimmung der Hydantoinaseaktivität wird Benzylhydantoin eingesetzt (2 g/l in 0,1 M KPP pH 8,0) und das Substrat für 30 min im Ultraschall gelöst. 400 µl werden bei 50 °C im Thermomixer (Eppendorf) vortemperiert und die Reaktion durch Zugabe des geklärten Rohextraktes oder einer Enzymlösung gestartet. Die Reaktion wird durch Zupipettieren von 200 µl 10-%iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> gestoppt und 10 min bei 14000 upm zentrifugiert. Der Überstand wird 1:10 in HPLC-Laufmittel verdünnt und anschließend bei 210 nm vermessen.

Als Nullkontrollen dienen Ansätze, in denen an Stelle der Enzymlösung Assaypuffer zugegeben wurde, oder das Enzym erst nach Säurezugabe hinzugefügt wurde.

Die Berechnung der spezifischen Aktivität erfolgt nach Gleichung 1. Dabei ist zu berücksichtigen, dass diese Gleichung so nur bei Ganzzellumsetzungen oder Rohextrakten aus *Arthrobacter* eingesetzt wird. Bei aufgereinigten D-Hydantoinase-Enzymlösungen und *Escherichia coli*-Rohextrakten mit rekombinanter D-Hydantoinase entfällt der Term  $c(AS)$ .

$$A_{spez} = \frac{[c_{C-AS} + c_{AS}] \cdot V_R}{t \cdot V_{EL} \cdot c_{prot}} \cdot 10^6$$

### Gleichung 1: Berechnung der Hydantoinaseaktivität

$A_{spez}$	spezifische Aktivität [U/mg]
$C_{C-AS}$	Konzentration Carbamoyl-Aminosäure [mol/l]
$C_{AS}$	Konzentration Aminosäure [mol/l]
$V_R$	Reaktionsvolumen [ml]
$V_{EL}$	Enzymvolumen [ml]
$C_{Prot}$	Proteinkonzentration [g/l]
t	Reaktionsdauer [min]

Einzelkomponenten der HPLC-Anlage

Komponente	Bezeichnung
Laufmittelentgaser	SpectraSystem SCM 400
Gradientenpumpe	SpectraSeries P 200
Autosampler	SpectraSystem AS 3000
Detektor	SpectraSeries UV 150
Dokumentation	ChromoJet Integrator

Bedingungen für Trennungen von Hydantoinderivaten und *N*-Carbamoyl-Aminosäuren

Trennsäule	RP-C18 (C18 Sil-ODS1-PE-5 µl, Crom, Herrenberg)
Säulentemperatur	40 °C
Fließmittel	10 % Methanol, 90 % [0,3 %-ige Phosphorsäure]
Flußrate	1,5 ml/min
Probenvolumen	20 µl
Wellenlänge zur Detektion	210 nm

### 2.3.2.2 Carbamoylaseaktivität

#### A Photometrisch mittels Ninhydrintest

Aminosäuren, die sich mit dem HPLC-Test nicht nachweisen lassen, werden quantitativ über den Ninhydrintest nachgewiesen.

Für die Ninhydrin-Reaktion werden 100 µl Probe in einem Eppendorf-Cup vorgelegt und mit 100 µl Natrium-Acetat pH 5,5 versetzt. Diese Reaktionsansätze werden in einem Wärmeblock bei 60 °C für 5 Minuten mit offenem Deckel geschüttelt. Nach 5 Minuten erfolgt die Zugabe des Ninhydrin-Reagenz und die Reaktion wird bei geschlossenem Deckel für weitere 20 Minuten fortgesetzt. Nach dem Ende der Reaktionszeit werden die Reaktionsansätze auf RT abgekühlt und mit 1 ml eines Isopropanol-Nanopurwasser Gemisches (1:1) verdünnt. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgt in einem Bereich von 0 bis 1,25 mM mit der jeweiligen Aminosäure.

#### B HPLC

Die Bestimmung der Carbamoylaseaktivität wird analog zum Hydantoinaseaktivitätstest durchgeführt, als Substrat wurde jedoch 2 g/l Carbamoylphenylalanin eingesetzt und bei der Berechnung der spezifischen Aktivität (siehe Gleichung 1) wird als Produkt lediglich das gebildete Tryptophan berücksichtigt. Die Assay-Temperatur wurde dem jeweiligen Temperaturoptimum der Reaktion angepasst. Das veränderte Laufmittel ist in der folgenden Tabelle beschrieben:

Bedingungen für Trennungen von *N*-Carbamoylaminosäuren und Aminosäuren

Trennsäule	RP-C18 (C18 Sil-ODS1-PE-5 µl, Crom, Herrenberg)
Säulentemperatur	RT
Fließmittel	20 % Methanol, 80 % [0,3 %-ige Phosphorsäure]
Flußrate	1,0 ml/min
Probenvolumen	20 µl
Wellenlänge zur Detektion	210 nm

### 2.3.2.3 Qualitative Assays zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus von D- und L-Carbamoylase

D,L-Carbamoyl-Phenylalanin wird als Standardsubstrat ausgewählt, weil es chemisch stabil ist, von allen eingesetzten Enzymen mit hinreichender Aktivität umgesetzt wird und durch den UV-aktiven Benzylrest mittels achiraler und chiraler HPLC-Analytik nachgewiesen werden kann. Die HPLC-Analytik entspricht in ihren Bedingungen denen des Standard-Assays für Carbamoylaseaktivität (siehe Abschnitt 2.3.2.2) und macht auf diese Weise sowohl einen hohen Probendurchsatz als auch die Isomerentrennung einiger Substrate und Produkte möglich (siehe Tabelle 14).

**Tabelle 14: Retentionszeiten der N-Carbamoyl-Phenylalaninderivate und der entsprechenden Produkte**

Abkürzung	Bezeichnung	Retentionszeit, min
<i>Substrate</i>		
Ac-Phe	<i>N</i> -Acetyl-Phenylalanin	15,2
<i>F</i> -Phe	<i>N</i> -Formyl-Phenylalanin	13,0
3- <i>N</i> -Me-CPhe	3- <i>N</i> -Methyl-Carbamoyl-Phenylalanin	15,26
C-PheM	<i>N</i> -Carbamoyl-Phenylalaninmethylester	11,7
C-PheA	<i>N</i> -Carbamoyl-Phenylalaninamid	7,6
<i>O</i> -C-PheL	<i>O</i> -Carbamoylphenylmilchsäure	18,0
BBHA	Benzylbernsteinsäurehalbamid	15,2
BBDA	Benzylbersteinsäurediamid	10,33
1- <i>N</i> -Me-CPhe	1- <i>N</i> -Methyl-Carbamoyl-Phenylalanin	11,2
$\alpha$ -Me-CPhe	$\alpha$ -Methyl- <i>N</i> -Carbamoyl-Phenylalanin	16,7
<i>Produkte</i>		
Phe	Phenylalanin	5,0
PheM	Phenylalaninmethylester	8,9
PheA	Phenylalaninamid	4,5
PheL	Phenylmilchsäure	11,1
PheS	Phenylbernsteinsäure	29,4
1- <i>N</i> -Me-Phe	<i>N</i> -Methyl-Phenylalanin	6,0
$\alpha$ -Me-Phe	$\alpha$ -Methyl-Phenylalanin	7,6

Bei den Synthesen und der Messung der Proben im sauren HPLC-Laufmittel muß der in diesem pH-Milieu thermodynamisch begünstigte Ringschluß des Carbamoylderivates zum entsprechenden Hydantoin berücksichtigt werden. Um diese chemischen Zerfallsreaktionen eindeutig von der enzymatischen Katalyse zu unterscheiden, wird mit jedem Reaktionsansatz eine Kontrolle inkubiert, die statt der Enzymlösung Puffer enthält. Diese Negativkontrolle wird bei der HPLC-Messung immer

nach dem Reaktionsansatz gemessen, so dass diese längere Zeit im sauren Laufmittel inkubiert wird als der Reaktionsansatz. Um die Substrate darüberhinaus zu stabilisieren, wurden die Substrate in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 gelöst und vor Zugabe der Enzymlösungen bei dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms vortemperiert (siehe **Tabelle 15**).

**Tabelle 15: Temperaturoptima der Carbamoylasen**

Carbamoylase	Temperaturoptimum
pMHS347	37 °C
pMW1	30 °C
pBW1	50 °C

Der Reaktionsansatz ( $V = 200 \mu\text{l}$ ) wird durch Zugabe, von  $\mu\text{l}$  100 10 %-iger Phosphorsäure abgestoppt, abzentrifugiert und der Überstand 1:10 in HPLC-Laufmittel verdünnt und unter den Standardbedingungen des Carbamoylase-Assays vermessen.

Die folgenden rekombinanten Carbamoylasen wurden getestet:

- D-Carbamoylase aus *Agrobacterium radiobacter* (JM109 pMHS347 hyuC285 MS3.2; Mutante aus *Agrobacterium sp.* IP I-671; Hils, 1998)
- D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 (JM109 pMW1)
- L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 (JM109 pBW1; Wiese, 2000)

Alle drei Enzyme liegen unter der Kontrolle eines Rhamnoseexpressionssystem als Fusionsprotein mit einem Polyhistidin-tag ( $\text{His}_6$ -tag) vor und werden mittels Metallaffinitätschromatographie bis zur Homogenität aufgereinigt, um Nebenreaktivitäten anderer Enzyme auszuschließen. Die Reinheit wird durch SDS-PAGE-Gele sichergestellt.

### 2.3.3 Proteinaufreinigung der D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117

Bei der Proteinaufreinigung werden alternativ die Anlagen Äkta und FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) (beide Pharmacia, Freiburg) verwendet. Während der Aufreinigung wird sowohl die Konduktivität als auch die Extinktion bei 280 nm verfolgt und dokumentiert.

Um eine schnelle Beurteilung der Aktivität der Fraktionen zu ermöglichen, wird zuerst ein Ehrlichs-Test durchgeführt. Anschließend wird zur genauen Bestimmung von den aktiven Fraktionen ein HPLC-Aktivitätstest mit D,L-Benzylhydantoin als Standardsubstrat durchgeführt.



### 2.3.3.1 Protaminsulfat-Fällung

Durch Zugabe von kationischen Makromolekülen, wie beispielsweise Protaminsulfat, werden Nucleinsäuren ausgefällt und somit die Viskosität des Rohextraktes verringert.

Hierzu wird vom Protaminsulfat in 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,5 eine 20 g/l Stammlösung hergestellt und der pH-Wert anschließend mit verdünnter Phosphorsäure auf pH 6,5 eingestellt.

Durch Zugabe der Stammlösung zum Rohextrakt wird eine Endkonzentration von 2 g/l Protaminsulfat eingestellt und der Ansatz für 12 h bei 4 °C gerührt. Nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile wird der Überstand für die weitere Proteinaufreinigung eingesetzt.

### 2.3.3.2 Streamline-DEAE-Chromatographie

Die Streamline DEAE-Chromatographie dient einer ersten Grobreinigung des in der Viskosität reduzierten Rohextraktes. Streamline-Medien bestehen aus modifizierten Sepharose-Matrices.

Um die Ionenkonzentration des Überstandes der Protaminsulfatfällung zu reduzieren, wird dieser 1:4 in Puffer A verdünnt. Die Probe wird dann mit einer Flußrate von 1 ml/min auf die zuvor in Puffer A äquilibrierte Säule (5 bis 10-faches Säulenvolumen) beladen. Nach dem Waschen (3-faches Säulenvolumen) erfolgt die Elution bei einer Flußrate von 4 ml/min, über ein Volumen von 300 ml mit einem Gradienten von 0 bis 100 % Puffer B. Ist die Konzentration von 100 % Puffer B erreicht, wird mit 60 ml Puffer B nachgewaschen. Die Proben werden über den Autosampler in 4 ml Fraktionen gesammelt.

Gelmaterial: Streamline DEAE, Pharmacia, Freiburg

Säule: HK 16/10; V = 20 ml (Pharmacia, Freiburg)

Puffer A: 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,0

Puffer B: 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,0 / 1 M Ammoniumsulfat

### 2.3.3.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

Bei diesem Verfahren wird die unterschiedliche Hydrophobizität an der Oberfläche der Proteine zur Trennung ausgenutzt. Dabei werden die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Gelmaterial und Proteinen durch hohe Salzkonzentrationen verstärkt. Unter diesen Hochsalzbedingungen wird die Probe gebunden, um dann durch allmähliche Verringerung der Salzkonzentration die Proteine von der Säule zu eluieren.

Die vereinigten Fraktionen der Streamline-Chromatographie werden mit Puffer C auf eine Konzentration von 1 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  eingestellt und 1 h bei 4 °C gerührt. Der Überstand (JA 18; 4 °C bei 7000 rpm) wird filtriert und bei einer Flußrate von 1 ml/min auf die zuvor in Puffer B äquilibrierte Säule (5 bis 10-faches Säulenvolumen) aufgetragen. Nach dem Spülen mit dem dreifachen

Säulenvolumen wird bei einer Flußrate von 1 ml/min über 600 ml von 0 bis 100 % Puffer B eluiert. Die Fraktionsgröße beträgt 4 ml.

Puffer A	50 mM Phosphatpuffer pH 6,5
Puffer B	1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in Puffer A
Puffer C	2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in Puffer A

#### 2.3.3.4 Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie beruht auf der kompetitiven Bindung von Proteinen und Anionen der mobilen Phase an das Gelmaterial. Durch die schrittweise Erhöhung der Anionenkonzentration im Elutionspuffer werden die Proteine von der Säule gelöst.

Gelmaterial:	MonoQ (Amersham Life Sciences, Freiburg)
Säule:	HR 16/10; V = 20 ml
Puffer A	50 mM Phosphatpuffer pH 6,5
Puffer B	1 M NaCl in Puffer A

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Anionenaustauschchromatographie kam eine HR 16/10 MonoQ-Säule mit 10 ml Säulenvolumen) zum Einsatz (Amersham Life Sciences, Freiburg).

Auf die zuvor mit Puffer A äquilibrierte Säule werden die gesammelten Fraktionen aus der HIC mit einer Flußrate von 4 ml/min aufgetragen. Nachdem die Säule mit einem dreifachen Säulenvolumen in Puffer A gespült worden ist, wird mit einem Gradienten von 0 bis 1 M NaCl über das 20-fache des Säulenvolumens eluiert. Anschließend wird mit 60 ml reinem Puffer B nachgespült. Die Fraktionsgröße der Eluate beträgt 2 ml.

#### 2.3.4 Proteinaufreinigung der rekombinanten Enzymen

##### 2.3.4.1 His-getagte Enzyme

Rohextrakte, in denen rekombinante Enzyme mit fusionierten His-tags enthalten sind, werden durch Zentrifugation von den unlöslichen Bestandteilen abgetrennt, und der Überstand anschließend auf eine zuvor mit Aufschlußpuffer (0,1 M Kaliumphosphat pH 8,0) äquilibrierte Talonsäule (Firma Clontech) aufgetragen. Die Aufreinigungsprozedur erfolgt nach den Angaben des Herstellers, wobei die Kapazität der Säule 2 – 4 mg Protein beträgt, das mit zweimal 600 µl Elutionspuffer vom Trägermaterial gelöst wird.

Die Talonsäuleneluate werden vereinigt und mittels Gelfiltration über PD-10 Säulen (Amersham Pharmacia biotech, Freiburg) von dem im Talonsäulen-Elutionspuffer enthaltenen Imidazol getrennt. Die Elution von der PD-10-Säule erfolgt nach Angaben des Herstellers mit viermal 1,0 ml 0,1 M KPP pH 8,0. Anschließend wird die spezifische Aktivität und der Proteingehalt der Fraktionen überprüft.

#### 2.3.4.2 Streptag-Enzyme

Die mit dem Strep-tagII (Aminosäuresequenz: SA-**WSHPQFEK**; der Aminosäuresequenz des Strep-tag sind die zwei Aminosäuren Serin und Alanin als „spacer“ vorangestellt; Institut für Bioanalytik [IBA] in Göttingen) ausgestattete D-Hydantoinase wurde mit dem Strep-tag Kit (Institut für Bioanalytik, Göttingen) aufgereinigt. Die Isolierung erfolgt nach der Beschreibung des Herstellers und wurde mittels SDS-PAGE verfolgt und analysiert. Nach der Elution wird das Protein mittels PD-10 Gelfiltration (Pharmacia, Freiburg) in 0,1 M KPP pH 8,0 umgepuffert.

#### 2.3.5 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgt in 10 bis 12,5 %-igen Acrylamidgelen. Die Lösungen werden wie in Tabelle 16 beschrieben eingesetzt. Die Substanzen APS und TEMED werden unmittelbar vor dem Gießen des Gels zugegeben, da diese die Induktion der Polymerisation bewirken.

**Tabelle 16: Zusammensetzung eines Acrylamidgeles für eine SDS-PAGE**

Komponente	Trenngel (10 %)	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel
30 % Acrylamid	4 ml	5 ml	0,66 ml
1,88 M Tris-HCl pH 8,8	2,4 ml	2,4 ml	-
0,625 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	0,8 ml
10 % SDS	120 µl	120 µl	40 µl
VE-H <sub>2</sub> O	5,48 ml	4,48 ml	2,5 ml
TEMED	10 µl	10 µl	4 µl
APS (10 % w/v)	60 µl	60 µl	20 µl

Nach einem Wachstumssexperiment mit IPTG oder Rhamnose als Induktor (siehe II-2.1.4) wird sowohl das Pellet als auch der Überstand des Zellaufschlusses auf das rekombinante Protein hin untersucht. Dadurch kann zum einen die Expression eines Proteins nachgewiesen werden und zum anderen durch densitometrische Messung das Verhältnis zwischen löslicher Fraktion im Überstand und Bildung unlöslichen Proteins im Pellet bestimmt werden. Die Proben für die SDS-Gelelektrophorese werden durch geeignete Verdünnung auf eine Proteinkonzentration von 1 g/l eingestellt. Anschließend

werden 12 µl jeder Probe mit 3 µl 5x konzentriertem Probenpuffer (siehe II-1.8) versetzt. Diese Lösung wird für 10 Minuten bei 100 °C gekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen.

Von dem Proteinmarker werden jeweils 10 µl aufgetragen. Dabei handelt es sich um den Proteinmarker ProSieve der Firma FMC BioProducts (Hess. Oldendorf). Dieser enthält 5, 10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 und 225 kDa große Markerproteine. Das 50 kDa Protein liegt in einer doppelten Konzentration vor, so dass dieses als intensivere Markerbande im SDS-Gel sichtbar wird.

Alternativ wurde der Molekulargewichtsmarker Mark 12 (Firma Novex, Frankfurt) verwendet: 200, 116, 97, 66, 55, 36 und 31 kDa große Standardproteine.

An das SDS-Gel wird eine Spannung von 120 Volt angelegt. Die Elektrophorese wird bei Erreichen der Lauffront am unteren Gelrand beendet (ca. 2 h). Bei 12,5 %-igen Acrylamidgelen wird die Dauer der Auftrennung um zusätzlich 30 min erhöht.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgt über Coomassie Färbung. Das SDS-Gel wird für 30 bis 40 Minuten in der Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend mehrere Stunden in der Entfärbelösung entfärbt. Anschließend wird das Gel zur Konservierung mit dem Cellophan Modell 583 Gel Dryer der Firma BIO-RAD fixiert und gescannt.

### 2.3.6 Native Gelelektrophorese

Das Polyacrylamidgel für eine native Gelelektrophorese entspricht der in Tabelle 16 gezeigten Zusammensetzung, allerdings ohne Zugabe von SDS. Die Elektrophoreseeinheit ist mit Wasser kühlbar und die eingesetzten Gele haben eine Höhe von ca. 11 cm im Trenngel. Der native Probenpuffer stellt sich aus den in Tabelle 17 aufgeführten Komponenten zusammen.

**Tabelle 17: Zusammensetzung des nativen Probenpuffers**

Komponente	Konzentration
Tris-HCl (pH 6,8)	50 mM
Bromphenolblau	0,1 %
Glycerin	10 %

### 2.3.7 Tryptischer Peptidverdau

Die Hydantoinase wird nach Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie über einen Mikrokonzentratoren (Microcon™30 von Amicon; Ausschlußgrenze 30 kDa) nach Angaben des Herstellers aufkonzentriert und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen und Coomassie gefärbt; dabei wird darauf geachtet, dass das Gel lediglich 45 min in Färbelösung inkubiert wird und in der Entfärbelösung keine Essigsäure enthalten ist, um ein Ansäuern des Proteins zu verhindern.

Die D-Hydantoinase-Bande (ca. 12 µg) wird aus dem Gel geschnitten und das Gelstück für 30 min in 0,5 ml einer Lösung von 0,2 M Ammoniumbicarbonat pH 9,0/50 % Acetonitril inkubiert. Der Puffer wird verworfen und das Gelstück in frischem Puffer für 3 h inkubiert. Danach wird das Gel 2 bis 3 min unter Stickstoffbegasung getrocknet. Zum proteolytischen Verdau werden 5 µl Trypsin (0,1 g/l) zugegeben, mit 30 µl 0,2 M Ammoniumbicarbonat pH 9,0 versetzt und 17 h bei 37 °C inkubiert.

Zur Peptidextraktion wird das Gelstück anschließend in kleine Stücke zerschnitten, die 20 min in 80 µl 60 %-igem Acetonitril/0,1 %-iger TFA geschüttelt werden. Der Überstand wird abgenommen und aufbewahrt, und die Extraktion noch einmal wiederholt. Die vereinigten Überstände werden in der Speed vac getrocknet und in 200 µl Nanopurwasser aufgenommen (John M. Walker, 1994).

### 2.3.8 Präperative HPLC zur Auftrennung eines Peptidgemisches

Um die durch tryptischen Verdau entstandenen Peptide voneinander zu trennen, wird das Peptidgemisch in 300 µl Nanopurwasser gelöst und 80 µl des Peptidgemisches über eine Probenschleife auf die HPLC-Säule aufgetragen. Die eluierten Peptide werden mit dem Detektor bei 210 nm nachgewiesen und manuell fraktioniert. Anschließend werden die Fraktionen im Speed-vac eingetrocknet und sequenziert.

Säule	Grom-Sil 120 Å; ODS-5 ST-Säule; Empfindlichkeit 256
Laufmittel A	0,060 % TFA
Laufmittel B	0,052 % TFA/80 % Acetonitril
Gradient:	0 bis 60 min: 2 bis 38 % B 60 bis 90 min: 38 bis 75 % B 90 bis 105 min: 75 bis 98 % B
Flußrate:	0,4 ml/min
Empfindlichkeit:	256
Wellenlänge λ:	210 nm
Auftragsmenge:	80 µl Protein aus tryptischen Verdau

### 2.3.9 Western-Blot

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen wird das Gel 15 min in Kathodenpuffer inkubiert. Drei Filterpapiere werden jeweils 10 min in Anodenpuffer 1 und 2 bzw. Kathodenpuffer äquibriert und eine Polyvinylidifluorid - Membran (PVDF) für einige Sekunden in reinem Methanol benetzt und anschließend 3 min in Anodenpuffer 2 äquibriert. Ein Semidry-Blot (Biometra) wird mit dem folgenden Sandwichprofil (von unten nach oben) durchgeführt: Filterpapier in Anodenpuffer 1, Filterpapier in Anodenpuffer 2, PVDF-Membran in Anodenpuffer 3, Gel und Filterpapier in Kathodenpuffer. Der Blot wird für 30 min mit 15 V an eine Spannungsquelle angeschlossen und die Membran 5 min in Coomassie-Lösung gefärbt (die Gelmatrix kann zur Transferkontrolle mitgefärbt werden). Die Membran wird in Entfärbelösung inkubiert und einige Male mit Wasser gespült und getrocknet. Die gewünschten Banden werden ausgeschnitten und können dann für eine Proteinsequenzierung verwendet werden.

### 2.3.10 N-terminale Proteinsequenzierung

Die N-terminale Proteinsequenzierung wird am Institut für Technische Biochemie, Uni Stuttgart unter Anleitung von Volker Nödinger durchgeführt und ausgewertet.

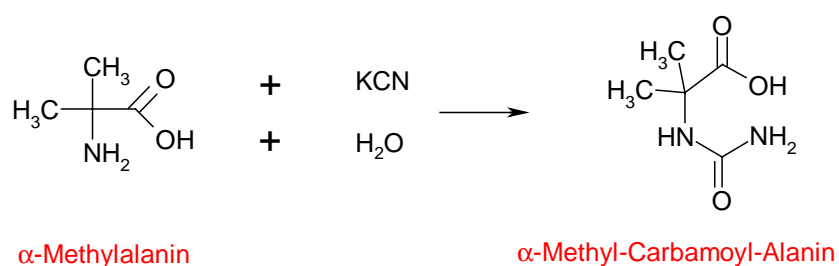
### 2.3.11 Densitometrische Auswertung von Proteingelen

Die qualitative Auswertung einzelner Proteinbanden zur Bestimmung der Proteinmenge, des prozentualen Anteils am Gesamtprotein und des Molekulargewichtes erfolgt mit dem Programm Image Master (Amersham Life Sciences, Freiburg).

## 2.4 Chemische Synthesen

Die chemische Synthese dient der Bereitstellung von D,L-N-Carbamoyl-Phenylalaninamid und D,L- $\alpha$ -Methyl-Carbamoyl-Alanin.

Dazu werden die kommerziell erhältlichen Substanzen D,L-Phenylalaninamid und D,L- $\alpha$ -Aminoisobuttersäure als Ausgangssubstanzen für die Carbamoylierung eingesetzt. Die racemischen Gemische werden unter Rühren tropfenweise mit einer äquimolaren Menge Kaliumcyanat versetzt. Die Reaktion wird durch die Detektion der Substrate und Produkte mittels HPLC-Messung verfolgt und bis zum vollständigen Abreagieren des Alaninderivates inkubiert. Beispielhaft ist die Synthese von  $\alpha$ -Methylalanin in Abbildung 11 dargestellt. Nach dem Ausfallen von Kristallen wurde das Reaktionsprodukt abgenutscht, gewaschen und als reiner, weißer Feststoff isoliert. Die Synthese der übrigen Phenylalaninderivate ist in den Arbeiten von Vielhauer (2001) und Waniek (2000) beschrieben.



**Abbildung 11:** Reaktionsschema der Carbamoylierung von  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure ( $\alpha$ -Methylalanin)

Die Charakterisierung der synthetisierten Substanzen ist in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 18:** Charakterisierung der Carbamoylphenylalanin-Derivate

C-Phe-Derivat	Elementaranalyse	Schmelzpunkt
Ac-Phe	kommerziell erhältlich	
F-Phe	kommerziell erhältlich	
1-N-Me-CPhe	(Vielhauer, 2001)	
3-N-Me-CPhe	"	
3-N-Me-BnH	"	
BBHA	(Waniek, 2000)	
BBDA	"	
O-CPL	"	
C-PheA	X	X
C-PheM	(Vielhauer, 2001)	
$\alpha$ -Me-CPhe	X	X

## 2.5 Software

Zur Erstellung der Arbeit werden folgende Software-Programme verwendet:

Officeprogramme von Microsoft: Excel 97 und Winword 97

Raswin 2.4

Micrographix Designer 7.0

GCG (Genetics Computer Group)

Pharmacia Image Master™

Enzymfit<sup>4</sup>

IsisDraw 2.1.1

VCH Biblio 3.0

Clone Manager 5.0

Treeview 1.5.2

Genedoc 2.5.0

ClustalX 1.8

Chromas 1.42

---

<sup>4</sup> entwickelt von Indlekofer und Riek, IBVT siehe Handbuch zum Programm „Enzymfit“



## 2.6 Geräte

Analysenwaage	Modell AE200 (Mettler-Toledo, Gießen)
Autoklav	Tuttnauer 2540EL (Systemec GmbH Labor-System-Technik, Wettenberg)
Benchcounter	Modell BC2000 (DuPont, Dreieich)
Elektrophoresekammern	Multigel-Long und Minigel Twin (Biometra, Göttingen)
Kühlzentrifuge	J2-21 M/E; Rotoren JA 10, 18 und 20.1 (Beckmann, UK)
pH-Meter	pH 537 (WTW, Weilheim)
Phosphoimager	Storm860 (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld)
Roller	Modell TC-7 (New Brunswick Scientific, Nürtingen); IIG
Sequenzier-Gerät	ALFexpress (PharmaciaKB, Freiburg); IIG
Schüttler	Modell TS (Infors AG, Boltmingen, Schweiz)
Spannungsquelle	Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)
Spektralphotometer	UV-120-02 (Shimadzu, Duisburg)
Thermoblock	Thermostat DB 2A (Thermo-Dux, Wertheim)
Thermocycler	Progene (Techne, Cambridge)
Thermomixer	Modell 5436 (Eppendorf, Hamburg)
Tischzentrifuge	Biofuge pico (Heraeus, Hanau)
Ultrazentrifuge	Modell OTD75B mit Festwinkelrotor T1270 (Sorval Instruments, Bad Homburg); IIG
UV-Leuchttisch	Transilluminator TI 1 (Biometra, Göttingen)
UV-Linker	Modell 1800 (Stratagene, Amstedenam Zuidoost/Holland); IIG
Vakuumblotter	Vacu Blot Mini (Biometra, Göttingen)
Vakuumbzentrifuge	Speed Vac Concentrator SVC-100H (Savant, Egelsbach); IIG
Vortex	Modell REAX2000 (Ochs, Lengern)

### III Ergebnisse

Die erste Zielsetzung der Arbeit bestand zunächst darin, ausreichende Mengen an aktiver Zellmasse von *Arthrobacter crystallopietes* DSM 20117 bereitzustellen, um daraus die D-Hydantoinase zu isolieren und anschließend für die Aminosäuresequenzierung aufzureinigen.

#### 1 Biomassegewinnung von *Arthrobacter crystallopietes* DSM 20117

Als Ausgangsmaterial für Ganzzellaktivitätstests, für die Isolierung chromosomaler DNA und zur Enzymisolierung der D-Hydantoinase sollte zunächst eine physiologisch einheitliche Zellmasse von *Arthrobacter crystallopietes* DSM 20117 in ausreichender Menge bereitgestellt werden. Nach den Arbeiten von Brans (1991) wurde dafür ein halbsynthetisches Medium mit D,L-Lactat als Kohlenstoffquelle, Hefeextrakt als weiterem Bestandteil und Hydantoin als Induktor für die Kultivierung im 50 Liter-Bioreaktor verwendet. Eine erste Vorkultur (V = 20 ml) wurde über Nacht bei 30 °C und 110 rpm inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Vorkultur zum Animpfen der zweiten Vorkultur (V = 2 l) verwendet. Nach zwei Tagen Inkubation wurden 1,5 l der zweiten Vorkultur als Inokulum für die Fermentation (V = 20 l) genutzt. Da der Induktor Hydantoin während des Wachstums verbraucht wird, wurde dieses mit einer Förderpumpe kontinuierlich zudosiert, so dass die Hydantoinkonzentration im Medium konstant 0,2 g/l betrug. Nach der Zellernte wurden 205 g BFM aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

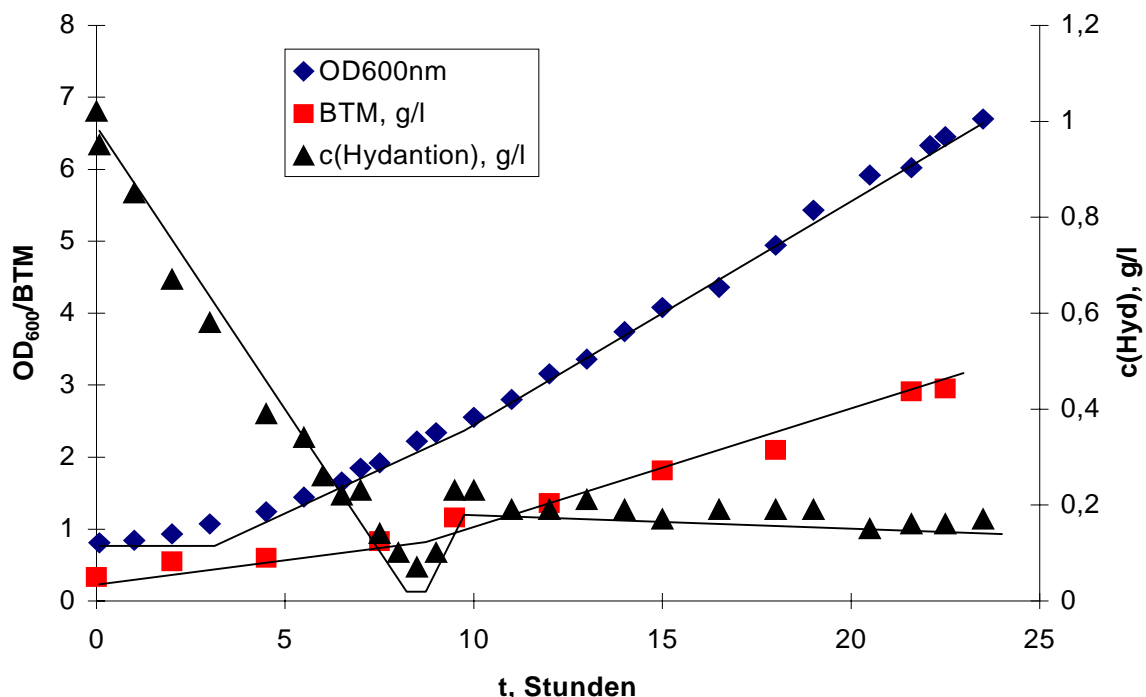


Abbildung 12: Kultivierung von *Arthrobacter crystallopietes* DSM 20117 im Bioreaktor; zur Bestimmung der Biomassekonzentration wurden die optische Dichte bei 600 nm und die Biotrockenmasse gemessen; die Messung der Hydantoinkonzentration im Medium erfolgte durch HPLC-Analytik.

## 2 Ganzzellaktivitätstests

Zur Untersuchung der Substratspezifität von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 wurden Ganzzellaktivitätstests durchgeführt. Werden die als Substrate vorgelegten Hydantoinverbindungen umgesetzt, so sollten in der Zelle auch die Enzyme vorliegen, die diese Reaktionen katalysieren. Auf diese Weise lassen sich qualitative Abschätzungen über das Substratspektrum der Hydantoin abbauenden Enzyme ableiten. Exemplarisch ist in Abbildung 13 die Umsetzung von D,L-Benzylhydantoin dargestellt. Nach ungefähr 20 Stunden ist das gesamte racemische Gemisch des Benzylhydantoin in die Aminosäure Phenylalanin umgesetzt worden. Nach ca. 2,5 Stunden ist dabei bereits das D-Enantiomer des Hydantoinderivates vollständig umgesetzt. Danach ist die Abnahme des verbliebenen L-Enantiomers zu erkennen.

Das Zwischenprodukt Carbamoyl-Phenylalanin wird zwischenzeitlich nicht akkumuliert und ist während der gesamten Reaktion nur in Konzentrationen unterhalb von 0,3 mM nachweisbar.

Nach Ende der Umsetzung wurde der Reaktionsüberstand auf die Enantiomerenreinheit des gebildeten Phenylalanins untersucht, wobei sich zeigte, dass ausschließlich die D-Aminosäure gebildet wurde.

Die Daten für die übrigen untersuchten Substrate sind in Tabelle 19 zusammengefaßt.

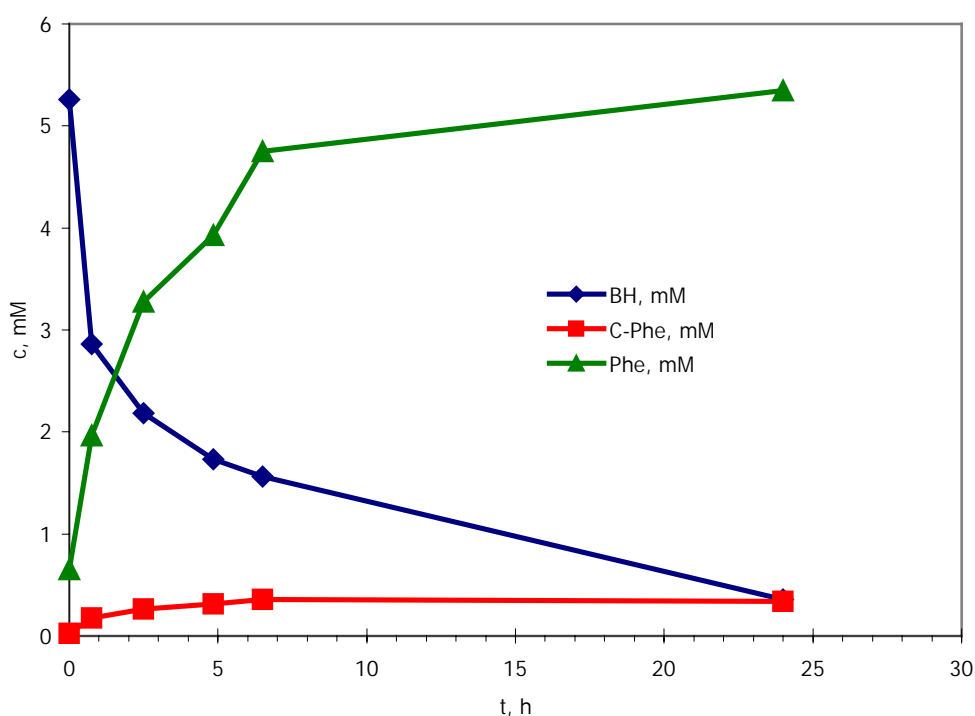


Abbildung 13: Substratumsetzungskinetik von D,L-Benzylhydantoin mit ruhenden Zellen; BH: D,L-Benzylhydantoin; C-Phe: D,L-Carbamoyl-Phenylalanin; Phe: D-Phenylalanin

**Tabelle 19: Ganzzellumsetzungen mit verschiedenen Hydantoinderivaten unter Standardbedingungen**

Substrat	Produkt	Umsatz des Hydantoins nach 24 Stunden
D,L-Benzylhydantoin	Phenylalanin	100 %
D,L- <i>p</i> -Cl-Benzylhydantoin	Tyrosin	80 %
D,L-Methylthioethylhydantoin	Methionin	20 %
D,L-Isobutylhydantoin	Valin	100 %

Die Substrate L-*allo*-Threoninhydantoin und D,L-Serinhydantoin konnten unter Standardbedingungen mit ruhenden Zellen nicht in die entsprechenden Aminosäuren überführt werden. Deshalb wurden für diese Substrate die Umsetzungen mit den Reaktionsbedingungen nach Angela Möller (1986) wiederholt. Als Veränderungen gegenüber dem Standardtest liegt hier die Konzentration der Substrate bei 10 g/l und die der Biofeuchtmasse bei 1 g/l. Nach diesen Modifikationen konnte das Reaktionsprodukt der beiden Hydantoinderivate nachgewiesen werden (siehe Tabelle 20).

**Tabelle 20: Ganzzellumsetzungen von Hydantoinderivaten nach den Reaktionsbedingungen von A. Möller (1986)**

Substrat	Produkt	Umsatz des Hydantoins nach 24 Stunden
L- <i>allo</i> -Threoninhydantoin	<i>allo</i> -Threonin	17 %
D,L-Serinhydantoin	Serin	12 %

### ***3 Aufreinigung der D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117***

Das Protokoll zur Aufreinigung der D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 orientiert sich mit einigen Modifikationen an der von Marin beschriebenen Proteinaufreinigung der D-Hydantoinase (Marin, 1997). Die Aufreinigungsschritte wurden, wenn möglich, bei 4 °C durchgeführt und die Bestimmung der Hydantoinaseaktivität der Fraktionen erfolgte zunächst im Schnelltest mit dem photometrischen Nachweis nach Ehrlich. Aliquots der positiven Proben wurden anschließend mit dem Standardsubstrat D,L-Benzylhydantoin inkubiert und die exakte Aktivität mittels HPLC bestimmt.

Die aus der Kultivierung erhaltene Biomasse (siehe III-1) von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 wurde zunächst als 30 %-ige Zellsuspension einem Glasperlenaufschluß in der Rührwerkskugelmühle unterzogen. Nach der Aufnahme einer Aufschlußkinetik, konnten nach 20 minütiger Aufschlußzeit Proteinkonzentration von bis zu 16,5 g/l erreicht werden. Danach wurden die Zelltrümmer sowie unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt und der geklärte Überstand für die folgende Protaminsulfatfällung eingesetzt. Mit dieser ließ sich vor Durchführung einer Streamline-DEAE-Säulenchromatographie die Viskosität der Lösung verringern.

Die auf der Säule gebundenen Proteine wurden mittels eines Kochsalzgradienten eluiert. Die aktiven, gepoolten Streamlinefraktionen wurden mit einem gleichen Volumen 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung versetzt, um sie anschließend mittels hydrophober Interaktionschromatographie (HIC) weiter aufzutrennen. Die Fraktionen mit der höchsten Hydantoinaseaktivität wurden anschließend vereinigt und über Anionenaustauschchromatographie an einer MonoQ-Säule von anderen Proteinen getrennt.

Die Daten zur Aufreinigung der Hydantoinase sind in Tabelle 21 zusammengefaßt, die SDS-PAGE der aufgereinigten D-Hydantoinase in Abbildung 15 dargestellt. Die Größe der D-Hydantoinase-Bande entspricht dabei etwa einem Molekulargewicht von 50 +/- 5 kDa.

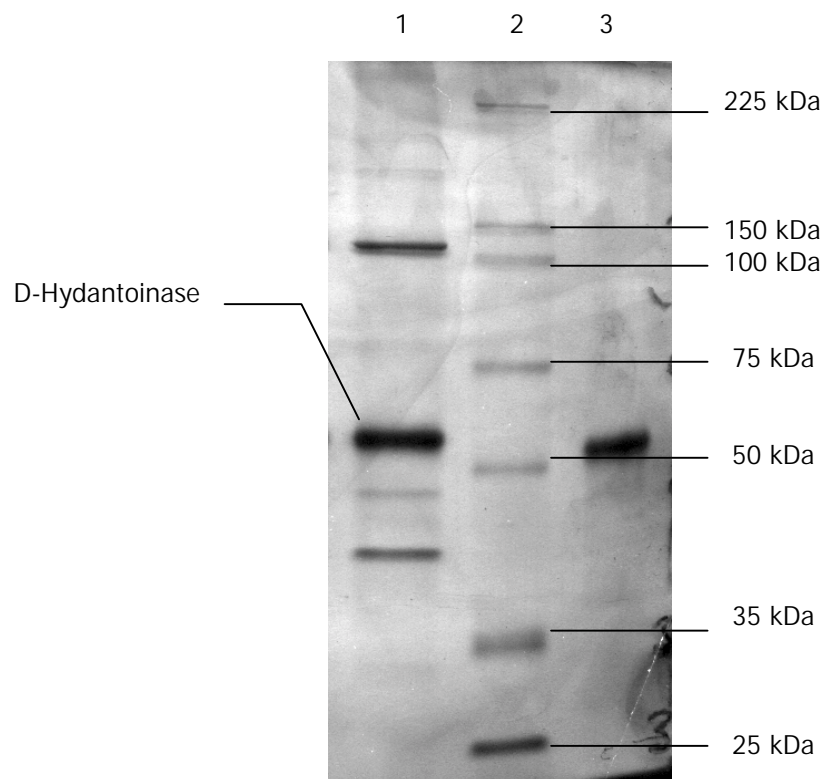


Abbildung 14: 10 %-ige SDS-PAGE der aufgereinigten D-Hydantoinase nach Konzentrierung der MonoQ-Fractionen (1), Molekulargewichtsmarker ProSieve (2) und L-Hydantoinase aus *A. aurescens* DSM 3745 als interner Standard von 49,7 kDa (May, 1998)

Tabelle 21: Aufreinigungsdaten für die D-Hydantoinase

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein [g/l]	spezif. Aktivität [U/mg]	Reinigungsfaktor	Ausbeute [%]
Zellaufschluß	32	16	1,5	-	100
Protaminsulfatfällung	29	17	1,4	0,9	89
vereinigte Streamline-Fractionen	61	3,8	1,9	1,3	57
Überstand Ammoniumsulfatfällung	120	1,5	3,7	2,4	85
vereinigte HIC-Fractionen	30	0,8	13,3	8,8	41
vereinigte MonoQ-Fractionen	19	0,4	30,1	19,8	29

#### 4 Tryptischer Verdau der D-Hydantoinase

N-terminale Sequenzierungen liefern sichere Sequenzergebnisse nur für die ersten 30 Aminosäuren. Reichen diese Informationen nicht für die Synthese einer spezifischen Sonde aus, muß das Protein zur weiteren Sequenzinformation durch einen Proteaseverdau in mehrere Peptide zerteilt werden. Zur enzymatischen Fragmentierung wurde mit Trypsin eine Endopeptidase verwendet, die spezifisch nach den Aminosäuren Lysin und Arginin schneidet. Allerdings ist mit einer verminderten Aktivität zu rechnen, wenn eine saure Aminosäure folgt, und sogar mit einem Ausbleiben der Hydrolyse, wenn ein Prolinrest folgt. Bei einem durchschnittlichen Vorkommen von Lysin und Arginin von 5,7 % bzw. 5,4 % in Proteinen, ist bei vollständigem Verdau mit einer durchschnittlichen Peptidlänge von etwa 9 Aminosäuren zu rechnen. Die Auftrennung des Peptidgemisches erfolgte anschließend durch quantitative HPLC.

Um die Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 mit Trypsin zu verdauen, wurde diese wie beschrieben bis zu den MonoQ-Fractionen aufgereinigt, anschließend mit einem Amicon-Filter (cut-off 30 kDa) aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem Protein auch um die D-Hydantoinase handelte, wurde ein Teil des Geles über einen Western-Blot auf eine Membran transferiert, ausgeschnitten und N-terminal die ersten acht Aminosäuren bestimmt. Mit Ausnahme von Position 2 stimmten alle ermittelten Aminosäuren mit dem von Marin bestimmten N-Terminus überein, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich bei dem hier isolierten Protein um dasselbe Enzym handelte, das von Marin bereits beschrieben und charakterisiert wurde (Marin, 1997).

Daraufhin wurde die Hydantoinase-Bande direkt aus dem Polyacrylamidgel der aufgetrennten MonoQ-Fractionen ausgeschnitten und *in situ* tryptisch verdaut. Die Peptide wurden mit Acetonitril aus dem Gel extrahiert und mittels präoperativer HPLC voneinander getrennt. Die Fractionen wurden im Speedvac eingetrocknet und anschließend N-terminal über Edman-Abbau sequenziert.

Insgesamt konnten zusätzlich zum N-Terminus neun Peptide eindeutig sequenziert werden (siehe Tabelle 22). Eines der Peptidfragmente wies das Konsensusmotiv GXXDXHXH der cyclischen Amidasen auf, das an der Bindung eines Zinkatoms im aktiven Zentrum beteiligt ist (Abendroth et al., 2000). Bei den Peptidsequenzen, die nicht mit einem Lysin (K) oder Arginin (R) enden, brach die Sequenzierung aufgrund technischer Probleme oder mangelnder Qualität bzw. Quantität der Proben frühzeitig ab.

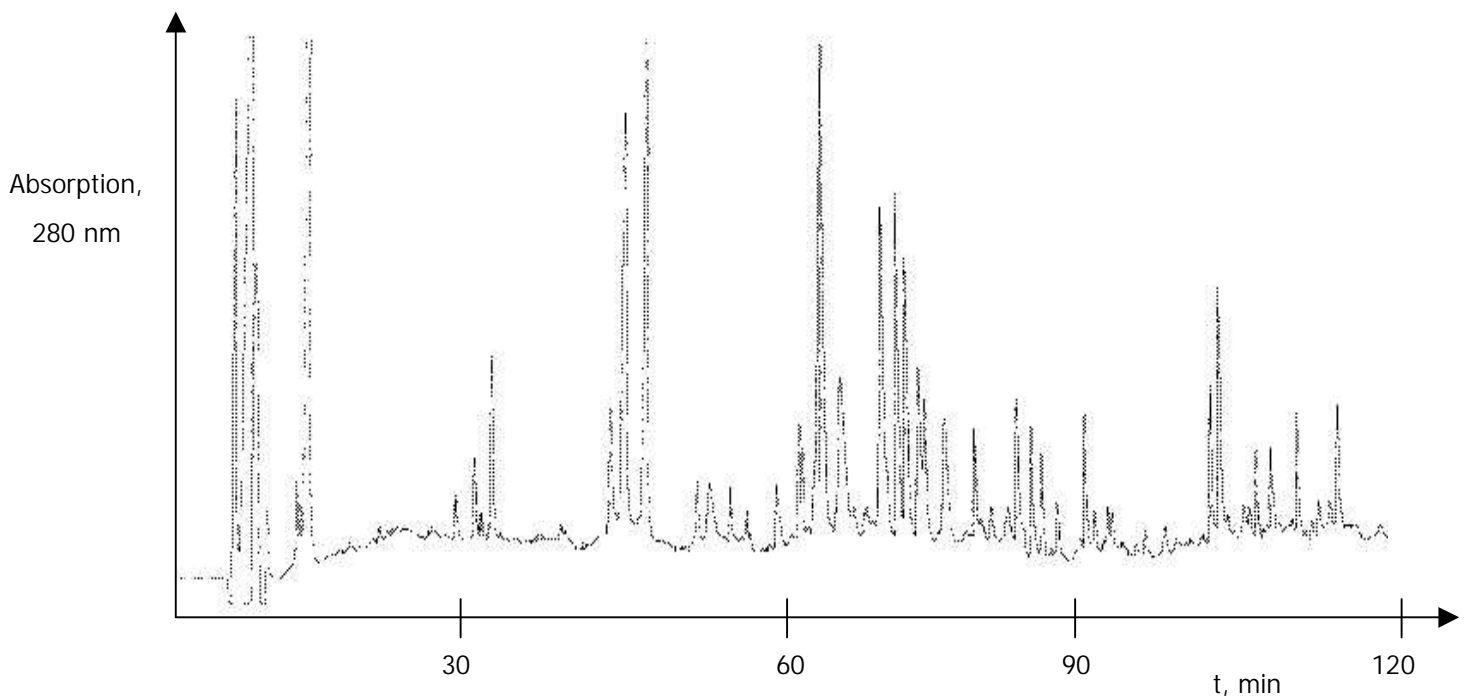


Abbildung 15: Chromatogramm der reversed phase HPLC des tryptischen Verdau der D-Hydantoinase

Tabelle 22: Ergebnis der Sequenzierung der Peptide aus dem tryptischen Verdau; das HXH-Motiv der cyclischen Amidasen ist in der Sequenz von Peptid 82.15 hervorgehoben.

Retentionszeit, min	Sequenz
N-Terminus nach Western-Blot	MDAKLLVG
36.06	GEYVGTR
62.76	VGMLDAETPDIVER
61.61	LVMYETGVAEGK
64.62	APGSDADFFMMDP
73.31	QNMDYTLFEGFK
73.93	GINTGAVSVSSDHCPIFFEEK
77.53	ALVILYFV
79.37	GQLMINDGELFDILK
82.15	VMPGGIDV <b>H</b> THIDSPMGTT (Konsensusmotive)



## **5 Klonierung des *hyu*-Genclusters**

### **5.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117**

Die durch Kultivierung von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 auf Lactatmedium gewonnene Biofeuchtmasse (siehe III-1) diente auch zur Isolierung chromosomaler DNA. Nach Zelllysis und Aufreinigung mittels Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation konnte hochreine, genomische DNA isoliert werden. Die Qualität wurde durch Aufnahme eines Absorptionsspektrum geprüft, um auf diese Weise Kontaminationen mit Phenol ausschliessen zu können. Die photometrisch bestimmte DNA-Konzentration betrug 60 µg DNA/ml.

Die gDNA wurde für einen Restriktionsverdau eingesetzt und als Matrize für PCRs verwendet.

### **5.2 PCR mit degenerierten Primern**

Durch die Sequenzierung der aus dem tryptischen Verdau hervorgegangenen Peptide (siehe III-4) konnten zusätzlich zum N-Terminus der D-Hydantoinase weitere Sequenzinformationen gewonnen werden. Die Peptide wurden mit dem Programm ClustalX an die bekannte Proteinsequenz von *Agrobacterium* sp. IP I-671 angepaßt (Abbildung 16; Thompson, et al., 1997).

```

*      20      *      40      *      60      *
MDIITKNG-TIVTADGISPADLGIKDGKIAQIGGTFGPAG----RTIDASGRYVFPGGIDVHTHVEIVSFNTQSADTF : 73
MPAKLLVGGTIVSETGKVRADVLIENGVAVXVG-MLDAETPDTVERXXXXXXXXVMPGIIDVHTHIDSPLMGTTXXXXXX : 77
M      6      G      TIV3      G      AD6      I      1GK6A      6G      V      PG      IDVHTH6      3      T

80      *      100      *      120      *      140      *
ATATVAAACGGTTTIVDFCQQDRGHSLEAVAKWDGMAGGKSAIDYGYHIIVLDPTDSVIEELEVLPDLG---ITSFK : 148
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX : 155

160      *      180      *      200      *      220      *
VFMAYRG--NMNIDDVTLRLTLDKAAKTGSLVMVHAENGDAADYLRDKFVADGKTAPIYHALSRPPRVEAEATARALA : 224
QLMINDGELFDILKXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX : 233
M      G      166

240      *      260      *      280      *      300      *
LAEIVNAP-----IYITVHLTCEESFDELMRAKARGVHALAETCTQYLYLTKDDLERPDPFEGAKYVFTPPPRTKKDQ : 295
XXXXXXXXXXALVILYFVXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX : 311
6Y      V

320      *      340      *      360      *      380      *
EILWNAIRNGVLETVSSDHCSEWLFEGHKDRGRNDFRAIPNGAPGVEERLMMVYQ-GVNEGRISLTQFVELVATRPKV : 372
XXXXXGINTGAVSVSSDHCPEFEEXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX : 389
6      G      6      VSSDHC      5      FE      6MVY2      GV      EG4

400      *      420      *      440      *      460
FGMFPEKGTAVAGSDADIVLWDFEAEMVIEQSAMHNAMDYSSYECHKIKGVPKTVLLRGKVIIVDECTYVGCAPTQDQFR : 450
XXXXXXXXXXAPGSDADFMMDPXXXXXXXXXXXXXXXXXQNM DYTLFEGEKXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGEYVCTRXXX--- : 464
A      GSDAD      6      DP      MDY3      5EG      K      G      YVG

*
KRRKYKQ : 457
----- : -

```

**Abbildung 16:** Alignment der Peptidsequenzen aus dem tryptischen Verdau (untere Reihe) mit der D-Hydantoinase aus *Agrobacterium radiobacter* (obere Reihe). Die 30 Aminosäuren des N-Terminus stammen aus der Arbeit von Marin (1997).

Um von den bekannten Peptidsequenzen degenerierte Primer abzuleiten, sollten Sequenzabschnitte von zwei Peptiden ausgewählt werden, die einen niedrigen Degenerierungsgrad in der Aminosäurezusammensetzung besitzen. Hierfür wurden die Peptide 61.61 und 73.31a ausgewählt. Die Aminosäuren, die in die Primerkonstruktion eingingen, sind in Tabelle 23 fett formatiert. Der Primer 61.61a paart an den Plusstrang und der Primer 73.31b an den Minusstrang der DNA.

**Tabelle 23:** Konstruktion der degenerierten Primer; das aufgrund der Codon-usage von *Arthrobacter sp.* vernachlässigte Codon in der DNA-Sequenz des Primers 73.31b ist an der dritten Position durch Unterstreichung hervorgehoben.

Peptid	abgeleitete DNA-Sequenz	Primernamen
SLVMYETGVAEGK (61.61)	5'-GT(AGCT) ATG TA(CT) GA(AG) AC(AGC) GG-3'	61.61a
QNMDYTLFEGK (73.31)	5'-GT( <u>AG</u> ) TA(AG) TCC AT(AG) TT(CT) TC-3'	73.31b

Um den Degenerierungsgrad des Primers 61.61a weiter zu reduzieren, wurde auf Basis der Datenbank CUTG<sup>5</sup> die Häufigkeitsverteilung der Codons aus *Arthrobacter* sp. berücksichtigt (Nakamura et al., 1999). Dadurch konnte an der Position 3 dieses Oligonukleotides das Basentriplett "GTA", aufgrund der niedrigen Wahrscheinlichkeit dieses Codons von 10,4 % für die Aminosäure Valin, bei der Primerkonstruktion vernachlässigt werden.

Um die Länge des PCR-Amplikons abzuschätzen, wurde ein Alignment der beiden Primer an die D-Hydantoinase aus *Agrobacterium* sp. IP I-671 durchgeführt. Im Alignment beträgt der Abstand zwischen den beiden Oligos 69 Aminosäuren, sodass eine PCR mit den degenerierten Primern 61.61a und 73.31b zu einem PCR-Produkt von ca. 207 bp Länge führen sollte.

Die PCR wurde im Temperaturprofil nach dem Standardansatz bei einer Annealingtemperatur von 42 °C angesetzt und bezüglich des Magnesiumgehaltes auf eine Konzentration von 2 mM optimiert. Der PCR-Ansatz wurde anschließend in einem 3 %-igen Agarosegel aufgetrennt und die Größe der Banden mit der Bildanalysesoftware ImaMaster bestimmt (siehe Abbildung 17). Die Bande, die eine berechnete Größe von 218 bp besaß, wurde aus dem Gel eluiert und in den pCR TOPO BluntII-Vektor ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde als pJW1 bezeichnet. Eine anschließende Sequenzierung des Vektors ergab Homologien zu bereits bekannten Dihydropyrimidinasen, sodass der erste DNA-Abschnitt auf dem Strukturgen der D-Hydantoinase damit kloniert vorlag.

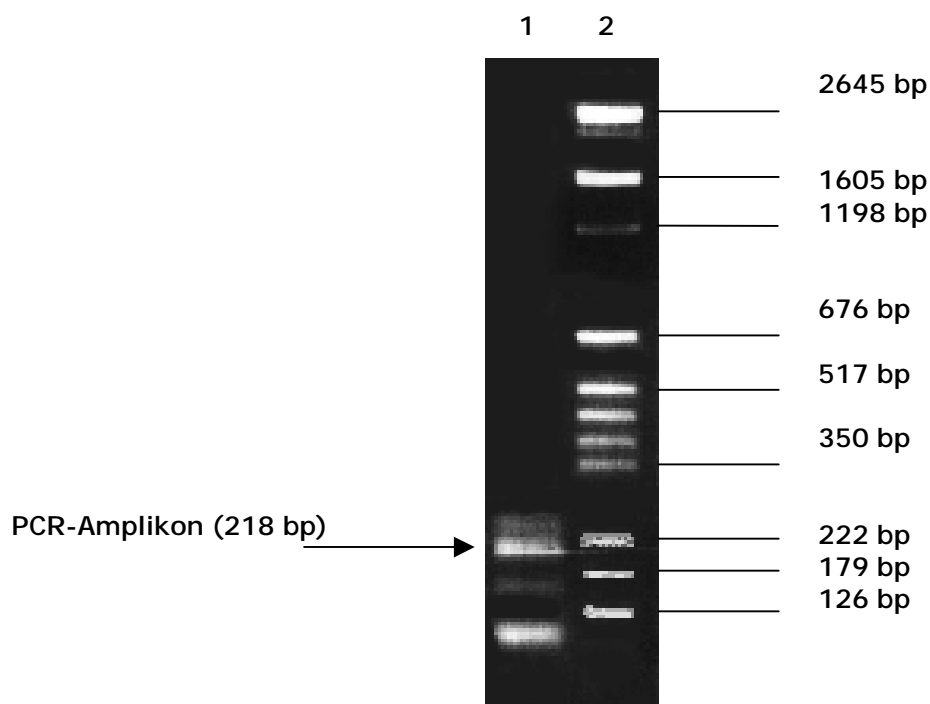


Abbildung 17: Agarosegel der (1) PCR-Reaktion mit degenerierten Primern und (2) Molekulargewichtsmarker D-15 (Firma Novex)

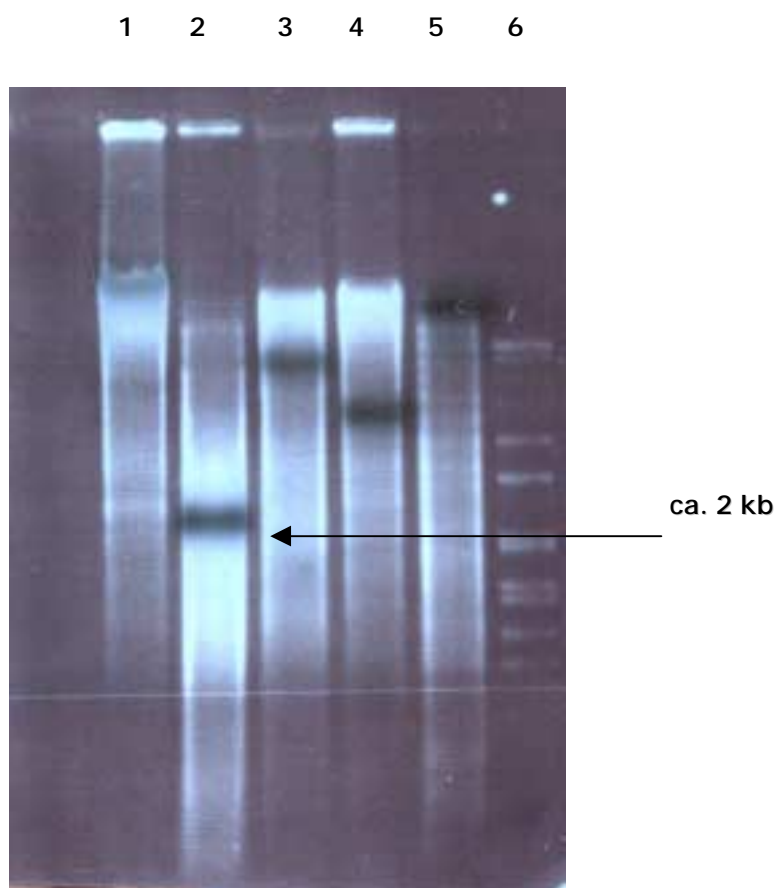
<sup>5</sup> <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

### 5.3 Sequenzierung des *hyu*-Genclusters über Inverse PCR

Um weitere Sequenzinformationen von den flankierenden DNA-Bereichen zu erhalten, kam die Technik der inversen PCR (IPCR) zum Einsatz.

Zum Verdau genomischer DNA aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 fanden die Restriktionsenzyme *Bam*HI, *Eco*RI, *Sac*I, *Pst*I, *Bgl*II, *Hind*III, *Sal*I, *Mun*I, und *Mlu*I Anwendung. Die Verdau wurden über ein 1 %-iges Agarosegel aufgetrennt und mittels Southern-Blot auf eine Nylonmembran fixiert.

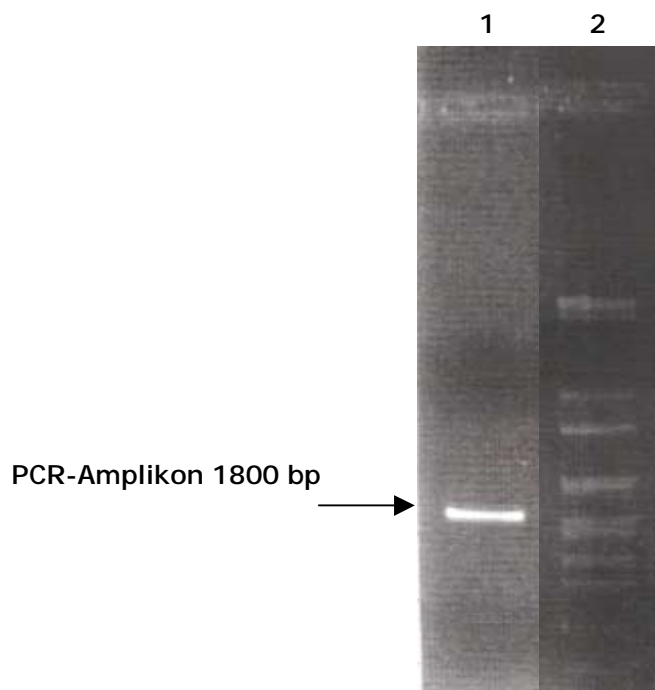
Zur Herstellung einer geeigneten Sonde wurde das *Mun*I linearisierte Plasmid pJW1 über Nick-Translation mit  $^{32}$ P- $\alpha$ -ATP radioaktiv markiert und zur Hybridisierung mit dem Blot eingesetzt. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung nach Exponierung auf einem Röntgenfilm; zur Analyse wurde der Film anschließend auf ein Foto des genomischen Verdau gelegt (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Genomischer Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI (1), *Eco*RI (2), *Sac*I (3), *Pst*I (4) *Bgl*II (5) und Molekulargewichtsmarker MWM VII (6); der Röntgenfilm wurde deckungsgleich über das Gelfoto gelegt.

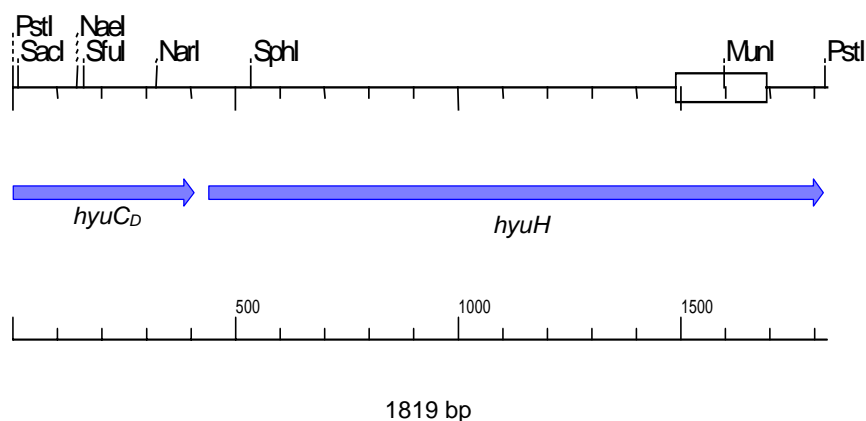
Aufgrund der aus dem Southern-Blot erhaltenen Größe der Hybridisierungssignale wurde bei der folgenden IPCR der genomische *Pst*I-Verdau (ca. 2000 bp) als Matrize eingesetzt. Dazu wurde der Verdau auf einem Agarosegel aufgetrennt, im Bereich zwischen 1500 und 2800 bp aus dem Gel

eluiert, anschließend religiert und mit *MunI* linearisiert. Aus der bekannten Sequenz des Hydantoinasegens konnten die Primer IPCR1+ und IPCR1- für die IPCR abgeleitet werden. Aus den Schmelztemperaturen der Oligos leitete sich die Annealingtemperatur von 60 °C ab.



**Abbildung 19:** Ergebnis der IPCR mit einem religierten *PstI*-Verdau als Matrize (1) und Molekulargewichtsmarker MWM VII (2)

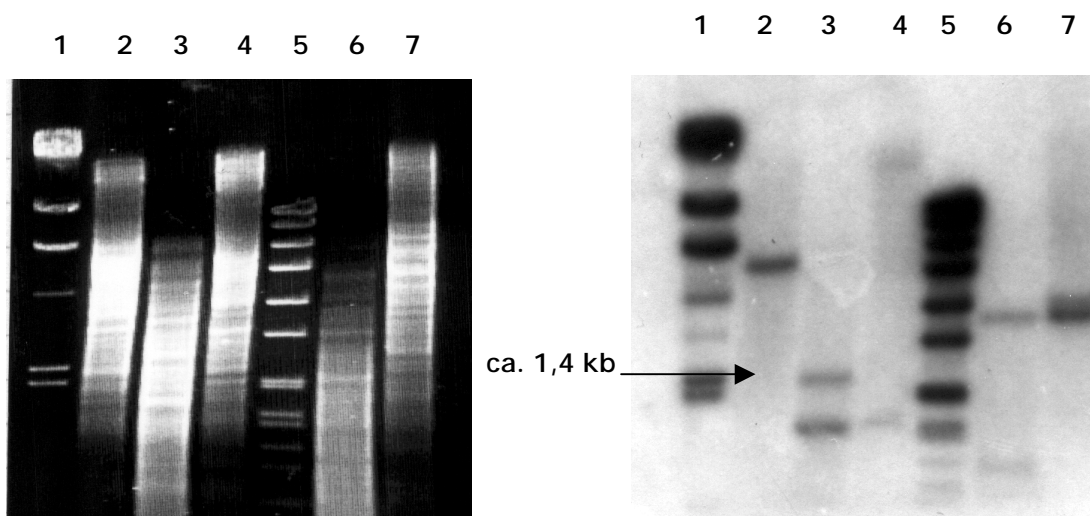
Es konnte eine einzige Bande als Amplikon generiert werden (siehe Abbildung 20), die anschließend eluiert und in das TOPO-System kloniert wurde. Das entstandene Plasmid erhielt die Bezeichnung pJW2. Das nach der Sequenzierungen von pJW2 rekonstruierte *hyu*-Gencluster ist in Abbildung 20 dargestellt. Es enthält den offenen Leserahmen der D-Hydantoinase *hyuH* und einen Teil des offenen Leserahmens der D-Carbamoylase *hyuC<sub>D</sub>*.



**Abbildung 20:** *hyu*-Gencluster nach der ersten IPCR; die Box am 3'-Ende des *hyuH*-Leserahmens deutet die bereits bekannte Sequenz aus der PCR mit degenerierten Primern an.

Im nächsten Schritt sollte, ebenfalls über die Technik der IPCR, der vollständige Leserahmen der D-Carbamoylase kloniert werden. Hierzu konnten aus dem bekannten Sequenzabschnitt der D-Carbamoylase Restriktionsenzyme gefunden werden, die den Anforderungen der IPCR gerecht wurden und möglichst weit am 5'-Ende des D-Carbamoylasegens schneiden sollten. Schließlich wurde ein genomischer Verdau mit den Restriktionsenzymen *SacI*, *NaeI*, *SfuI*, *NarI* und *SphI* durchgeführt und nach der Auftrennung im Agarosegel auf eine Nylonmembran geblotet.

Als Sonde eignete sich das kleine Fragment eines *NarI/BamHI* Doppelverdaues von pJW1. Es wurde in einem Gel aufgetrennt, eluiert und anschließend mittels Nick-Translation radioaktiv markiert und zur Hybridisierung eingesetzt.



**Abbildung 21:** links das Agarosegel des genomischen Verdau mit MWM II (1), *SacI* (2), *NarI* (3), *SfuI* (4), MWM VII (5), *NaeI* (6) und *SphI* (7) ; rechts der Röntgenfilm: in Spur (3) und (6) sind zwei Banden zu sehen, wobei die jeweils größere der beiden auf einen unvollständigen Verdau zurückzuführen ist.

Aufgrund der Hybridisierungssignale (siehe Abbildung 21) wählte man den religierten *NarI*-Verdau (1,4 kb) als DNA-Templat für die zweite IPCR. Als Primer wurden die Oligos IPCR5+ und IPCR5- bei einer Annealingtemperatur von 57 °C eingesetzt. Das Ergebnis der IPCR ist in Abbildung 23 dargestellt. Die Bande wurde in den TOPO-Vektor kloniert und das entstandene TOPO-Plasmid als pRW bezeichnet. Nach der Sequenzierung des Inserts konnte das *hyu*-Gencluster soweit rekonstruiert werden, dass der Leserahmen der D-Carbamoylase vollständig vorlag. Ein Teil eines Leserahmens, der Homologien zu L-Carbamoylasen aufwies, konnte ansequenziert werden.

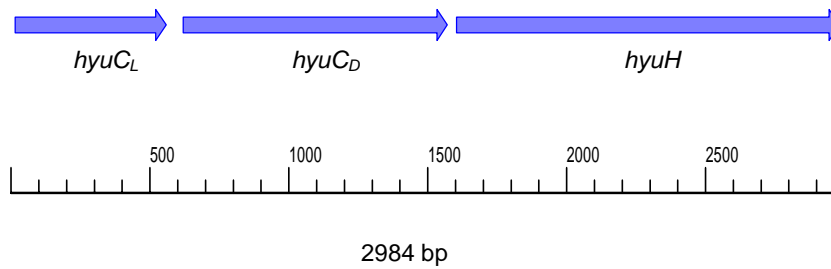


Abbildung 22: *hyu*-Gencluster nach der zweiten IPCR

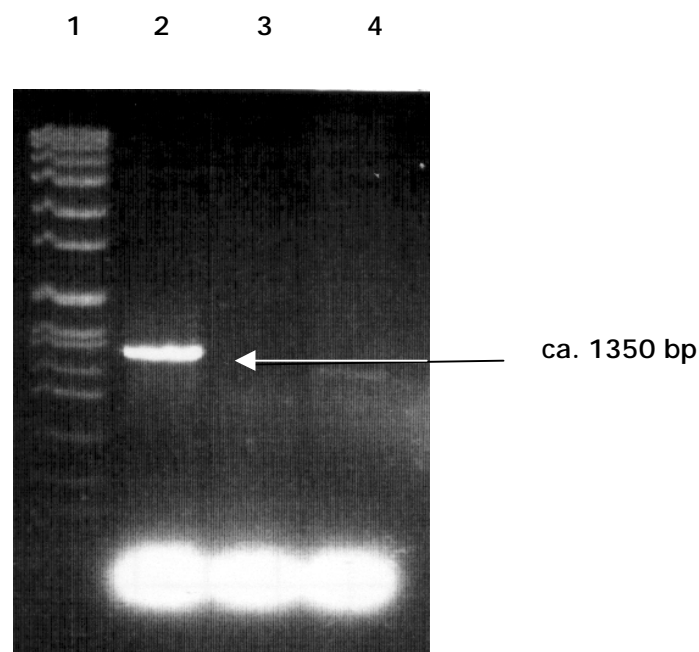


Abbildung 23: Agarosegel der IPCR 2 mit religiertem *NarI*-Verdau als Matrize; MWM VII (1), PCR-Ansatz (2) und Nullkontrollen mit jeweils nur einem Primer (3 - 4); am unteren Ende des Gels sind Primerdimere zu erkennen.

Um weitere Sequenzinformationen sowohl up- als auch downstream des bekannten Genclusters zu gewinnen, wurden IPCRs in beide Richtungen durchgeführt. Die Bedingungen sind in Tabelle 24 zusammengestellt. Dabei entsprach die sonstige Vorgehensweise der von der zuvor beschriebenen IPCR 2.

Tabelle 24: Bedingungen für IPCR 3 und IPCR 4

Komponente	upstream der L-Carbamoylase IPCR 3	downstream der D-Hydantoinase IPCR 4
geteste/verwendetes Restriktionsenzym(e)	<i>XhoI</i> , <i>SacI</i> , <i>BspHI</i> , <i>PstI</i> , <i>BssHII</i> und <i>NheI</i>	<i>XhoI</i> , <i>PvuI</i> , <i>MunI</i> , <i>SalI</i> , <i>SfuI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>BclI</i> und <i>SacI</i>
Primer A	IPCR 11+	IPCR 7+
Primer B	IPCR 11-	IPCR 7-
Annealingtemperatur	60 °C	54 °C
Sonde	kleines Fragment (147 bp) eines <i>EcoRI</i> -Verdau von pJW2	kleines Fragment (198 bp) Doppelverdau von pJW2 mit <i>PvuI</i> und <i>PstI</i>
Bezeichnung des TOPO- Plasmides	pCF1	pCF2

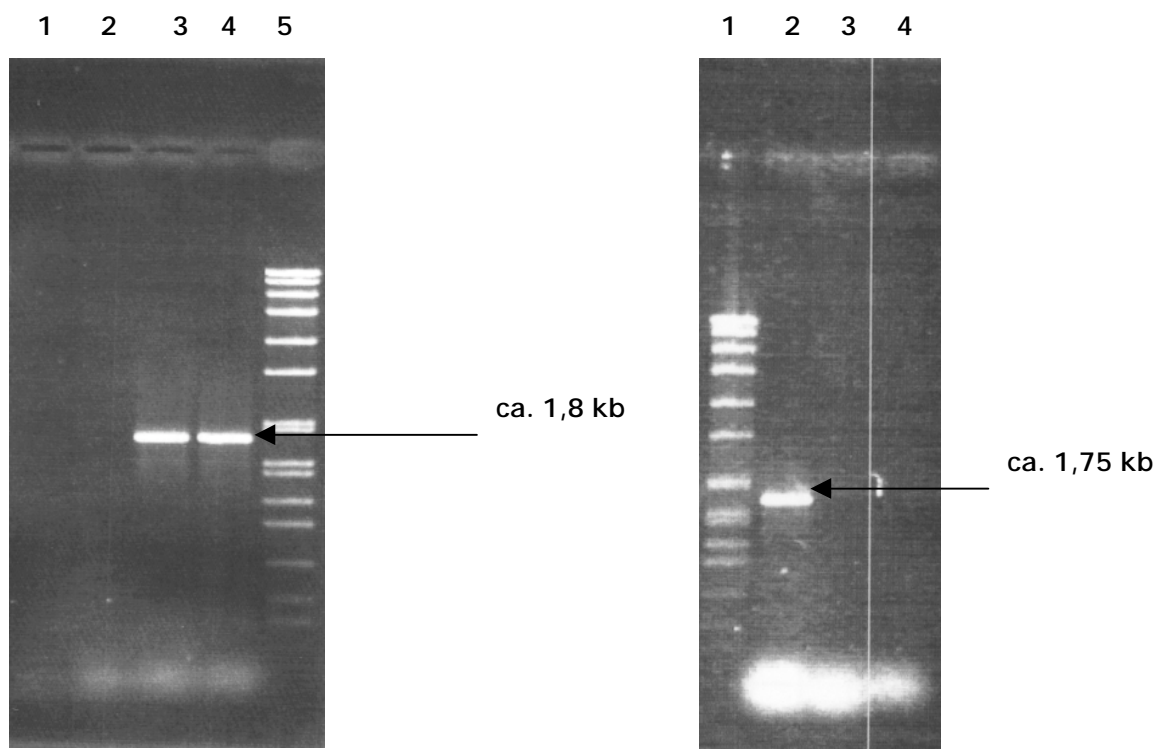


Abbildung 24: linkes Agarosegel der IPCR 3: (1) und (2) Nullkontrollen ; (3) und (4) PCR-Reaktionsansätze mit religiertem *SacI* Verdau mit 0 bzw. 5 % DMSO; (5) MWM VII; rechtes Agarosegel der IPCR 4: (1) MWM VII; (2) PCR-Reaktionsansatz mit religiertem *PvuI*-Verdau; (3) und (4) Nullkontrollen



Neben der Vervollständigung des Strukturgenes der L-Carbamoylase konnte nach den IPCRs 3 und 4 zwei weitere Leserahmen ansequenziert werden. Die gesamte Länge des sequenzierten *hyu*-Genclusters beträgt 6,0 kb und enthielt die vollständigen Strukturgene für die D-Hydantoinase, D-Carbamoylase und L-Carbamoylase, sowie die unvollständigen Leserahmen eines vermutlichen Repressors (*orf1*) und einer Permease (siehe Abbildung 25).

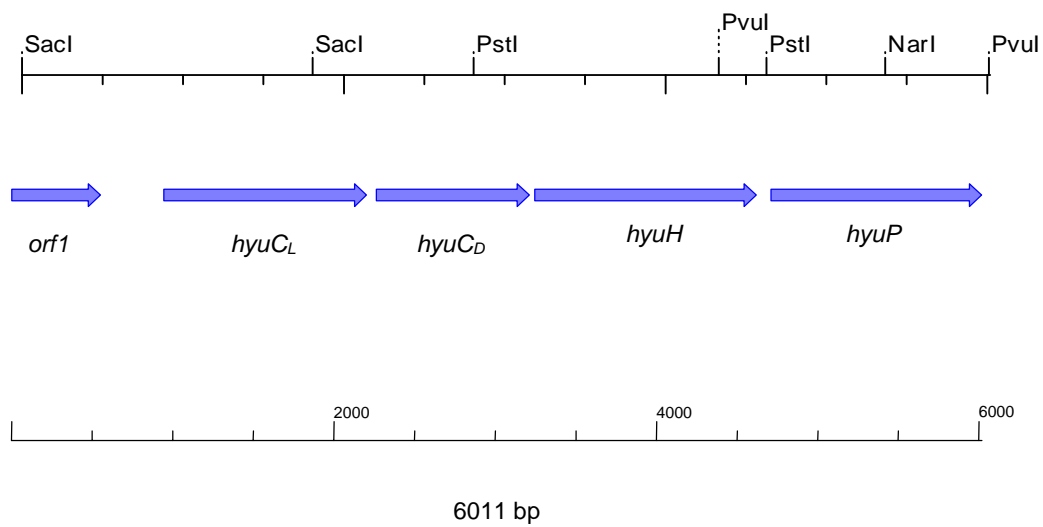


Abbildung 25: Das *hyu*-Gencluster aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117

## 6 Analyse der Gesamtsequenz und Homologierecherche

Die bisher erhaltene Gesamtsequenz des *hyu*-Genclusters aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 umfaßt 6011 bp. Der durchschnittliche G/C-Gehalt der Sequenz beträgt 58 % und erreicht somit ähnliche Werte, wie sie für die Gattung *Arthrobacter* beschrieben sind (60 %). Alle gefundenen Leserahmen liegen in gleicher Orientierung vor.

Die Identifizierung und Funktionsbestimmung für alle sechs offenen Leserahmen erfolgte über die Datenbankrecherche blastx (Altschul et al., 1997). In Analogie zu den Hydantoin-Genclustern aus *Pseudomonas sp.* NS671 wurden die am Hydantoin-Abbau beteiligten Enzyme mit *hyu* abgekürzt (Watabe et al., 1992). Um die D- und L-Carbamoylasen voneinander zu unterscheiden, wurde die L-Carbamoylase mit dem Suffix L (*hyuC<sub>L</sub>*) und die D-Carbamoylase mit dem Suffix D (*hyuC<sub>D</sub>*) gekennzeichnet.

### *hyuH*

Mit 43 % Identität der Aminosäuren weist das Gen *hyuH* die höchste Homologie zu einem hypothetischen Protein aus *Streptomyces coelicolor* auf (T28685), dem bisher aber noch keine Funktion zugeordnet werden konnte. Zu den Dihydropyrimidinasen aus *Bacillus stearothermophilus* (JC2310: Mukohara et al., 1994), *Agrobacterium radiobacter* NRRLB11291 (Q44184: Grifantini et al., 1996) und *Pseudomonas* (Stover et al. 2000, La Pointe et al. 1998) liegen Identitäten von 40 % , 42 % und 39 % vor.

Neben den Homologien zu eukaryontischen Dihydropyrimidinasen (aus *Mus musculus*, *Homo sapiens* und *Rattus norvegicus*) und dem Collapsin response mediator Protein 3 (CRMP-3), liegen auch Homologien zu verschiedenen Allantoinasen und Dihydroorotasen vor.

Gegenüber den L-Hydantoinasen aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3745 (May et al. 1998) und DSM 3747 (Wiese, 2000) liegt eine 29 %-ige Identität vor.

### *hyuC<sub>D</sub>*

Die größten Ähnlichkeiten bei diesem Gen bestehen zu D-Carbamoylasen aus *Pseudomonas sp.* (JW0083; Ikenaka et al., 1998; 53 % AS-Identität), aus *Agrobacterium radiobacter* NRRLB11291 (CAA62550; Grifantini et al., 1995; 49 % AS-Identität) und *Agrobacterium sp.* KNK712 (JW0082: Nanba et al., 1998; 49 % AS-Identität).

Weitere Homologien bestehen zu  $\beta$ -Alaninsynthetasen und verschiedenen Hydrolasen, wie Nitrilasen,  $\beta$ -Ureidopropionasen und Amidasen.

***hyuC<sub>L</sub>***

Die Homologierecherchen weisen dem von diesem Gen codierten Protein eine eindeutige *N*-Carbamoyl-Amidohydrolase-Funktion zu. Die Identität auf Proteinebene zu der *N*-Carbamoyl-L-Aminosäurehydrolase aus *Bacillus stearothermophilus* NSS1122A (JN0885; Mukohara et al.), *Arthrobacter aurescens* (AAGO2131; Wiese et al., 2000), *Arabidopsis thaliana* (BAB11623), *Haemophilus influenzae* Rd KW20 (D64079) und dem Plasmid pHN671 aus *Pseudomonas sp.* (D42594) bewegen sich im Bereich von 33 bis 28 %.

Weitere Homologien liegen zu Allantoat-Amidohydrolasen und  $\beta$ -Alaninsynthetasen ( $\beta$ -Ureidopropionasen) vor.

***hyuP***

Homologien des nicht vollständig sequenzierten Leserahmens *hyuP* liegen aufgrund 37 %-iger Aminosäure-Identität zu einer vermutlichen Permease aus *Pseudomonas aeruginosa* (B83586) vor. Weitere Ähnlichkeiten gibt es gegenüber der Uracilpermease aus *Schizosaccharomyces pombe* (Q10279; De Montigny et al., 1998) und gegenüber Allantoat-, Thiamin- und Cytosin-Transportern. Mit dem Programm SMART Version 3.1 (Simple Modular Architecture Research Tool; Schultz et al., 1998) konnten zehn potentielle Transmembranmotive aufgefunden werden, sodass dem unvollständigen Leserahmen *hyuP* mit großer Wahrscheinlichkeit die Funktion einer Permease zukommt.

***orf1***

Der bislang bekannte Sequenzbereich von *orf1* ist zu 35 % identisch mit einem Transkriptionsregulator Protein aus der *lacI*-Familie von *Streptomyces coelicolor* (Redenbach et al., 1996) und zu 32 % identisch mit dem Transkriptionsregulator aus *Vibrio cholerae* (Heidelberg et al., 2000).

## 7 Klonierung und Expression der Strukturgene

Die Klonierung der Strukturgene der D-Hydantoinase sowie der D- und L-Carbamoylase erfolgte in Plasmidderivaten des Rhamnoseexpressionsvektors pJOE4036. Die beiden Carbamoylasen wurden durch entsprechende Primer aus der genomischen DNA von *Arthrobacter crystallopoietes* amplifiziert. Dabei waren die Primer am N-Terminus mit einer zusätzlichen Sequenz für eine *NdeI*-Schnittstelle bzw. eine *BamHI*-Schnittstelle am C-Terminus ausgestattet. Bei den Enzymen mit His-Tag wurde am C-terminalen Primer das Stopcodon weggelassen.

Weil das Hydantoinasegen zwei interne *NdeI*-Schnittstellen aufwies, konnte die bei den Carbamoylasen angewandte Strategie der Klonierung in pJOE4036 nicht angewandt werden. Statt dessen verwendete man einen Primer, der zusätzlich zur N-terminalen DNA-Sequenz am 5'-Ende für eine Shine-Dalgarno-Sequenz und eine *BamHI*-Schnittstelle codierte. Der C-terminale Primer beinhaltet eine *HindIII*-Schnittstelle mit Stopcodon bzw. mit einer Sequenz für einen Strep-tag. Die so aus der genomischen DNA amplifizierte DNA wurde anschließend in pJOE3078 kloniert.

### 7.1 D-Carbamoylase

#### 7.1.1 Expression der D-Carbamoylase

Nach der abgeschlossenen Sequenzierung des *hyu*-Genclusters fand eine Untersuchung der DNA-Sequenz auf potentielle Leserahmen statt. Für den Translationsstart der D-Carbamoylase kommt dabei neben dem *atg*-Startcodon auch ein ungewöhnliches *ttg*-Startcodon in Betracht, wobei das letztere zu einem um fünf Aminosäuren verlängerten N-Terminus führt (siehe Tabelle 25 und Abbildung 26 (4)). Weiterhin wurde ein Alignment der N-Termini der bisher bekannten D-Carbamoylasen durchgeführt. Während von den D-Carbamoylasen aus *Comamonas* (Ogawa et al., 1993) und *Blastobacter* (Ogawa et al., 1994) lediglich die ersten 30 Aminosäuren vorliegen, sind die übrigen Enzyme aus *Pseudomonas* sp. (Ikenaka et al., 1998), *Agrobacterium* IP 1-671 und *Agrobacterium* sp. KNK712 vollständig sequenziert. In dem Alignment erkennt man, dass auch mit dem *ttg*-Startcodon bei den ersten fünf Aminosäuren Homologien zu den anderen Carbamoylasen vorliegen. Auf Basis der alignierten N-Termini wurde ein Dendrogramm der D-Carbamoylasen erstellt, das die phylogenetischen Beziehungen unter den Enzymen veranschaulicht (siehe Abbildung 27).



Tabelle 26: Eigenschaften der verschiedenen Klone der D-Carbamoylase

Plasmidbezeichnung	pMW1	pMW2	pMW3
Startcodon in <i>Arthrobacter</i>	<i>ttg</i>	<i>ttg</i>	<i>atg</i>
Primerpaar	K_DCn2/c2	K_DCn2/c3	K_DCn1/c2
N-Terminale Restriktions-site	<i>NdeI</i>	<i>NdeI</i>	<i>NdeI</i>
C-Terminale Restriktions-site	<i>BamHI</i>	<i>BamHI</i>	<i>BamHI</i>
His <sub>6</sub> -tag	ja	nein	nein

Die Amplikons wurden in den Vektor pCR TOPO BluntII kloniert und der entstandene Plasmid einem Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* unterzogen. Zur Subklonierung des entstandenen, 947 bp großen Fragmentes diente der Rhamnoseexpressionsvektor pJOE4036. Die Plasmide wurden in *Escherichia coli* JM109 transformiert, und die Zellen zu Beginn der exponentiellen Phase mit Rhamnose induziert.

In Abbildung 28 und Abbildung 29 sind die SDS-Gele für pMW3 und pMW1 im Vergleich dargestellt. Bei der *atg*-Startcodonalternative ist keine zunehmende Proteinbande auf Höhe der D-Carbamoylase (34 kDa) zu erkennen, während bei der D-Carbamoylase mit *ttg*-Startcodon eine deutliche Zunahme zu verzeichnen ist. Nach 20 Stunden Induktion nimmt die Intensität der rekombinanten Proteinbande allerdings wieder ab, was vermutlich auf einen proteolytischen Verdau des Proteins zurückzuführen ist. Nach einem Zellaufschluß der beiden Klone mit dem Homogenisator konnte nur bei dem Klon mit *ttg*-Startcodon D-Carbamoylaseaktivität festgestellt werden, während die Aktivität für pMW3 unter der Nachweisgrenze blieb.

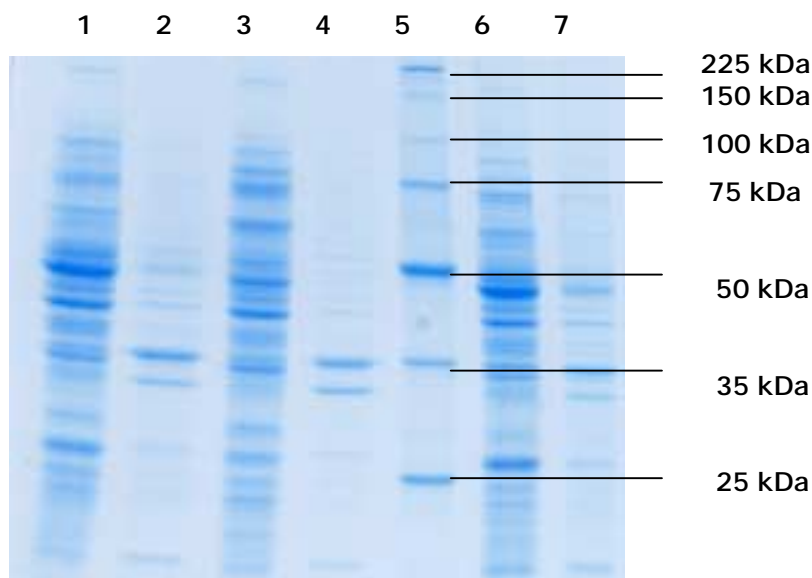


Abbildung 28: SDS-PAGE von induzierten und nicht induzierten Rohextrakten aus *E. coli* JM109 pMW3 mit *atg*-Startcodon; (1) und (2): Überstand und Pellet der nicht induzierten Kultur; (3) und (4): Überstand und Pellet der induzierten Kultur nach 6 h; (5): Molekulargewichtsmarker ProSieve; (6) und (7): Überstand bzw. Pellet der induzierten Kultur nach 21 h

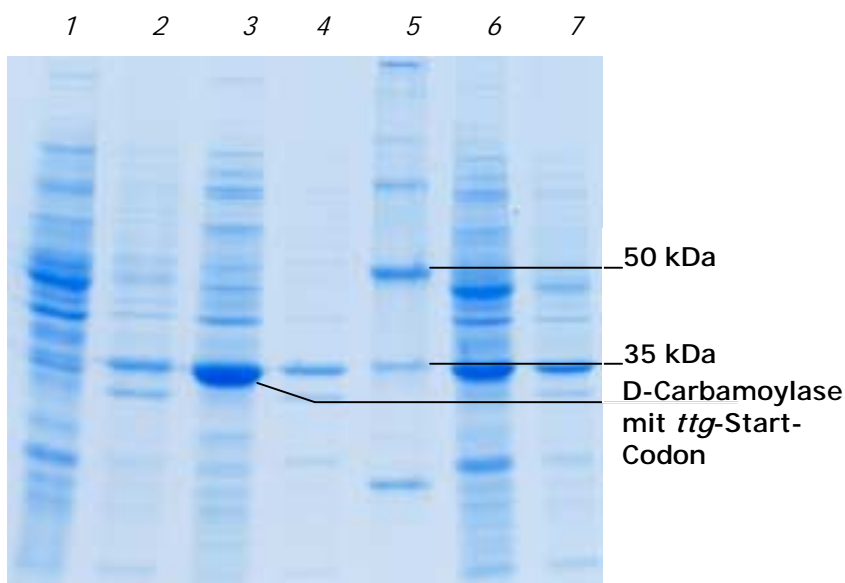


Abbildung 29: SDS-PAGE von induzierten und nicht induzierten Rohextrakten aus *Escherichia coli* JM109 pMW1 mit *ttg*-Startcodon; (1) Überstand und Pellet (2) der nicht induzierten Kultur; (3) Überstand und Pellet (4) der induzierten Kultur nach 6 h; (5) Molekulargewichtsmarker ProSieve; (6) Überstand und (7) Pellet der induzierten Kultur nach 21 h

Die D-Carbamoylase liegt vorwiegend im Überstand vor. Mit Hilfe des Programms Image Master (Amersham Life Sciences, Freiburg) konnte das Molekulargewicht des exprimierten Proteins auf 34,6 kDa festgelegt werden. Dieses Molekulargewicht stimmt mit dem berechneten Wert der D-Carbamoylase mit His-tag (35,4 kDa) gut überein. Ebenfalls mit Hilfe dieses Programms konnte ermittelt werden, dass sich der Anteil der D-Carbamoylase im Überstand auf 30 % des Gesamtproteins beläuft. Nach der Aufnahme eines Expressionsprofils (siehe Abbildung 30) konnte festgestellt werden, dass das Expressionsmaximum nach einer Induktionszeit von ca. sechs Stunden erreicht wird. Auch die spezifische Aktivität weist zu diesem Zeitpunkt ihr Maximum (2 U/mg für DL-C-Phe) auf.

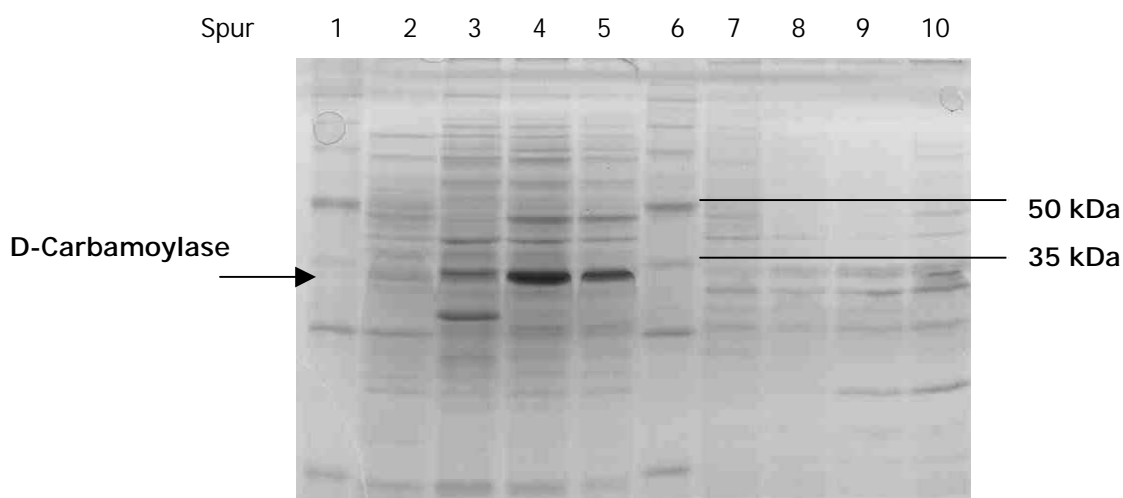
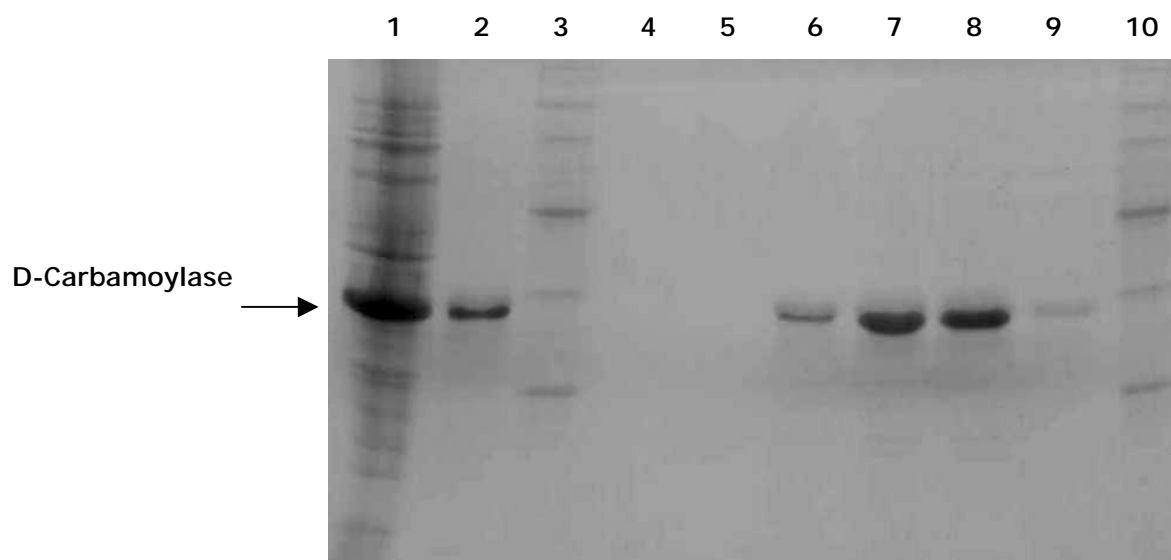


Abbildung 30: SDS-PAGE des Expressionsprofils von Rhamnose induzierten *E. coli* JM109 pMW1 Zellen; (1) und (6): Molekulargewichtsmarker ProSieve; (2) - (5): Überstände nach 0, 4, 6 und 8 h Induktion; (7) bis (10): Pelletfraktionen nach 0, 4, 6 und 8 h Induktion

### 7.1.2 Aufreinigung der D-Carbamoylase

Um die D-Carbamoylase charakterisieren zu können, wurde diese aufgereinigt. Bei dem Aufreinigungsverfahren wurde zuerst Biomasse wie in III-1 beschrieben angezchtet und die Zellsuspension mit dem Homogenisator aufgeschlossen (siehe II-2.1.5.2). Anschließend wurde die im Überstand enthaltene D-Carbamoylase über Metallaffinitäts-chromatographie (Talonsäulen® von Stratagene) aufgereinigt. Durch Umpufferung in 0,1 KPP, pH 8,0, mittels Gelfiltration (mittels PD-10 Säulen von Pharmacia) wurde das im Elutionspuffer der Talonsäule enthaltene Imidazol entfernt. Die einzelnen Aufreinigungsschritte wurden mittels SDS-PAGE dokumentiert (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 31: SDS-PAGE zur Aufreinigung der His-getagten D-Carbamoylase: (1) Rohextrakt; (2) Talonsäuleneluat; (3) und (10): MWM ProSieve; (4) bis (9): PD-10 Fraktionen I bis VI**



### 7.1.3 Charakterisierung der D-Carbamoylase

Für die Charakterisierung des so erhaltenen Enzyms wurde die homogen aufgereinigte D-Carbamoylase mit His-tag und *ttg*-Startcodon verwendet (pMW1). Das Enzym lag in 0,1 M KPP pH 8,0 vor.

#### 7.1.3.1 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums der aufgereinigten D-Carbamoylase wurden Umsetzungen bei verschiedenen pH-Werten in einem Bereich von 6,5 bis 9,0 mit DL-C-Phenylalanin als Substrat bei 30 °C durchgeführt. Um Konzentrationseffekte ausschliessen zu können wurde die Pufferkonzentration bei allen verwendeten Puffern (Tris, Kaliumphosphat und Tris-Glycin; siehe Legende in Abbildung 32) auf einen Wert von 100 mM eingestellt. Das Aktivitätsmaximum der D-Carbamoylase lag bei pH 8.

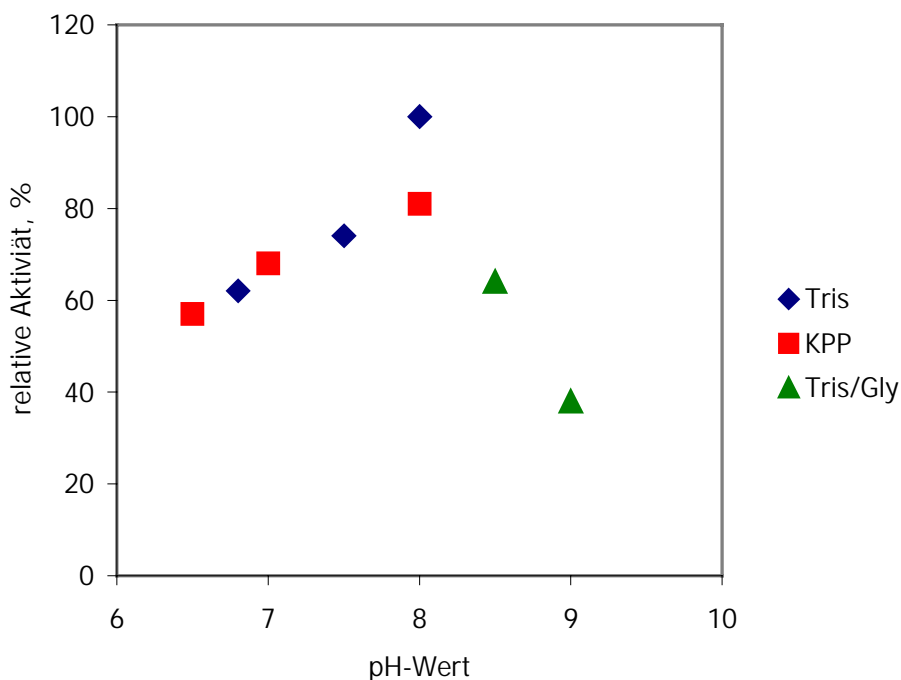


Abbildung 32: Einfluss des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit der D-Carbamoylase

### 7.1.3.2 Temperaturstabilität

Um die Temperaturstabilität der D-Carbamoylase bei 4 °C zu untersuchen wurde das Enzym in 0,1 M KPP pH 8,0 über einen Zeitraum von 4 Tagen im Kühlschrank gelagert und alle 24 Stunden ein Meßwert genommen. Bei dieser Temperatur beträgt die Halbwertszeit des Enzyms ungefähr 100 Stunden.

Um die Temperaturstabilität bei 20, 30 und 40 °C zu ermitteln, wurde das Enzym für 40 min bei der jeweiligen Reaktionstemperatur inkubiert und alle 5 min die Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

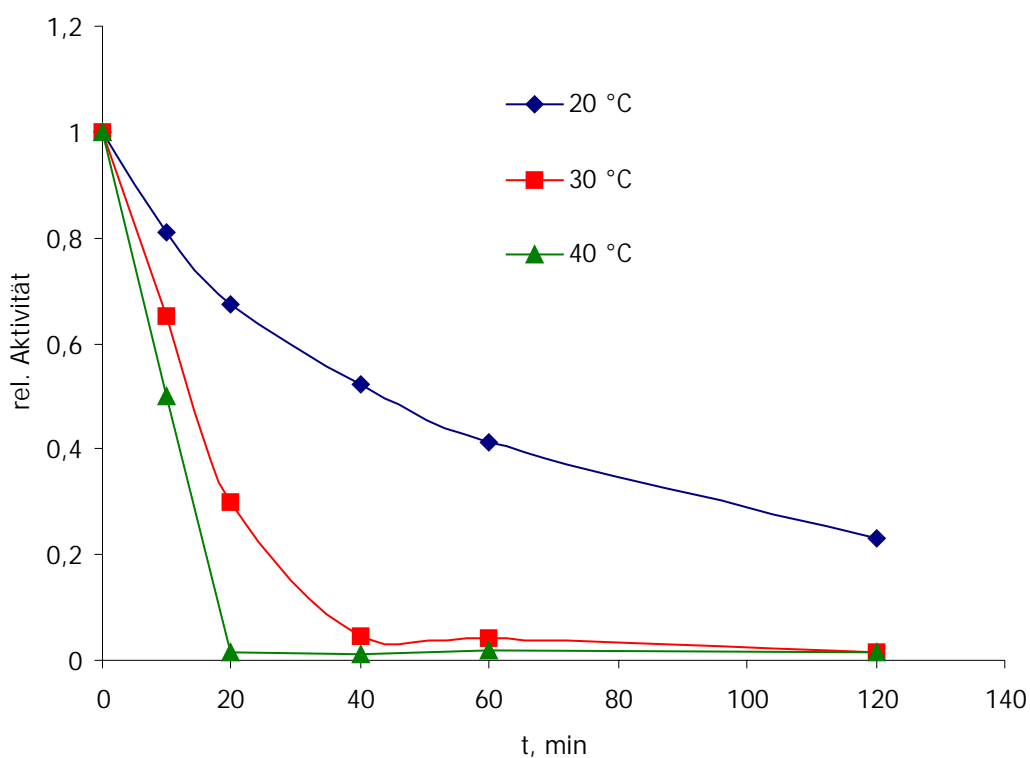
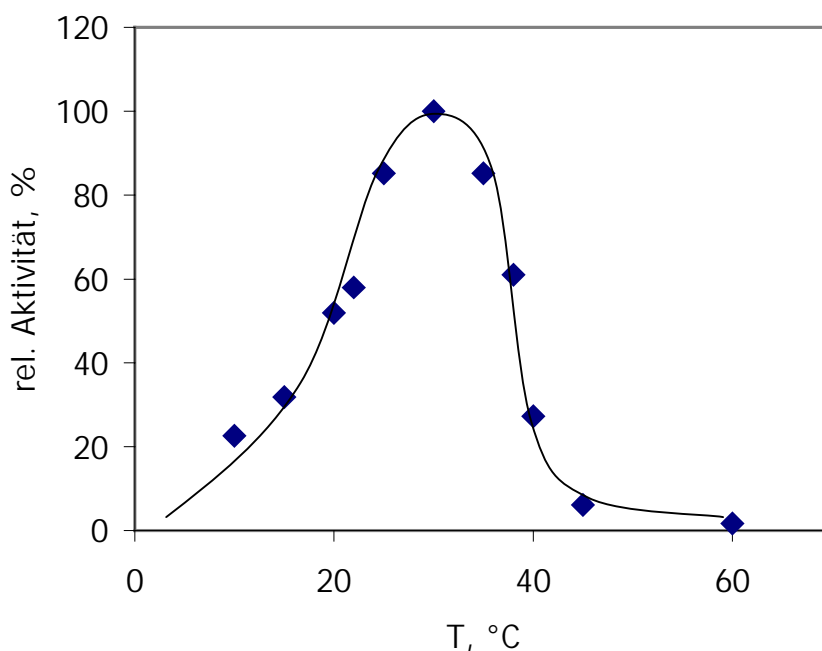


Abbildung 33: Temperaturstabilität der D-Carbamoylase bei 20, 30 und 40 °C

### 7.1.3.3 Bestimmung des Temperaturoptimums

Um das Temperaturoptimum zu bestimmen, erfolgte die Umsetzung von D,L-Carbamoyl-Phenylalanin unter den Bedingungen des Standardassays bei unterschiedlichen Temperaturen. Das Optimum für die Reaktionstemperatur liegt bei etwa 30 °C (siehe Abbildung 34).



**Abbildung 34:** Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Reaktionsgeschwindigkeit der D-Carbamoylase

### 7.1.3.4 Bestimmung kinetischer Parameter

Zur Bestimmung von  $v_{\max}$  und  $K_m$  wurde die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  in Abhängigkeit von der Substratkonzentration aufgetragen. Der Verlauf für D-Carbamoyl-Tryptophan ist in Abbildung 35 dargestellt. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über das Programm Enzymfit. Für D-Carbamoyl-Tryptophan beträgt der  $K_m$ -Wert 7,5 mM und  $v_{\max}$  2,4 U/mg. Die Reaktion kann dabei durch eine Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben werden (siehe Gleichung 2).

$$r = \frac{r_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

### Gleichung 2: Michaelis-Menten-Kinetik

$r^{\max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
S	Substratkonzentration
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante

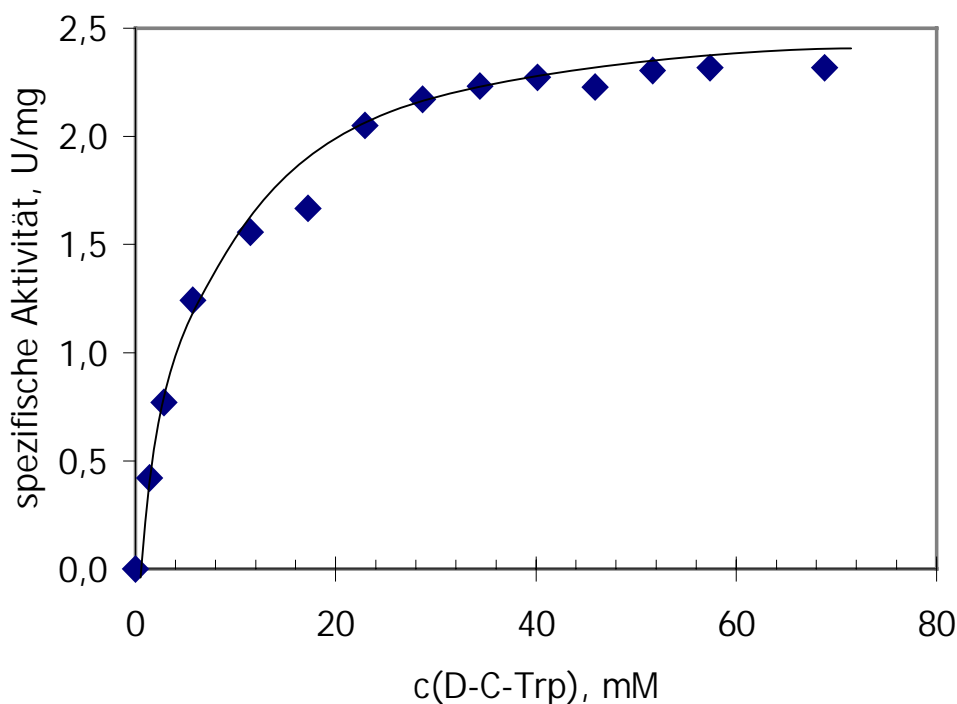


Abbildung 35: Bestimmung der kinetischen Parameter für D-Carbamoyl-Tryptophan

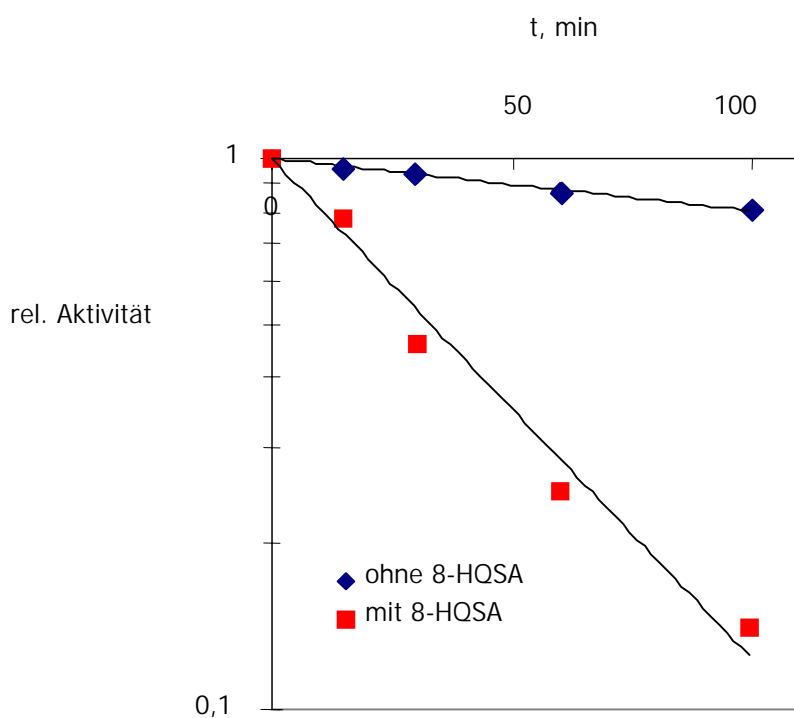
#### 7.1.3.5 Bestimmung des Molekulargewichtes

Die Bestimmung des Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen im SDS-Gel mit dem Programm Imagemaster (Amersham Life Sciences, Freiburg) ergab einen Wert von 34,6 kDa. Dieser Wert stimmt mit dem auf Basis der Aminosäuresequenz der D-Carbamoylase mit His-tag berechneten Wert (35,46 kDa) sehr gut überein. Um festzustellen, ob das Enzym im nativen Zustand im mono- oder oligomeren Zustand vorliegt, wurde mit dem homogen aufgereinigten His-tag-Enzym eine native Gelelektrophorese bei einer Acrylamidkonzentration von 7,5 % durchgeführt. Bei dieser Konzentration liegt der lineare Bereich der Auftrennung zwischen 16 und 91 kDa. Nach einer Kalibrierung des Gels mit dem Proteinmarker ProSieve wurde die Molekülgröße der D-Carbamoylase mit dem Programm

Imagemaster auf 75 kDa bestimmt. Demzufolge scheint das Enzym im nativen Zustand als Dimer vorzuliegen.

### 7.1.3.6 Cofaktorabhängigkeit

Bei einer Inkubation der aufgereinigten D-Carbamoylase bei 25 °C und in Gegenwart von 10 mM EDTA konnte keine Inaktivierung des Enzyms festgestellt werden. Allerdings konnte innerhalb von weniger als zwei Stunden eine vollständige Inhibierung des Enzyms beobachtet werden, wenn es mit 10 mM 8-Hydroxyquinolinsulfonsäure (8-HQSA) inkubiert wurde (siehe Abbildung 36). Um die Inaktivierung durch den Komplexbildner von der thermischen Inaktivierung unterscheiden zu können, wurde ein Aliquot der Enzymlösung ohne 8-HQSA mitinkubiert und die Aktivität über die Zeit verfolgt. Um das Enzym zu reaktivieren, musste die 8-HQSA durch Gelfiltration von dem Enzym entfernt, und in Gegenwart von 2 mM Metallionen inkubiert werden. Weder  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  noch  $\text{Zn}^{2+}$  führte jedoch zu einer Reaktivierung des Enzyms.




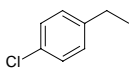
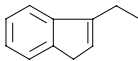
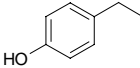
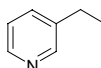



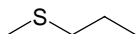
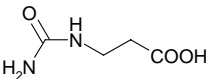
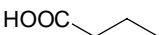
**Abbildung 36: Inaktivierung der D-Carbamoylase durch 8-HQSA**

Sulfhydrylreagenzien (Iodacetat, 2-Nitrobenzoat und *para*-Chlor-Quecksilberbenzoat), die dem Enzym in Konzentrationen von 1 mM zugesetzt wurden führten zu einer vollständigen Inaktivierung der D-Carbamoylase.

### 7.1.3.7 Substratspezifität

Zur Bestimmung des Substratspektrums inkubierte man das Enzym bei einer Reaktionstemperatur von 30 °C mit dem jeweiligen Substrat. Um eine gleich hohe Konzentration des D-Isomers zu gewährleisten, wurde bei Vorliegen des Substrates als Isomerengemisch eine Konzentration von 20 mM eingestellt; lag das Substrat als reines Isomer vor, wurde eine Konzentration von 10 mM eingestellt. D,L-Carbamoyl-Phenylalanin diente dabei als Referenzsubstrat und wurde bei der Berechnung der relativen Aktivitäten auf 100 % (entspricht 2 U/mg) gesetzt. Es wurden die in Tabelle 27 mit Strukturformeln dargestellten Carbamoylsubstrate mit den jeweiligen Aktivitäten umgesetzt. Die D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 ist in der Lage, Carbamoylverbindungen mit aliphatischen und mit aromatischen Resten umzusetzen, wobei letztgenannte schneller umgesetzt werden. Auffallend ist die deutliche Präferenz für das Substrat D-Carbamoyl-Alanin, das mindestens fünfmal besser umgesetzt wird als alle anderen Substrate. Als einziges achirales Substrat unter den getesteten Verbindungen wird Carbamoyl-Glycin mit ähnlichen Reaktionsraten umgesetzt wie die Carbamoyl-Aminosäuren mit aliphatischen Resten.

Tabelle 27: Strukturformeln, Abkürzungen und relative Umsätze der Substrate der D-Carbamoylase

Substrat	Strukturformel des Carbamoylrestes	Abkürzung	rel. Akt., %
D,L-Carbamoyl-Phenylalanin		D,L-C-Phe	100 %
D-Carbamoyl-Phenylalanin	siehe D,L-C-Phe	D-C-Phe	115 %
L-Carbamoyl-Phenylalanin	siehe D,L-C-Phe	L-C-Phe	0 %
D,L- <i>para</i> -Chlor-Carbamoyl-Phenylalanin		D,L- <i>p</i> -Cl-C-Phe	19 %
D-Carbamoyl-Tryptophan		D-C-Phe	80 %
D,L-Carbamoyl-Tyrosin		D,L-C-Tyr	63 %
D,L-Carbamoyl-Pyridylalanin		D-C-Pal	40 %
D-Carbamoyl-Alanin	$\text{H}_3\text{C}$ —	D,L-C-Ala	510 %
Carbamoyl-Glycin	H—	C-Gly	27 %
D,L-Carbamoyl-Valin		D,L-C-Val	31 %
D,L-Carbamoyl-Serin		D,L-C-Ser	35 %
D,L-Carbamoyl-tert-Leucin		D,L-C-tLeu	18 %
D,L-Carbamoyl-Methionin		D,L-C-Met	13 %
$\beta$ -Ureidopropionat <sup>6</sup>		$\beta$ -UP	0 %
$\beta$ -Ureidosuccinat		D,L-C-Asp	0 %

<sup>6</sup> beim  $\beta$ -Ureidopropionat liegt die komplette Strukturformel vor

Auch Aminosäuren mit unnatürlichen Resten, wie beispielsweise D,L-*para*-Chlor-Phenylalanin, D,L-Carbamoyl-*tert*-Leucin oder D,L-Carbamoyl-Pyridylalanin, können nach der Umsetzung der entsprechenden Substrate als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

Beim Vergleich der Umsetzung von D,L-, D- und L-Carbamoyl-Phenylalanin läßt sich erkennen, dass das Enzym für dieses Substrat enantiospezifisch ist und dass das racemische Gemisch reproduzierbar langsamer umgesetzt wird, als das reine D-Isomer. Somit scheint das L-Isomer bei Konzentrationen von 10 mM einen leichten inhibitorischen Effekt auf die Enzymkatalyse zu haben, da in den Ansätzen mit D- bzw. D,L-Carbamoyl-Phenylalanin die gleiche Konzentration des D-Isomers vorlag.

Auch andere reine L-Carbamoyl-Aminosäuren wie L-Carbamoyl-Valin oder L-Carbamoyl-Tryptophan wurden nicht umgesetzt.

Außerdem wurden  $\beta$ -Ureidopropionat und  $\beta$ -Ureidosuccinat (D,L-Carbamoyl-Aspartat) als mögliche physiologische Substrate getestet. Beide Verbindungen werden genauso wie *N*-Acetyl- und *N*-Formyl-Phenylalanin unter den gewählten Assaybedingungen nicht umgesetzt.

Weitere Substrate wurden in einem anderen Kontext in Abschnitt V-8 untersucht und sind somit in diesem Kapitel nicht mitaufgeführt.

## 7.2 L-Carbamoylase

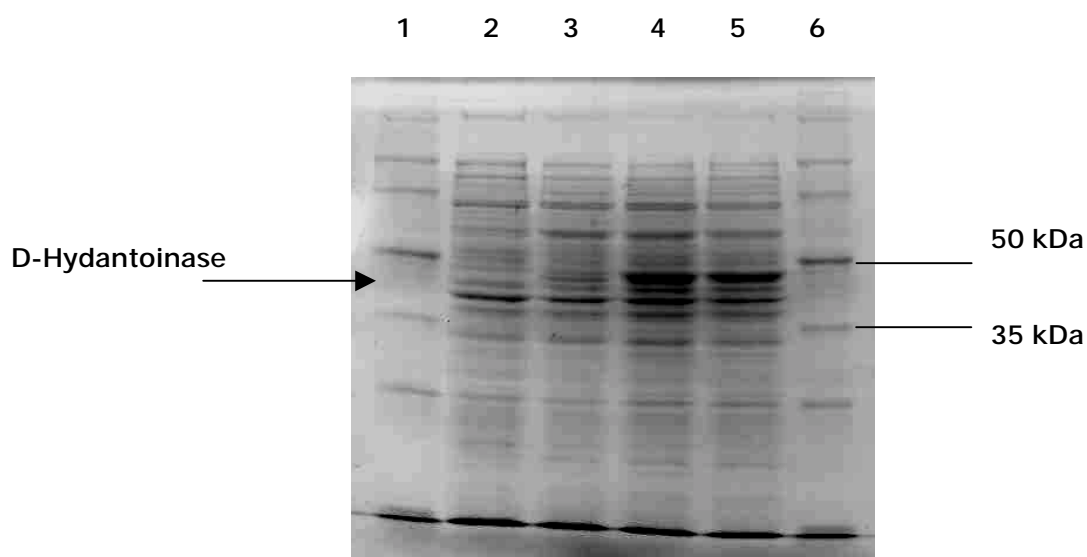
Upstream der D-Carbamoylase konnte ein offener Leserahmen identifiziert werden, der Homologien zu L-Carbamoylasen aus anderen Mikroorganismen aufweist. Darunter *Pseudomonas*, *Bacillus* und *Arthrobacter aurescens* (siehe Abbildung 40). Das Enzym besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 45,1 kDa und einen pI-Wert von 5,35. Diese Daten stimmen gut mit denen in der Literatur beschriebenen Daten von bekannten L-Carbamoylasen überein (siehe Abschnitt IV-6).

Das Strukturgen der L-Carbamoylase wurde in analoger Weise zur D-Carbamoylase in den Rhamnosevektor pJOE4036 kloniert. Allerdings erwies sich die Expression der L-Carbamoylase als problematisch, da das Protein nicht in einer aktiven Form bereitgestellt werden konnte. Nach der Analyse eines Ultraschallaufschlusses einer rhamnoseinduzierten Zellsuspension mittels SDS-PAGE zeigte sich, dass das gesamte Protein als unlösliches Produkt im Pellet vorlag.



### 7.3 D-Hydantoinase

Weil sich in dem Strukturgen für die D-Hydantoinase zwei *NdeI*-Schnittstellen in direkter Nachbarschaft befinden, konnte die bei der D- und L-Carbamoylase verfolgte *NdeI*/*BamHI*-Klonierungsstrategie in den Expressionsvektor pJOE4026 nicht durchgeführt werden. Stattdessen wurde die D-Hydantoinase mit den Primern K\_DHPn2 und K\_DHPc2 aus der genomischen DNA von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 amplifiziert und in den Expressionsvektor pJOE3078 kloniert. Der Primer DHPn2 enthält neben einer *BamHI*-Schnittstelle auch eine Sequenz für eine Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno), und der Primer K\_DHPc2 integriert eine *HindIII*-Schnittstelle und die Sequenz für einen Strep-tag (Aminosäuresequenz: WSHPOFEK), der eine schnelle Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Metallaffinitätschromatographie ermöglicht. Das entstandene Plasmid wurde als pMW10 bezeichnet. Um den Einfluss des Affinitäts-tags auf die Aktivität der D-Hydantoinase zu untersuchen, wurde der Klon pMW11 konstruiert, der statt des Affinitäts-tag ein Stop-Codon besitzt. Nachdem beide Plasmide in *Escherichia coli* JM109 transformiert worden waren, wurde eine Induktion mit Rhamnose durchgeführt. Bei beiden Klonen konnte die Expression der D-Hydantoinase eindeutig nachgewiesen werden.



**Abbildung 37:** 10 %-iges SDS-Gel der Induktion von *E. coli* JM109 pMW10; (1) und (6): Molekulargewichtsmarker Prosieve; (2) bis (5): Überstände nach 0, 4, 6 und 8 h Induktion

Zwar konnte eine Expression der D-Hydantoinase nachgewiesen werden, aber die Rohextrakte von pMW10 und pMW11 wiesen nach Ultraschallaufschluß nur Aktivitäten nahe der Nachweisgrenze auf. Auch ein Aufschluß mit dem Homogenisator konnte keine Aktivitätssteigerung bewirken. Die Supplementation der Metallionen  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  während des Wachstums, führte insbesondere bei den zuletzt genannten Zinkionen zu einer 10-fachen Steigerung der Aktivität. Trotzdem belief sich die spezifische Aktivität nur auf 2 mU/g Protein.

## 8 Vergleich des Reaktionsmechanismus von D-Carbamoylasen und L-Carbamoylasen

Über die natürliche Funktion und den Reaktionsmechanismus von D- und L-Carbamoylasen ist - trotz intensiver Forschungsbemühungen – bisher außer Mutmaßungen nur wenig bekannt. Ziel dieser Untersuchungen war es, mit rekombinant vorliegenden L- und D-*N*-Carbamoylasen unterschiedliche Derivate des D,L-*N*-Carbamoylphenylalanins zu testen, um so mehr über den Reaktionsmechanismus dieser Enzyme herauszufinden. Auf diese Weise könnten eventuell Vorhersagen über die Umsetzbarkeit von neuen Substraten getroffen, und Hinweise auf die physiologische Funktion von *N*-Carbamoylasen gewonnen werden.

Die in Abbildung 39 aufgeführten Substrate wurden als Derivate des *N*-Carbamoyl-Phenylalanins mit drei verschiedenen Carbamoylasen getestet. Lediglich das 3-Benzylbernsteinsäurehalbamid lag dabei nicht in Reinform, sondern als Gemisch mit 2-Benzylbernsteinsäurehalbmid vor (siehe Abbildung 39). Beide Substanzen lassen sich aber mittels HPLC-Analytik voneinander trennen, sodass die Substratabnahme bzw. Produktzunahme eindeutig zugeordnet werden können.



**Abbildung 38: D,L-3-BBHA (links) liegt als Gemisch mit D,L-2-BBHA (rechts) vor (Waniek, 2000)**

Die Substrate lassen sich, je nach der Position des ausgetauschten Atoms, in drei unterschiedliche Gruppen einteilen. Zusätzlich wurde  $\alpha$ -Methyl-*N*-Carbamoyl-Phenylalanin als  $\alpha$ -disubstituiertes Derivat getestet. Die Strukturformeln dieser Moleküle sind Abbildung 39 dargestellt.

Die Carbamoyl-Phenylalaninderivate wurden mit den folgenden Carbamoylasen getestet:

- D-Carbamoylase aus (JM109 pMHS347 *hyuC285* MS3.2; Mutante aus *Agrobacterium* sp. IP I-671; Hils, 1998)
- D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 (JM109 pMW1)
- L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 (JM109 pBW1; Wiese, 2000)

Alle drei Carbamoylasen lagen rekombinant im gleichen Expressionssystem vor, waren durch Rhamnose induzierbar und mit einem His-tag fusioniert. Die Ergebnisse der Umsetzungen sind in Tabelle 28 in Kurzform zusammengefaßt.

**Tabelle 28:** Tabellarische Darstellung der Umsetzungsversuche mit Carbamoyl-Phenylalaninderivaten; Substrate die umgesetzt wurden sind mit einem „+“ gekennzeichnet, solche, die nicht umgesetzt wurden mit einem „-“

Substrat	D-Carbamoylase <i>Agrobacterium</i> sp.	D-Carbamoylase <i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117	L-Carbamoylase <i>Arthrobacter</i> <i>aurescens</i>
Ac-Phe	-	-	-
F-Phe	-	-	+
3- <i>N</i> -Me-CPhe	-	-	-
C-PheM	-	-	-
C-PheA	-	-	-
<i>O</i> -C-PheL	+	-	-
BBHA	+	+	-
1- <i>N</i> -Me-CPhe	-	-	-
$\alpha$ -Me-CPhe	+	nicht getestet	nicht getestet

Beim Austausch der Carboxylatgruppe durch eine Carbamidgruppe (*N*-Carbamoyl-Phenylalaninamid; C-PheA) oder eine Esterverbindung (*N*-Carbamoyl-Phenylalaninmethylester; C-PheM) geht bei allen getesteten Carbamoylasen die Fähigkeit, *N*-Carbamoylverbindungen zu hydrolysieren, verloren; somit kommt der Carboxylatgruppe offenbar eine essentielle Rolle bei der Umsetzung dieser Verbindungen zu.

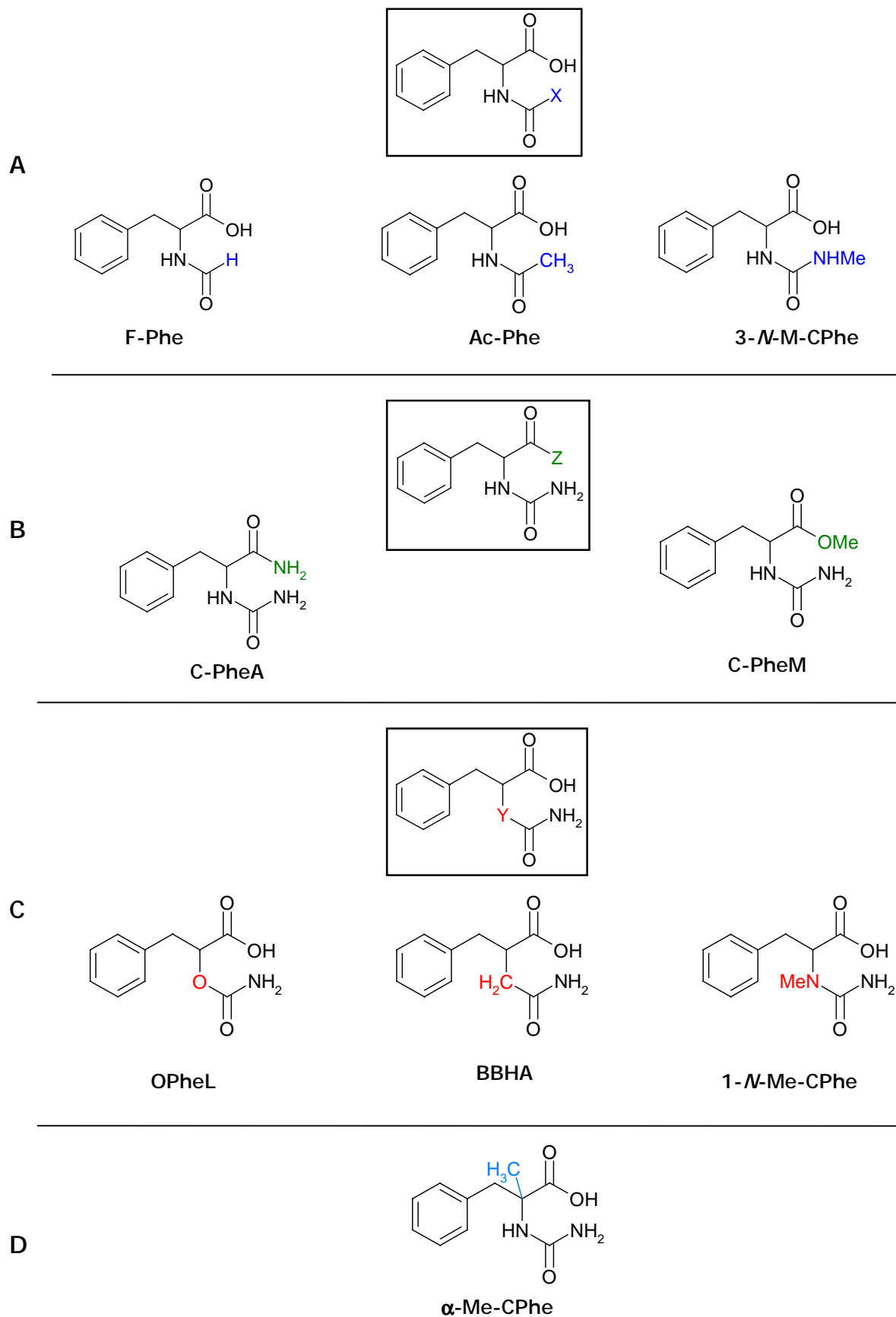


Abbildung 39: Strukturformeln und Abkürzungen der Carbamoylphenylalaninanaloga; A: Austausch des terminalen Stickstoffs; B: Austausch der Hydroxygruppe des Carboxylats; C: Austausch des Brücken-Stickstoffs der Carbamoylgruppe; D:  $\alpha$ -Methyl-Carbamoyl-Phenylalanin

Wird dagegen die Amino-Funktionalität des terminalen Stickstoffs verändert, so zeigen die D- und die L-Carbamoylase ein unterschiedliches Umsetzungsverhalten: Während die L-Carbamoylase lediglich die *N*-Formyl-Gruppe akzeptiert, wird von den beiden D-Carbamoylasen keines der Derivate (*N*-Formyl-Phenylalanin, *N*-Acetyl-Phenylalanin und 3-*N*-Methyl-Carbamoyl-Phenylalanin) mehr umgesetzt.

Die umgekehrte Situation liegt bei der Substitution oder Veränderung des Brücken-Stickstoffs vor. An dieser Position ist für die L-Carbamoylase bei keinem der Derivate Aktivität nachzuweisen, während die D-Carbamoylase aus *Agrobacterium* sowohl Kohlenstoff (Benzylbersteinsäurehalbamid; BBHA)<sup>7</sup> als auch Sauerstoff (Carbamoyl-Phenylmilchsäure; *O*-CPheL) anstelle des Stickstoffs in dieser Position akzeptiert. Die D-Carbamoylase aus *Arthrobacter* setzt das Benzylbersteinsäurehalbamid um<sup>6</sup>, während von beiden Enzymen das 1-*N*-Methyl-Carbamoyl-Phenylalanin (1-*N*-Me-CPhe) nicht hydrolysiert wird.

Bei Untersuchungen zur Enantioselektivität der genannten Reaktionen wurde festgestellt, dass sowohl die L-Carbamoylase als auch die D-Carbamoylasen strikt D- bzw. L-spezifisch sind und jeweils nur ein Isomer als Produkt nachgewiesen werden kann.

Da alle Assays qualitativ ausgelegt waren, ist für die spezifische Aktivität nur eine ungefähre Abschätzung möglich:

**Tabelle 29: Geschätzte spezifische Aktivitäten der umgesetzten Substrate; als Vergleich sind in der untersten Zeile die spezifischen Aktivitäten für D,L-Carbamoyl-Phenylalanin angegeben.**

Substrat	D-Carbamoylase <i>Agrobacterium</i> sp. IP I-671	D-Carbamoylase <i>Arthrobacter crystallopoietes</i>
BBHA	> 3,2 U/mg	0,05 U/mg
<i>O</i> -PheL	0,2 U/mg	-
D,L-C-Phe	3,8 U/mg	2,0 U/mg

---

<sup>7</sup> 2-BBHA wurde nicht umgesetzt

## IV Diskussion

### Einführung

Das Hydantoinase-Verfahren wird zur industriellen Herstellung von enantiomerenreinen Aminosäuren aus Hydantoinen eingesetzt (Grifantini et al., 1997). Dabei werden ganze Zellen sowohl als Wildtypstämme (Yamada et al., 1994) als auch rekombinante Systeme, bei denen die Gene für Hydantoinase und Carbamoylase heterolog oder homolog expremiert werden (Nanba et al., 1992), verwendet. In den Arbeiten von Möller (1986) wurde ein Screening nach neuen Hydantoin-verwertenden Mikroorganismen durchgeführt, bei dem D,L-Hydroxyxmethylhydantoin als einzige Kohlen- und Stickstoffquelle eingesetzt wurde. Eines der aus Boden- und Wasserproben erhaltenen Isolate, die das Substrat bis zur Aminosäure D-spezifisch umsetzten, wurde mit AM 2 bezeichnet. Nach einer anschließenden Klassifizierung wurde der fortan als *Arthrobacter crystallopoietes* AM 2 bezeichnete Mikroorganismus in der Arbeit von Brans (1991) näher untersucht und bezüglich der Kultivierung optimiert. Außerdem konnte aus diesem Stamm ein Enzym mit D-Carbamoylaseaktivität angereichert werden. Da diese Gattung für eine Umsetzung von Hydantoinderivaten als sehr geeignet erschien, wurde der ebenfalls aktive Stamm *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 in der Arbeit von Marin (1997) in Bezug auf die Hydantoinumsetzung untersucht. Dabei gelang es, die D-Hydantoinase daraus homogen aufzureinigen und die ersten 30 Aminosäuren des N-Terminus zu bestimmen. Eine chromatographische Aufreinigung der D-Carbamoylase schlug allerdings fehl, da dieses Enzym in sehr geringer Konzentration vorlag und es sich offenbar um ein extrem instabiles Enzym handelte. Diese Instabilität konnte auch in der vorliegenden Arbeit bei Versuchen mit dem Wildstamm bestätigt werden, so dass eine Klonierung der D-Carbamoylase nur über den Umweg der Klonierung der D-Hydantoinase möglich war. Hierbei wurde von der Hypothese der direkten Nachbarschaft der Strukturgene der D-Hydantoinase und D-Carbamoylase ausgegangen, wie sie bei anderen Stämmen beschrieben wurde (siehe Abschnitt I-2). Im Laufe der Arbeit konnte tatsächlich die Existenz eines *hyu*-Genclusters bestätigt und die Gensequenz des D-Carbamoylasestrukturgenes entschlüsselt werden. Anschließend erfolgte die Entschlüsselung der für *Arthrobacter crystallopoietes* so erstmals beschriebenen genetischen Organisation der am Hydantoin-Abbau beteiligten Gene. In dieser Arbeit wurde weiterhin die rekombinante Produktion der D-Carbamoylase in *Escherichia coli* ermöglicht. Das Genprodukt konnte bezüglich seiner Funktion als neuartige D-Carbamoylase charakterisiert werden. Dabei konnte insbesondere der Reaktionsmechanismus der D-Carbamoylase im Vergleich mit dem anderer D- und L-Carbamoylasen aufgeklärt werden. Die einzelnen angesprochenen Punkte sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

## 1 Ganzzellaktivitätstests

Ruhende Zellen werden im Hydantoinase-Verfahren zur industriellen Produktion von enantiomerenreinen D- und L-Aminosäuren eingesetzt (Dinelli et al., 1978; Nishida et al., 1987; Yokotzeki et al., 1987 und Drauz et al., 1991). Verwendet man ruhenden Zellen des Stammes *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 D,L-Benzylhydantoin um, so liegt nach der vollständigen Umsetzung des D-Benzylhydantoin nur noch L-Benzylhydantoin als Substrat vor, das entweder chemisch racemisiert, oder aber von einer Hydantoinracemase in das entsprechende D-Isomer umgesetzt wird. Die aus dem Graphen (siehe Abbildung 13) abgeleitete Halbwertszeit der Racemisierung des L-Isomers liegt mit ca. zehn Stunden höher als die Halbwertszeit der chemischen Racemisierung von fünf Stunden (siehe Tabelle 1). Für die Abnahme ist aber nicht nur die Racemisierungsgeschwindigkeit ausschlaggebend, sondern vor allem die Substratkonzentration in der Zelle. Nach sechs Stunden hat die Konzentration des D-Benzylhydantoin soweit abgenommen, dass nicht damit zu rechnen ist, dass die Racemase noch mit maximaler Reaktionsrate arbeitet. Zusätzlich kommt es während der Reaktionszeit auch zu einer Inaktivierung der beteiligten Enzyme. Somit kann aufgrund der Umsetzungskinetik keine eindeutige Entscheidung darüber gefällt werden, ob *A. crystallopoietes* eine Hydantoinracemase besitzt oder nicht. Wäre aber eine Racemase vorhanden, sollte diese - in Analogie zu den bisher beschriebenen *hyu*-Genclustern (siehe Abbildung 4) - mit großer Wahrscheinlichkeit in direkter Nachbarschaft der übrigen *hyu*-Gene zu finden sein.

Auch der Transport des Hydantoinderivates in die Zelle und der Export der Aminosäure in das Medium bleiben beim Ganzzellaktivitätstest unberücksichtigt.

Am Beispiel der schwer umsetzbaren Hydantoinderivate L-*allo*-Threoninhydantoin und D,L-Serinhydantoin, läßt sich der Einfluß der Substrat- und Biomassekonzentration bei den Ganzzellumsetzungen erkennen (Fritz, 2000). Beim L-Threoninhydantoin kommt erschwerend hinzu, dass das gesamte L-Substrat erst in die D-Form racemisieren muß. Eine Messung der Ganzzellaktivität ist für beide Verbindungen erst bei einer Substratkonzentration von 10 g/l möglich.

Allerdings lassen sich nicht immer Rückschlüsse von den Ganzzellumsetzungen auf die enzymatischen Eigenschaften der D-Hydantoinase und der D-Carbamoylase ziehen. Die Zelle ist eine Art „black-box“, bei der der Transport des Hydantoin ins Zellinnere und der Export der produzierten Aminosäure ins Medium unberücksichtigt bleiben. Somit lassen sich nur Tendenzen aus den Ergebnissen ableiten.

Sicher scheint jedoch, dass die D-Carbamoylase sowohl aromatische, als auch aliphatische D-Carbamoyl-Aminosäuren umsetzt.

## **2 Kultivierung von *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117**

Während der Kultivierung von *Arthrobacter crystallopoietes* konnte durch die Zufütterungsstrategie eine konstante Hydantoinkonzentration im Zellinneren gewährleistet werden. Allerdings waren im Vergleich zu den Arbeiten von Marin keine eindeutig erhöhten Aktivitäten messbar. Somit scheint Hydantoin als möglicher Induktor auszuschließen. Allerdings kommen auch andere Moleküle (5,6-Dihydrouracil, Uracil and 5,6-Dihydrothyminoder 5-Methylhydantoin und Hydroxymethylhydantoin; Syldatk et al., 1992) in Frage, wie sie bereits von Runser et al. (1993) beschrieben worden sind.

Weiterhin muss man beachten, dass bei der Anzucht ein halbsynthetisches Medium verwendet wurde, das zur Wachstumsoptimierung (Brans, 1991) auch Hefeextrakt beinhaltet. Hefeextrakt enthält aber auch Nukleotidderivate, die als Induktoren in Frage kommen könnten. Eine genauere Analyse dieser Fragestellung könnte durch die kontinuierliche Kultivierung auf Mineralmedien und folgende Pulseexperimente mit den entsprechenden Substanzen durchgeführt werden.

Deshalb muss das Wachstum auf definierten Mineralmedien stattfinden, um eindeutig induktive Effekte nachweisen zu können.

## **3 Aufreinigung der D-Hydantoinase**

Seit den frühen 50er Jahren ist bekannt, dass die induzierbare Dihydropyrimidinase (EC 3.5.2.2) eine wichtige Rolle im Pyrimidin-Metabolismus einnimmt und in der Natur sowohl in eukaryontischen als auch in prokaryontischen Organismen weit verbreitet ist (Bernheim et al., 1946; Eadie et al., 1949; Wallach et al., 1957; Akamatsu, 1960). Die Dihydropyrimidinase-Reaktion (siehe Abbildung 5) wurde als strikt D-spezifisch, jedoch mit einer großen Substratvariabilität beschrieben. Im Jahre 1975 veröffentlichten Cecere et al. die enzymatische Produktion von N-Carbamoyl-D-Aminosäuren aus chemisch synthetisierten D,L-5-monosubstituierten Hydantoinderivaten mit einer teilweise angereinigten Dihydropyrimidinase aus Kalbsleber und formulierten als erste die mögliche industrielle Bedeutung der „D-Hydantoinase“ für die Herstellung optisch aktiver D-Aminosäuren. Ende der 70er Jahre wurden zur industriellen Herstellung der Antibiotika-Seitenketten D-Phenylglycin und *p*-Hydroxy-D-Phenylglycin D-Hydantoinasen aus verschiedenen Mikroorganismen, wie *Pseudomonas*, *Agrobacterium* und *Bacillus* isoliert. Im Jahre 1993 konnten Runser und Meyer in diesem Zusammenhang erstmals eine D-Hydantoinase ohne Dihydropyrimidinaseaktivität beschreiben. Um weiterhin neue Hydantoinasen zu isolieren, kamen die Konti-Prozess-Kultivierung (Morin et al., 1993) oder Kolonie-Hybridisierungstests (LaPointe et al., 1994) zum Einsatz. Einen Überblick über die Isolierung und Charakterisierung anderer D-Hydantoinasen bietet Tabelle 30. Auch die D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 konnte von Marin aufgereinigt und charakterisiert werden und stimmt in ihren molekularen Eigenschaften mit den anderen bisher



beschrieben D-Hydantoinasen gut überein. Die Gensequenz der D-Carbamoylase aus diesem Organismus zu erhalten, war aufgrund der Instabilität dieses Enzymes (siehe I-2.2) nur über die Isolierung der D-Hydantoinase möglich. Zu Beginn der Arbeit standen keine Informationen auf DNA-Ebene zu Verfügung; lediglich die ersten 30 Aminosäuren des N-Terminus der D-Hydantoinase waren aus den Arbeiten von Marin (1997) bekannt. Somit bestand eine Möglichkeit darin, aus der vorhandenen Proteinsequenz der D-Hydantoinase degenerierte Sonden abzuleiten, das Strukturgen der Hydantoinase zu bestimmen und auf eine direkte Nachbarschaft der D-Carbamoylase in einem Gencluster zu spekulieren; solche Gencluster wurden bereits für andere Hydantoin-umsetzende Mikroorganismen beschrieben (siehe I-2). Allerdings blieben die ersten Versuche mit degenerierten Sonden, die sich aus der bekannten Proteinsequenz des N-Terminus der D-Hydantoinase ableiteten, erfolglos. Auch degenerierte PCRs mit Primern, die vom N-Terminus und konservierten Bereichen verschiedener D-Hydantoinasen abgeleitet wurden, führten nicht zum gewünschten Erfolg. Deshalb mussten zusätzliche Informationen zur Proteinsequenz der D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 gewonnen werden.

Dazu wurde das bestehende Aufreinigungsprotokoll von Marin derart modifiziert, dass die Hydantoinase soweit aufgereinigt werden konnte, dass beim Ausschneiden der Proteinbande aus einem SDS-Gel eine Kontamination mit anderen Proteinen ausgeschlossen werden konnte. Um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um die von Marin (1997) beschriebene Hydantoinase handelte, wurden nach einem Western-Blot die ersten acht N-terminalen Aminosäuren bestimmt. Mit Ausnahme von Position zwei des N-Terminus stimmten alle Aminosäuren überein (Prolin anstelle von Aspartat); der in dieser Arbeit bestimmte N-Terminus (mit Aspartat an Position zwei; siehe Tabelle 31) wurde nach dem Vorliegen der DNA-Sequenz des Hydantoinasgens bestätigt.

Nach der Aufreinigung sollte ein proteolytischer Verdau der Hydantoinase durchgeführt werden. Dafür kamen entweder das Extrahieren der D-Hydantoinase aus dem SDS-Gel oder der Verdau des gebloteten Proteins auf der PVDF-Membran in Betracht. Beide Methoden waren mit so hohen Ausbeuteverlusten verbunden (Stone et al, 1989 und John et al., 1994), dass eine dritte Methode herangezogen wurde. Dabei wird das Protein *in situ* im SDS-Gel mit Trypsin proteolytisch verdaut. Diese Methode hat den Vorteil, dass sich die im Gel entstandenen Peptide leichter aus der Polyacrylamidmatrix eluieren lassen als ein unverdautes Protein (Walker, 1994).

Nachdem die Peptide durch quantitative HPLC in Fraktionen voneinander getrennt worden waren, wurde deren Proteinsequenz bestimmt. In Tabelle 31 sind noch einmal die erhaltenen Peptidsequenzen aufgeführt, wobei die Aminosäuren, die durch die später erhaltene DNA-Sequenz der D-Hydantoinase bestätigt wurden, unterstrichen sind (die aus der Nukleinsäuresequenz abgeleiteten Aminosäuren sind bei Abweichungen in Klammern angegeben).

Tabelle 30: Aufreinigung und charakteristische Eigenschaften von mikrobiellen D- und L-Hydantoinasen

Quelle	<i>Bacillus stearotherm.</i> SD-1	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Blastobacter</i> sp. A17p-4	<i>Agrobacterium</i> sp. IP-I 671	<i>Arthrobacter</i> <i>crystallopoietes</i> DSM 20117	<i>Arthrobacter</i> <i>aureus</i> DSM 3745	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>striata</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. AJ 11220
Referenz	Lee et al., 1995 und 1997	Luksa et al, 1997	Ogawa et al., 1995	Runser et al., 1993	Marin (1997)	May et al., 1996 - 1998	Morin et al., 1986	Takahashi et al., 1978	Yokozeiki et al., 19987
Induktor	Hydantoin	Methylthio- ethyl- hydantoin	Uracil	Uracil	Dihydrouracil, Hydantoin und D,L- 5-monosubstituierte Hydantoin	N-3-Methyl-D,L- 5- Indolylmethyl- hydantoin		Hydantoin	5-Cyano-Ethyl- Hydantoin
Aufreinigung	Ammoniumsulfat- Fällung, Q-Sephadex, Hitze fällung HIC (Phenyl- sepharose, präparative Elektrophorese)	Hitze fällung, Sephadex G- 50, DEAE- cellulose, HIC (Phenyl- sepharose), Fractogel	DEAE-Sephacel, HIC (Phenyl- sepharose), SEC (Sephacryl S-200 HR), Mono Q and superose-12	Protamin- und ammoniumsulfat- Fällung, Hitze fällung, IEX (DEAE- Sephadex und Trisacyl, HIC (Octyl-Sephadex)	Protamin- und ammoniumsulfat- Fällung, IEX (DEAE- Cellulose), HIC (Phenylsepharose), Mono Q, Gelfiltration	DEAE- Streamline, HIC (Phenyl- sepharose), Mono Q	HIC (Phenyl- sepharose), SEC (Sephacryl S-400) und präparative Elektrophorese	Protamin- und ammoniumsulfat- Fällung, IEX (DEAE-cellulose), Hydroxylapatit- und SEC (Sephadex G 200), Kristallisierung	Ionen austausch- chromatographie (DEAE- Toyopearl)
Ausbeute, %	1.5	12.4	3	9	5	77	1	3	63
Aufreinigung -faktor	50	243	30	965	20	52.6	0.53	300	27
Reinheit	homogen	homogen	homogen	homogen	homogen	homogen	homogen	homogen	angereichert
Temperatur- optimum	65 °C	75 °C	60 °C	60 °C	50 - 60 °C	50 °C	55 °C	45 - 55 °C	55 °C
Temperatur- Stabilität	< 60 °C	< 60 °C	< 60 °C	< 70 °C	< 50 °C		< 40 °C	< 60 °C	
pH-Optimum	8.0	8.0 - 10.0	10.0	10.0	8.2-9.2	8.8 - 9.3	9.0	8.0 - 9.0	8.0
PH-Stabilität	5.5 - 11.0	8.5 - 9.5	5.0-10.0	7.5 - 10.5	6.5		5.5-8.5	6.0 - 7.0	
Metallionen	Mn <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> erhöhen die Enzym- aktivität	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> erhöhen die Enzymaktivität	Ni <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	10 mol Zn <sup>2+</sup> pro mol aktiven Enzyms, aber Mn <sup>2+</sup> und Co <sup>2+</sup> erhöhen die Enzymaktivität	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>	
Unter- einheiten	2 x 54.000 Da	4 x 53 kDa	4 x 53 kDa	4 x 62 kDa	4 x 60 kDa	4 x 50 kDa	4 x 60 kDa	190 kDa	

Tabelle 31: Peptidsequenzen nach dem tryptischen Verdau der D-Hydantoinase

Peptidbezeichnung	Sequenz
N-Terminus nach Western-Blot	<u>MDAKLLVG</u>
36.06	<u>GEYVGTR</u>
62.76	<u>VGMLDAE(A)TPDIVER</u>
61.61	<u>LVMYETGVAEGK</u>
64.62	<u>APGSDADFFMM(IIVV)DP</u>
73.31	<u>QNMDYTLFEGFK</u>
73.93	<u>GINTGAVSVSSDHCPFF(C)FEEK</u>
77.53	<u>AL(E)VI(P)LYFV</u>
79.37	<u>GQ(S)LMINDGELFDILK</u>
82.15	<u>VMPGGIDVHTHIDSPLMGTT</u>

Bei genauerer Analyse basieren die Abweichungen mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf Sequenzierungsfehler bei der Analyse der DNA, sondern auf schwer auswertbaren Chromatogrammen bei der Sequenzierung der Peptide. Insbesondere dann, wenn Signale durch zwei gleiche, aufeinanderfolgende Aminosäuren verstärkt werden (Bsp. 64.62) oder die Aminosäuren im Standard-Elutionsprofil direkt hintereinander liegen (Bsp. 79.37).

Die Sequenzierung von Proteinen ist mit wesentlich mehr Fehlerquellen behaftet als die von DNA. Aus diesem Grund wurde bei der Festlegung der Proteinsequenz der D-Hydantoinase die Nukleotidsequenz und nicht die Peptidsequenzen berücksichtigt.

#### 4 Expression der D-Carbamoylase

Normalerweise wird das Startcodon durch das Basentriplett *atg* festgelegt. In einigen Fällen kann die Translationsinitiation allerdings auch von den Codons *gtg* oder *ttg* übernommen werden, wobei deren Wahrscheinlichkeit in *Escherichia coli* nur bei 8 bzw. 1 % liegt (Hannig et al., 1998). Auch wenn bisher für GC-reiche Organismen wie *Arthrobacter* oder Streptomycceten noch keine statistischen Daten für die Häufigkeitsverteilung von Startcodons vorliegt, sollte die Wahrscheinlichkeit für ein *ttg*-Startcodon in diesen Mikroorganismen noch niedriger sein, als im AT-reichen *Escherichia coli*.

Bei der Suche nach offenen Leserahmen für die D-Carbamoylase aus dem *hyu*-Gencluster kamen zwei Basentriplets als Startcodon in Betracht: ein *gtg*- und ein *ttg*-Startcodon. Allerdings konnte nur mit der *ttg*-Variante Expression und Aktivität des rekombinanten Proteins in *Escherichia coli* nachgewiesen werden; dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass vermutlich auch im Wildtyp die *ttg*-Variante den Translationsstart determiniert.

Weiterhin ist bei einem Alignment der um fünf Aminosäuren längeren „*ttg*“-D-Carbamoylase mit den bisher bekannten N-Termini von D-Carbamoylasen zu erkennen, dass bereits im Anfangsbereich dieser ersten fünf Aminosäuren Homologien zu den anderen D-Carbamoylasen vorliegen (siehe Abbildung 26).

Ein weiteres Argument für ein *ttg*-Startcodon im Wildtyp ergibt sich bei der Betrachtung der potentiellen Shine-Dalgarno-Sequenz AGGA. Diese liegt mit 7 Basenpaaren Distanz zum *ttg*-Startcodon im üblichen Bereich<sup>8</sup>, während das *gtg*-Startcodon einen Abstand von 22 bp aufweist.

Auch wenn in *Arthrobacter sp.* und anderen GC-reichen Species wie den Streptomycceten bisher nur *gtg*-Triplets als seltene Startcodons beschrieben worden sind (*hyuH*, *hyuC* beide *Arthrobacter aurescens* DSM 3747, Wiese, 2000 + andere Species), scheinen die geschilderten Fakten auf einen *ttg*-Start für die Translationsinitiation hinzuweisen.

Somit konnte erstmals ein *ttg*-Startcodon für ein Strukturgen in einem GC-reichen Organismus beschrieben werden. Einen endgültigen Beweis kann allerdings erst eine N-terminale Sequenzierung der aus dem Wildtyp aufgereinigten D-Carbamoylase erbringen.

Die D-Carbamoylase konnte mit einer geringen Tendenz zur inclusion body-Bildung und mit einem zufriedenstellenden Anteil von 30 % des Gesamtproteins in *Escherichia coli* expremiert werden.

---

<sup>8</sup> in *Escherichia coli* variiert der Abstand zwischen der Ribosomenbindestelle (RBS) und Startcodon von fünf bis dreizehn Nukleotiden und beeinflusst die Translationseffizienz (Makrides, 1996)





Tabelle 33: Aufreinigungsprotokolle und charakteristische Eigenschaften von mikrobiellen D-N-Carbamoylasen

Source	<i>Agrobacterium radiobacter</i> NRRL B11291	<i>Agrobacterium</i> sp. KNK712 (nach Expression in <i>E. coli</i> )	<i>Agrobacterium</i> sp. (BEECHAM-strain)	<i>Clostridium uracilicum</i>	<i>Comamonas</i> sp. E 222c	<i>Blastobacter</i> sp. A17p-4	<i>Pseudomonas</i> sp. AJ-11220	<i>Pseudomonas putida</i> 77	<i>Arthrobacter cryst.</i> DSM 20117
Referenz	Olivieri et al., 1979; Grifantini et al., 1996	Nanba et al., 1998	Louwrier et al., 1996	Campbell et al., 1958	Ogawa et al., 1993	Ogawa et al., 1994	Yokozeiki et al., 1987	Kim et al., 1986	
Induktor	N-Carbamoyl-D-Phenylglycin	Harnstoff, N-Carbamoyl-Phenylglycin, N-Carbamoyl-p-OH-Phenylglycin (für Wildtyp)	keine Angaben	N-Carbamoyl-β-Alanin	N-Carbamoyl-β-Alanine	Uracil	5-Cyanoethylhydantoin	1-Methylhydantoin	keine Angaben
Aufreinigung	Q-Sepharose FF, Chelat-Sepharose, Superose 12 (für rekombinantes Enzym)	Hitzefällung, HIC (Phenylsepharose), Ammoniumsulfat-Fällung, DEAE-Sepharose (für rekombinantes Enzym)	keine	MnCl <sub>2</sub> , Ammoniumsulfat- und Aceton-Fällung, Hydroxylapatit-Chromatographie	Ammoniumsulfat-Fällung, IEX (DEAE-Sepharose), HIC (Phenylsepharose)	Ammoniumsulfat-Fällung, DEAE-Sepharose, HIC (Phenylsepharose), Sephadex G150, MonoQ	IEX (DEAE Toyopearl)	Ammoniumsulfat-Fällung, IEX (DEAE-Cellulose), Kristallisation	Aufreinigung Mit His-tag
Ausbeute, %	34 (für rekombinantes Enzym)	12.3 (für rekombinantes Enzym)	geklärter Rohextrakt	18	36	2.3	36	63.2	
Aufreinigungsfaktor	20 (für rekombinantes Enzym)	3.9 (für rekombinantes Enzym)	geklärter Rohextrakt		119	37	17	27.4	
Reinheit		homogen	geklärter Rohextrakt	Rohextrakt	homogen	homogen	Rohextrakt	homogen	homogen
Temperatur-optimum	60 °C	65 °C	52 °C	30 – 35 °C	40 °C	55 °C	55 °C	37 °C	30 °C
Temperatur-Stabilität	< 40 °C	< 55 °C		< 45 °C	< 40 °C	< 50 °C		< 40 °C	< 30 °C
pH-Optimum	7.0	7.0	7.4 – 7.6	7.4 - 7.8	8.0 - 9.0	8.0 – 9.0	7.0	7.0 – 8.0	8.0
pH-Stabilität	7.0 - 9.0	7.0 – 9.0	6.2 – 9.0		6.5 - 9.5	6.0 - 9.0		6.0 – 7.0	7.5 – 8.5
Metallionen	keine	keine Angaben	keine	keine	keine	keine Angaben	keine Angaben	keine Angaben	keine
Untereinheiten	2 x 34 kDa	34 kDa (errechnet)	keine Angaben	keine Angaben	3 x 40 kDa	3 x 40 kDa	keine Angaben	4 x 27 kDa	2 x 34 kDa

Die D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 besitzt wie die anderen bisher bekannten D-Carbamoylasen ebenfalls ein breites Substratspektrum, kennzeichnet sich aber durch die hohe Präferenz für D-Carbamoyl-Alanin aus (siehe Tabelle 32), die in dieser Art erstmals in der Literatur beschrieben werden konnte.

Die Sonderstellung der D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 wird zusätzlich durch den niedrigen Wert der maximalen Aminosäure-Identität von 53 % zu den bisher beschriebenen D-Carbamoylasen unterstrichen. Somit konnte in dieser Arbeit eine neuartige D-Carbamoylase kloniert und als aktives Protein in *Escherichia coli* expremiert werden.

## **6 L-Carbamoylase**

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein hyu-Gencluster beschrieben werden, auf dem sowohl ein offener Leserahmen für eine D- und eine L-Carbamoylase enthalten sind. Ob es sich allerdings bei dem Leserahmen, der Homologien zu L-Carbamoylasen aufweist, tatsächlich um das entsprechende Enzym handelt, konnte noch nicht geklärt werden, da die L-Carbamoylase nach der Induktion mit Rhamnose vollständig als unlösliche Proteinfraction vorlag. Mögliche Ansatzpunkte zur löslichen Expression des Proteins könnten das Herabsetzen der Kultivierungstemperatur während der Induktion, die Fusion mit einem lösungsvermittelnden Protein (z.B. Maltose-bindendes-Protein) oder die Koexpression mit Chaperones sein. Die Länge des Leserahmens korreliert gut mit der anderer, bisher beschriebener L-Carbamoylasen, wie denen aus *Pseudomonas* sp. N671, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus halodurans*, *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 (Abbildung 40).

Das Vorliegen von L- und D-Carbamoylase könnte bei Ganzzellumsetzungen mit dem Wildtyp Stamm *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 zu einer unselektiven Umsetzung bestimmter Substrate führen. Dies veranschaulicht einen weiteren Vorteil, wenn die für die Umsetzung verantwortlichen Enzyme, wie im Falle der D-Carbamoylase, auch in rekombinanter Form zugänglich sind.





## 7 D-Hydantoinase

Nachdem die DNA-Sequenz der Hydantoinase bestimmt worden war, wurde der Versuch unternommen das Enzym auch rekombinant in *Escherichia coli* zu exprimieren. Obwohl das Enzym mit guter Löslichkeit im Rhamnoseexpressionssystem produziert wurde, konnten nur marginale Aktivitäten für die D-Hydantoinase festgestellt werden. Da der N-Terminus durch Sequenzierung bestätigt worden ist, könnte der C-Terminus der D-Hydantoinase zu kurz bestimmt worden sein. Von Kim et al., wird postuliert, dass der C-Terminus der Hydantoinasen zwar keine katalytisch essentielle Funktion übernimmt, aber für die intermolekulare Bindung der Untereinheiten verantwortlich sein könnte (Kim et al., 1998). Eine weitere Möglichkeit die Aktivität der Hydantoinase zu erhöhen, bestünde darin bereits während der Anzucht und im Aktivitätsassay zweiwertige Ionen wie  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  oder  $Co^{2+}$  zu supplementieren.

## 8 Hydantoinpermease und hypothetisches Regulatorgen

Da die Sequenzen von *hyuP* und *orf1* noch nicht vollständig vorliegen, kann nicht mit absoluter Sicherheit gesagt werden, ob es sich bei diesen offenen Leserahmen tatsächlich um Gene handelt, die für eine solche Permease bzw. für einen Regulator codieren. Eine Homologierecherche der bisherigen Sequenz von *hyuP* zeigt, dass diese zu 28 % mit einer Allantoin-Permease aus *Escherichia coli* (Blattner et al., 1997) und zu 29 % mit einem hypothetischen, 54 kDa großen Protein aus *Bacillus subtilis* (Glaser et al., direct submission 1996) identisch ist.

Der bislang bekannte Sequenzbereich von *orf1* ist zu 35 % identisch mit einem Transkriptionsregulator-Protein aus der *lacI*-Familie von *Streptomyces coelicolor* (Redenbach et al., 1996) und zu 32 % identisch mit demselben Protein aus *Vibrio cholerae* (Heidelberg et al., 2000).

Sollte Bedarf an der gesamten Sequenz der Permease bestehen, so könnte durch eine weitere IPCR der Leserahmen vervollständigt werden. Ein mögliche Anwendung für eine Permease bestünde darin, die Toluolisierung bei der Permeabilisierung des Ganzzellkatalysators zu ersetzen. Der Transport der Hydantoinderivate vom extrazellulären Raum in das Cytosol der Zelle kann einen großen Einfluss auf die Effizienz der Gesamtzellumsetzung haben. Gerade weil viele Hydantoinderivate nur in geringen Konzentrationen löslich sind spielt dies eine wichtige Rolle.

Allerdings erweist sich die heterologe Expression von Membranproteinen und der Nachweis von des aktiven Transportvorganges oft als äußerst problematisch.

Sollte es sich bei *orf1* um einen Regulatorprotein handeln, so kann nicht davon ausgegangen werden, dass dieser für die Regulation des *hyu*-Genclusters verantwortlich ist (Wiese, 1999). Wäre dies trotzdem der Fall, dann könnte das *hyu*-Regulationssystem auch als Expressionssystem rekombinanter Proteine dienen. Insbesondere in Kombination mit *N*-3-M-IMH (*N*-3-Methyl-D,L-5'-

Indolymethylhydantoin), das als Induktor nicht verstoffwechselt werden kann (Syldatk et al., 1992), könnte dieses Expressionssystem gegenüber etablierten Plasmiden konkurrenzfähig machen. Diese Eigenschaft könnte gerade bei großvolumigen Hochzelldichtefermentationen genutzt werden, weil hier das Nachfüttern eines Induktors auch finanzielle Auswirkungen auf die Gesamtkosten eines Prozesses haben kann.

## 9 Der Reaktionsmechanismus der D- und L-Carbamoylasen

Die L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens*, die D-Carbamoylasen aus *Agrobacterium* sp. IP I-671 und die in dieser Arbeit detailliert untersuchte D-Carbamoylase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 besitzen bezüglich des 5'-substituierten Restes ein mehr oder minder breite Substratspezifität, die eingehend untersucht wurde (siehe I-2.2 und I-2.3). Erstmals in der Literatur wurde hier die Rolle der übrigen Positionen bei der Umsetzung des *N*-Carbamoyl-Phenylalanin systematisch untersucht, indem einzelne Positionen dieses Moleküls gegen andere Atome oder funktionelle Gruppen ausgetauscht wurden, während der Rest des Moleküls unverändert blieb.

Zwischen den beiden Carbamoylasen sind bereits einige Unterschiede beschrieben worden. So ist die D-Carbamoylase durch Ammoniumionen hemmbar, während bei L-Carbamoylasen solch eine Produktinhibierung noch nicht beschrieben worden ist.

Aus phylogenetischer Sicht gehören beide Enzyme unterschiedlichen Proteinfamilien an. So besitzen aufgrund der Sequenzdaten D-Carbamoylasen Gemeinsamkeiten mit Amidasen,  $\beta$ -Alaninsynthetasen und Nitrilasen, während L-Carbamoylasen offenbar eine Verwandtschaft zu L-Carbamoyl-Cystein-Aminoacylasen, Allantoicasen<sup>9</sup> und auch zu  $\beta$ -Alaninsynthetasen aufweisen (siehe I-2.3 und Abbildung 46). Aufgrund dieser Zusammenhänge wurden für beide Enzyme unterschiedliche Reaktionsmechanismen postuliert (siehe Abbildung 41).

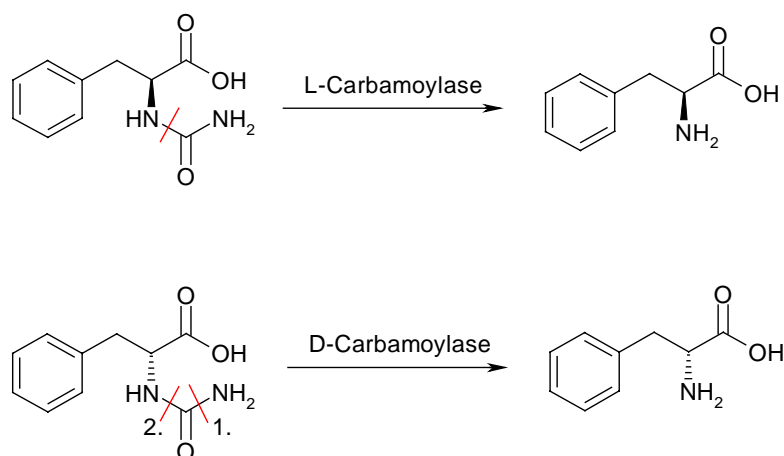
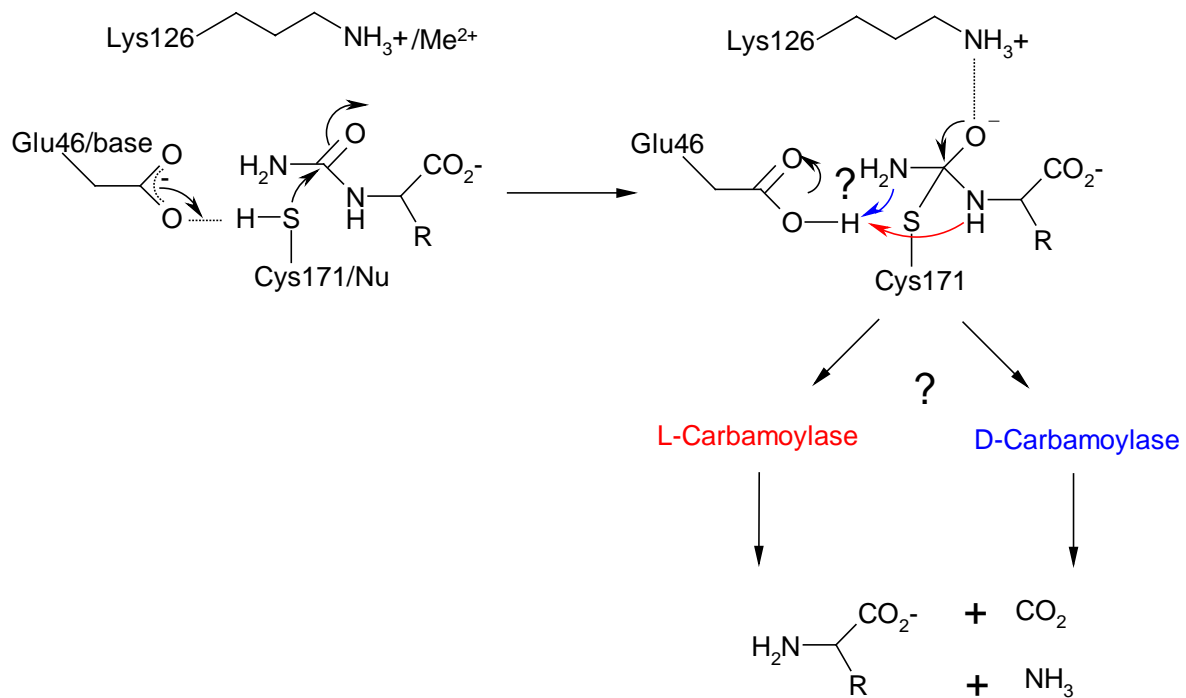


Abbildung 41: Postulierte Reaktionsmechanismen bei D- und L-Carbamoylase

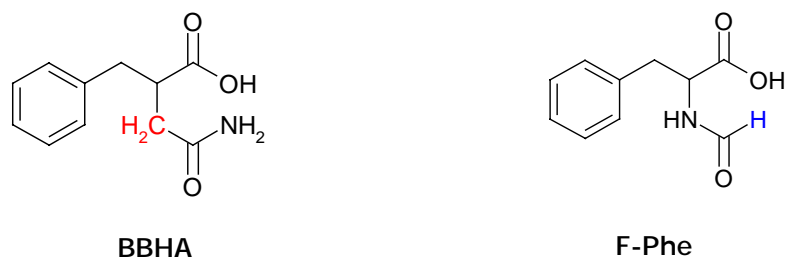
<sup>9</sup> Allantoicasen katalysieren im Purinabbau die Umsetzung von Allantoinsäure zur Ureidoglykolat und Harnstoff



**Abbildung 42: Mögliche Reaktionsmechanismen bei der Decarbamoylierung durch D- und L-Carbamoylase; die Beschreibung der katalytischen Triade von Lys126, Glu46 und Cys171 geht auf Nakai et al. (2000) zurück**

Danach sollte es sich bei der L-Carbamoylase um eine „echte“ Carbamoylase handeln, die den kompletten Carbamoylrest hydrolysiert, während die D-Carbamoylase möglicherweise als Amidase fungiert: In einem ersten enzymatischen Schritt wird die terminale Aminogruppe des Carbamoylrestes zur Hydroxylgruppe umgesetzt und das gebildete, chemisch instabile Produkt (*N*-Carboxyl-Phenylalanin) zerfällt in die D-Aminosäure, Kohlendioxid und Ammoniak. Bisher konnte aber noch kein Beweis für diesen Reaktionsmechanismus erbracht werden, da das nur kurzzeitig auftretende Zwischenprodukt bisher weder direkt noch indirekt nachgewiesen konnte. Auch die vor kurzem aufgeklärte 3-D-Struktur der D-Carbamoylase aus *Agrobacterium* sp. KNK 712 (Nakai et al., 2000) verstärkte zwar die Hinweise auf einen Amidasemechanismus, konnte aber eine „echte“ Carbamoylasereaktion, bei der der nukleophile Angriff zwischen dem Brücken-Stickstoff und dem Kohlenstoff der Carbamoylgruppe erfolgt, nicht endgültig ausschliessen (siehe Abbildung 42 roter, unterer Pfeil).

Mit Hilfe der beiden Schlüsselsubstrate Benzylbernsteinsäurehalbamid (2-BBHA) und *N*-Formyl-Phenylalanin konnte bewiesen werden, dass sich die D- und die L-Carbamoylase in ihrem Reaktionsmechanismus tatsächlich voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 44).



**Abbildung 43: Schlüsselsubstrate bei der Aufklärung des Reaktionsmechanismus von D- und L-Carbamoylase; links Benzylbernsteinsäurehalbamid; rechts *N*-Formyl-Phenylalanin**

Beim Benzylbernsteinsäurehalbamid kann aufgrund der Substitution des Stickstoffs durch eine Methylengruppe die Carbamoylgruppe nicht mehr abgespalten werden. Eine „echte“ Carbamoylase könnte also eine solche Verbindung nicht hydrolisieren, während eine Carbamoylase, deren Aktivität auf einem Amidasemechanismus beruht, das BBHA zu Benzylbernsteinsäure umsetzt. Dieses Produkt ist im Gegensatz zum *N*-Carboxyl-Phenylalanin chemisch stabil und kann als Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

## 9.1 Reaktionsmechanismus der D-Carbamoylase

Da die verwendeten D-Carbamoylasen aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 und *Agrobacterium* sp. IP I-671 kein *N*-Formyl-Carbamoylphenylalanin, wohl aber das Benzylbernsteinsäurehalbamid umsetzen können, muß es sich bei dem Enzym um eine Amidase handeln. Somit konnte der von Nakai et al. (2000) postulierte Reaktionsmechanismus der D-Carbamoylase durch die Ergebnisse dieser Arbeit experimentell bestätigt werden (siehe Abbildung 44).

Es handelt sich bei der D-Carbamoylase also um eine hochspezialisierte, enantio- und regiospezifische Amidase. Daher ist die Bezeichnung D-*N*-Carbamoyl-Amidohydrolase dem systematischen Begriff „D-Carbamoylase“ vorzuziehen.

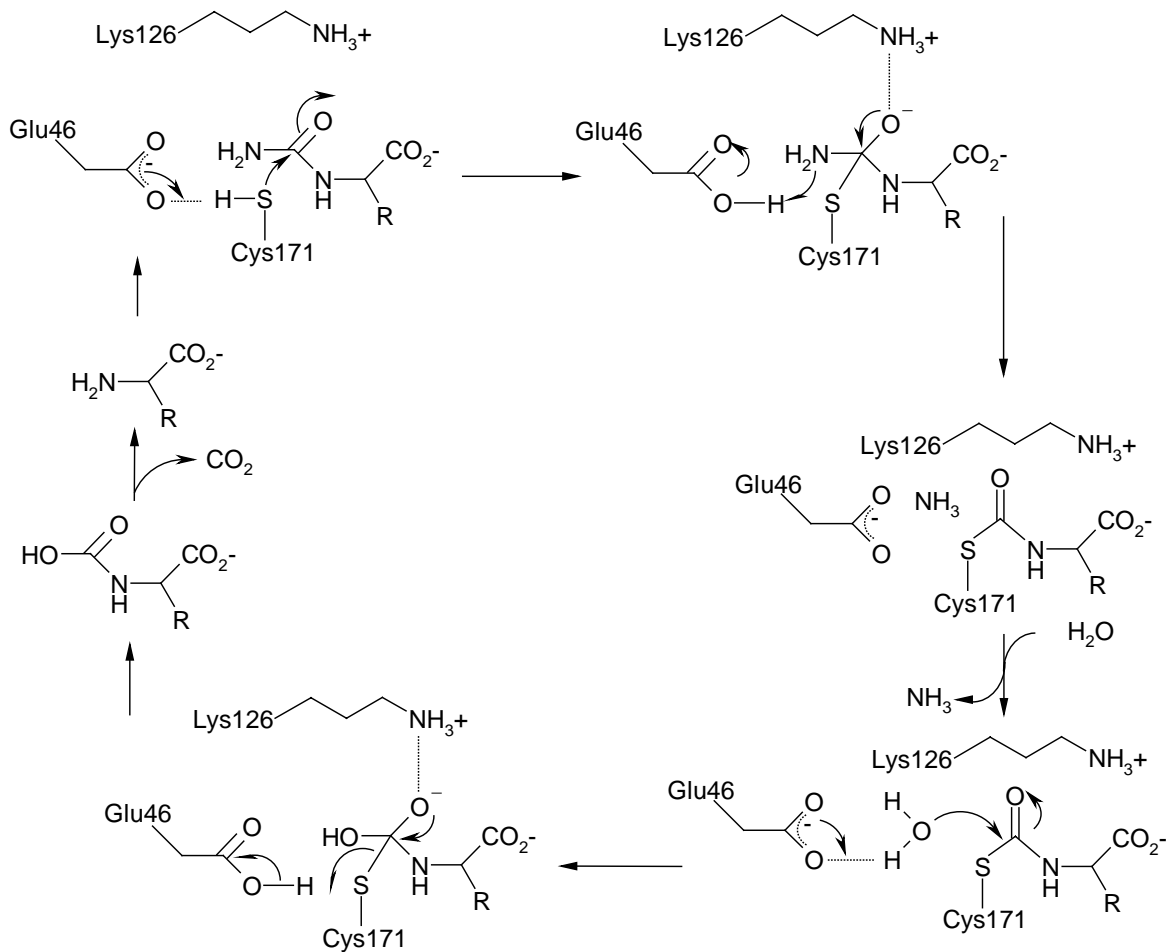
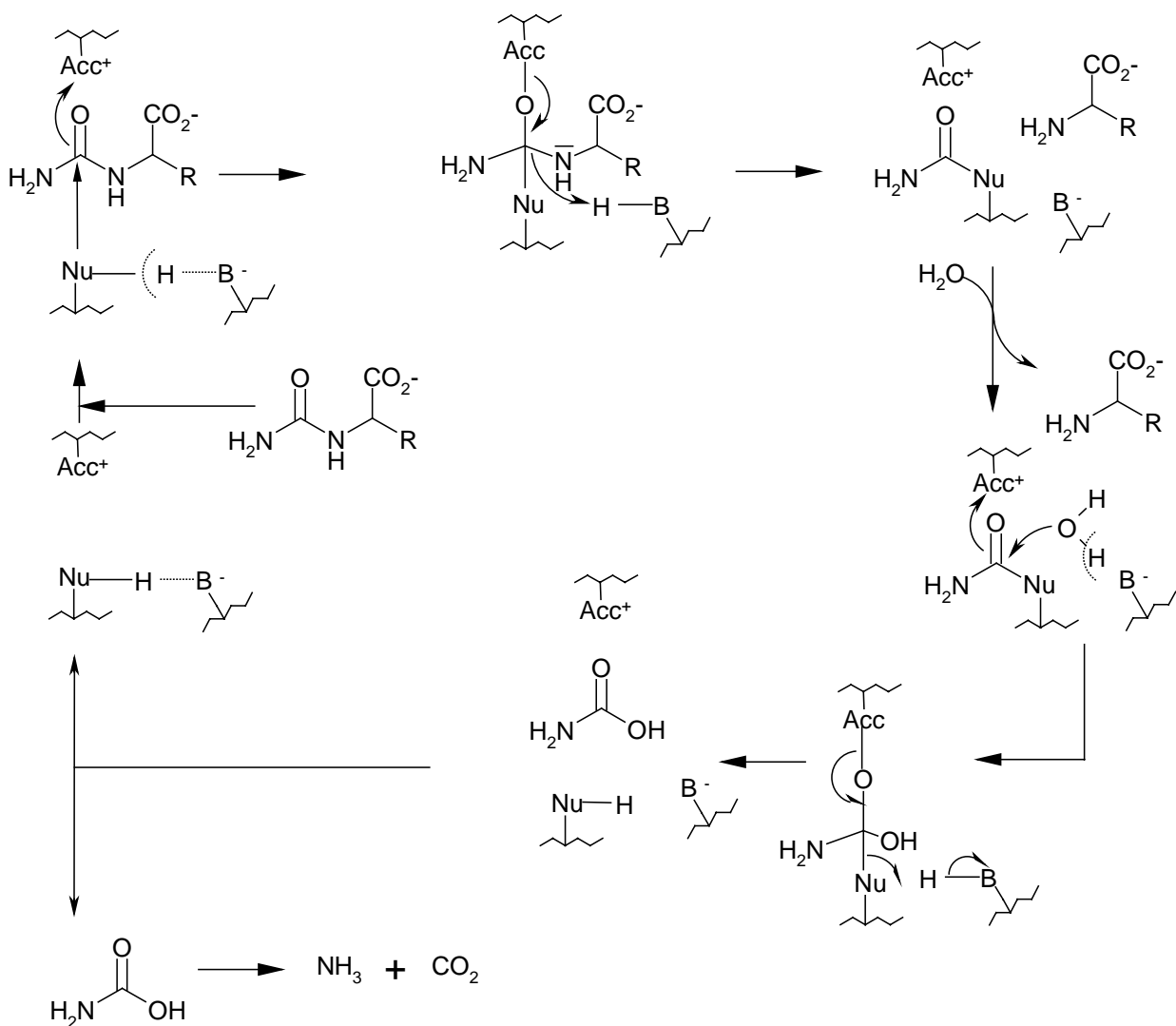


Abbildung 44: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der D-Carbamoylase aus *Agrobacterium* sp. KNK671 (nach Nakai et al., 2000)

## 9.2 Reaktionsmechanismus der L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aureescens*

Da die L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aureescens* DSM 3747 das Benzylbernsteinsäurehalbamid nicht umsetzen kann, konnte ein Reaktionsmechanismus, wie er bei den D-Carbamoylasen vorliegt, ausgeschlossen werden. Die Decarbamoylierung muß bei diesem Enzym also auf einem anderen katalytischen Mechanismus beruhen. Aufgrund der gezeigten Ergebnisse wurde in Abbildung 46 für eine L-Carbamoylase das schematische Modell der Umsetzung einer L-Carbamoyl-Aminosäure aufgestellt: Nach dem nukleophilen Angriff wird nicht, wie bei der D-Carbamoylase, das Elektronenpaar des terminalen Stickstoffs aktiviert, sondern das zwischen Brücken-Stickstoff und Kohlenstoffatom. Die Decarbamoylierung erfolgt nach einem Acylase-ähnlichen Mechanismus, bei dem Carbamat frei wird, das chemisch instabil ist und daher anschließend sofort in Kohlendioxid und Ammoniak zerfällt.



**Abbildung 45: Hypothetischer Reaktionsmechanismus für die L-Carbamoylase aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747; Nu: Nukleophil; Acc: Elektronenakzeptor fungiert als Lewis-Säure; B-H: Lewis-Base**

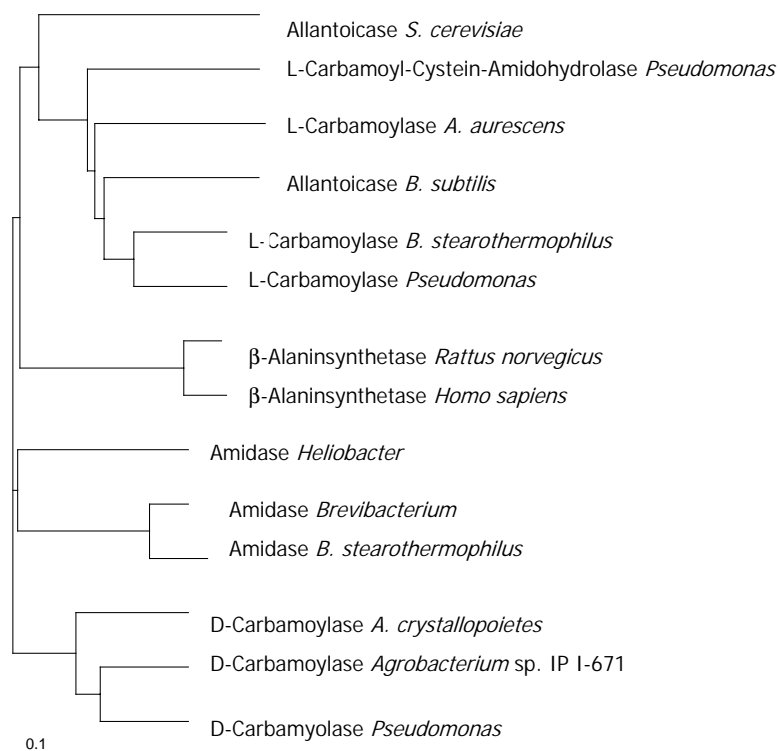
Die Rolle des Nukleophils könnte einem Cystein- (wie bei der D-Carbamoylase) oder auch einem Serinrest zukommen. Bei einem Alignment von L-Carbamoylasen sind keine konservierten Cysteine, wohl aber zwei Serine zu erkennen. Bei der L-Carbamoylase aus *A. crystallopoietes* käme die Rolle des Nukleophils demnach möglicherweise dem Serin 84 oder 387 zu (siehe Abbildung 40).

Für einen Serinrest als Nukleophil spricht auch die Beobachtung von Grifantini et al. (1996), dass eine D-Carbamoylase-Mutante aus *Agrobacterium*, bei der das katalytisch aktive Cystein durch ein Serin ersetzt wurde, noch Restaktivität aufweist.

Die Funktion des Elektronenakzeptors könnte möglicherweise auch durch ein Metallion übernommen werden. Bisher sind bei den L-Carbamoylasen aus *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus brevis* AJ-12299, *Bacillus stearothermophilus* NS1122A, *Pseudomonas putida* IFO12996 und *Pseudomonas* sp. NS 671

(Hyper-)aktivierungen durch Kationen wie  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  oder  $Ni^{2+}$  beschrieben worden (siehe Abschnitt 1-2.3). Allerdings gibt es noch keinen eindeutigen Beweis für das Vorhandensein eines katalytisch aktiven Metallions; diese Funktion könnte auch von einem anderen Aminosäurerest mit positiver Ladung übernommen werden (z.B. Lysin).

Die Reaktionsmechanismen, die den beiden Carbamoylasen zu Grunde liegen sind somit unterschiedlicher Natur. Diese Unterschiede bestätigen sich auch in den Verwandtschaftsbeziehungen, die in dem Dendrogramm in Abbildung 46 veranschaulicht sind. Man erkennt darin, dass die in dieser Arbeit untersuchten D- und L-Carbamoylasen unterschiedlichen Enzymfamilien zuzuordnen sind, wie bereits zu Beginn des Abschnittes 9 angesprochen wurde.

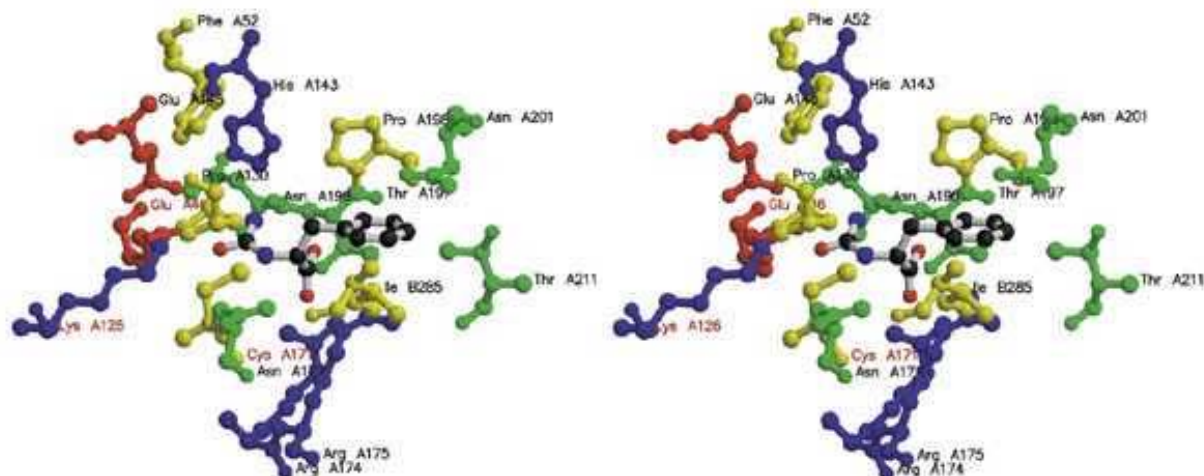


**Abbildung 46: Dendrogramm unterschiedlicher D- und L-Carbamoylasen, Nitrilasen,  $\beta$ -Alaninsynthetasen, Allantoicasen, Amidasen und L-Carbamoyl-Cystein-Amidohydrolase**



### 9.3 Einfluss der übrigen Positionen

Die untersuchten D- und L-Carbamoylasen akzeptieren beide Variationen des Restes in der 5'-Position, aber keine Veränderungen an der  $\alpha$ -Carboxylatgruppe. Dieses führt sowohl bei der D- als auch bei der L-Carbamoylase zum Verlust der Aktivität.



**Abbildung 47: Stereo-Bild (ball and stick-Darstellung) des aktiven Zentrums der D-Carbamoylase aus *Agrobacterium* sp. KNK671; das D-Carbamoyl-Phenylalanin wurde modelliert (Nakai et al., 2000)**

Der mit der Derivatisierung der Carboxylatgruppe einhergehende Aktivitätsverlust zeigt, dass die negative Ladung des Carboxylatanions essentiell für die Umsetzung des Substrates ist. Nakai et al. (2000) zeigten, dass sich in der unmittelbaren Nachbarschaft der Carboxylatgruppe des Phenylalanins zwei Argininreste Arg174 und Arg175 befinden; diese können mit den positiv geladenen Guanidinogruppen in Wechselwirkung mit der Carboxylatgruppe des Substrates treten. Bei einem Verlust des Carboxylations kann das Substrat nicht mehr korrekt ausgerichtet werden und die Aktivität geht verloren.

Interessanterweise erkennt man in einem Alignment der untersuchten D- und L-Carbamoylasen, dass an Stelle der beiden Arginine bei den L-Carbamoylasen ebenfalls zwei Arginine oder ein Arginin und ein Lysin konserviert vorliegen. Die Funktion dieser beiden Aminosäurereste könnte somit eine ähnliche sein wie die der Arginine der D-Carbamoylasen.

Durch die Möglichkeit, auch disubstituierte *N*-Carbamoyl-Aminosäuren mit der D-Carbamoylase aus *Agrobacterium* sp. IP I-671 umsetzen zu können, eröffnet sich die Möglichkeit, das Hydantoinaseverfahren auch zur Herstellung von  $\alpha,\alpha$ -disubstituierten Aminosäuren anzuwenden. Die Umsetzung ist allerdings unspezifisch und wäre auch nur denkbar, wenn es gelänge, mit D-Hydantoinasen die entsprechenden 5',5'-disubstituierten Hydantoinderivate spezifisch und mit ausreichender Aktivität umzusetzen. Die  $\alpha,\alpha$ -disubstituierten Aminosäuren, wie beispielsweise 2-Aminoisobuttersäure (2-Methylalanin) sind interessante pharmazeutisch aktive Substanzen, die zum

Beispiel als Inhibitor von Enzymen wirken können, welche die entsprechende  $\alpha$ -Aminosäure metabolisieren. Diese Aminosäuren werden daher auch zur gezielten Modifikation der Sequenz von Peptidhormonen eingesetzt. Dadurch können Wirkstoffe resistenter gegen enzymatischen Abbau werden oder es könnte eine bevorzugte Konformation des Peptidrückgrates stabilisiert werden, da  $\alpha,\alpha$ -disubstituierten Aminosäuren laut Literatur unter anderem die Bildung von  $\beta$ -Turns oder Helices induzieren können (Heimgartner, 1991).

#### 9.4 Herstellung von enantiomerenreinen $\alpha$ -Hydroxy-Carbonsäuren

In den Arbeiten von Waniek (2000) konnte gezeigt werden, dass sich 5-Benzyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion (BOD) mit Hydantoinasen umsetzen läßt. Die entstehende D-Carbamoyl-Phenylmilchsäure wird von der D-Carbamoylase aus *Agrobacterium* als Substrat akzeptiert (siehe V-8), sodass auf diese Weise die enantioselektive Herstellung von  $\alpha$ -Hydroxy-Carbonsäuren mit dem Hydantoinaseverfahren möglich ist (Patent in Vorbereitung). Der Vorteil gegenüber bisherigen Herstellungsverfahren dieser Stoffklasse ist der mögliche Vollumsatz des racemischen Substratgemisches zu 100 % optisch aktivem Produkt, der auch das Hydantoinaseverfahren auszeichnet. Für die Etablierung eines solchen Verfahrens ist jedoch noch ein großes Maß an Optimierungsarbeiten zur Erhöhung der spezifischen Aktivitäten notwendig, da sich diese bisher noch in einem unzureichenden Rahmen für eine industrielle Applikation befinden.

## V Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen die für die D-Carbamoylase, D-Hydantoinase und L-Carbamoylase codierende Strukturelemente innerhalb des *hyu*-Genclusters aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 vollständig aufzuklären.

Nachdem die D-Carbamoylase in rekombinanter Form in *Escherichia coli* expremiert und charakterisiert wurde, könnten weiterführende Arbeiten darin bestehen, sowohl die Temperaturstabilität als auch das Temperaturoptimum dieses Enzyms zu erhöhen. Diese Limitierungen könnten über das Verfahren der gerichteten Evolution behoben werden, das bereits für eine Vielzahl industrierelevanter Enzyme erfolgreich angewendet werden konnte (Arnold et al., 2001).

Da die D-Hydantoinase bisher nur mit einer sehr geringen spezifischen Aktivität expremiert werden konnte, bietet auch dieses Enzym eine Reihe von experimentellen Ansatzpunkten für Optimierungsarbeiten. Beispielsweise könnte untersucht werden, ob durch Supplementation von zweiwertigen Ionen wie  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  oder  $Co^{2+}$  in das Kultivierungsmedium oder zum Assay die Aktivität des Enzyms gesteigert werden kann.

Mit den aktiven Enzymen des *hyu*-Genclusters aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117 oder auch in Kombination mit anderen homologen Enzymen, könnte ein Ganzzellkatalysator konstruiert werden, wie er bereits in den Arbeiten von Wilms beschrieben wurde (Wilms, 2000).

Weiterhin wäre auch die Expression und Charakterisierung der L-Carbamoylase von großem Interesse. Nach der Bestimmung der Enantioselektivität des Substratspektrums und dem direkten Vergleich mit dem der D-Carbamoylase könnten eventuell auch Hinweise auf die Funktion dieser Enzyme im bisher noch nicht beschriebenen physiologischen Stoffwechsel des Organismus gewonnen werden.

## VI Literatur

**Abendroth J, Niefind K, Chatterjee S, Schomburg D** (2000). Crystallization, preliminary X-ray analysis of a native and selenomethionine D-hydantoinase from *Thermus* sp.. Acta Cryst. D56, 1166-1169

**Akamatsu N** (1960). Specificity of hydantoinases, dihydropyrimidinases and decarbamoylases. J Biochem. 47, 809-819

**Altenbuchner J, Stump T, Wilms B** (2000). Ein neues L-Rhamnose-induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. Biospektrum. 1, 33-36

**Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402

**Alvarado-Marín A** (1997). Isolierung und Charakterisierung einer D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117. Dissertation, Universität Stuttgart

**Arnold FH, Wintrode PL, Miyazaki K, Gershenson A** (2001). How enzymes adapt: lessons from directed evolution. Trends Biochem Sci. 26, 100-6

**Batisse N, Weigel P, Lecocq M, Sakanyan V** (1997). Two amino acid amidohydrolase genes encoding L-stereospecific carbamoylase and aminoacylase are organized in a common operon in *Bacillus stearothermophilus*. Appl Environ Microbiol. 63, 763-766

**Beller M, Eckert M, Maradi WA, Neumann H** (1999). Palladium-katalysierte Synthese von substituierten Hydantoinen - durch Carbonylierung zu Aminosäurederivaten. Angew Chem. 111, 1562-1565

**Bernheim F, Bernheim MLC** (1946). The hydrolysis of hydantoin by various tissues. J Biol Chem. 163, 683-685

**Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y** (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science., 277, 1453-1474

**Bommarius AS, Drauz K, Groeger U, Wandrey C** (1992). Membrane bioreactors for the production of enantiomerically pure alpha-amino acids , In: *Chirality in Industry: The commercial manufacture and applications of optically active compounds*, Collins AN, Sheldrake GN & Crosby J (ed.), chapt. 20. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, New York, Toronto, 371-397

**Brans A** (1991). Untersuchungen zur Synthese und Anreicherung einer D-N-Carbamoyl-aminosäure-Amidohydrolase aus *Arthrobacter crystallopoietes* AM2. Dissertation, TU Braunschweig

**Buson A, Negro A, Grassato L, Tagliaro M, Basaglia M, Grandi C, Fontana A, Nuti MP** (1996). identification, sequencing and mutagenesis of the gene for a D-carbamoylase from *Agrobacterium radiobacter*. FEMS Microbiology Letters, 145, 55-62

**Campbell LL**, (1958). Reductive degradation of pyrimidines. IV. Purification and Properties of dihydrouracil hydrase. J Biol Chem. 233, 1236-1240

**Cecere F, Galli G, Morisi F** (1975). Substrate and steric specificity of hydroypyrimidine hydrase. FEBS Letters. 57, 192-194

**Cecere F, Galli G, Della Penna G, Rappuoli B** (1977). Method for the preparation of D-carbamyl amino acids and the corresponding D-amino acids. US. Pat. 4065353, Snamprogetti, S.p.A.

**Chien HR et al.** (1998). Identification of the open reading frame for the *Pseudomonas putida* D-hydantoinase gene and expression of the gene in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta. 1395, 68-77

**Chung CT, Niemaela SL, Miller RH** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc Natl Acad Sci USA. 70, 3240-3244

**Drauz K, Kottenhahn M, Makryaleas K, Klenk H, Bernd M**, (1991). Chemoenzymatic synthesis of D- $\omega$ -ureidoaminoacids. Angew Chem. 103, 704-706

**Drauz K, Waldmann H** (1995). Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A comprehensive handbook. VCH Weinheim

**De Montigny J, Straub ML, Wagner R, Bach ML, Chevallier MR** (1998). The uracil permease of *Schizosaccharomyces pombe*: a representative of a family of 10 transmembrane helix transporter proteins of yeast. Yeast. 14, 1051-1059

**Dinelli D, Marconi W, Cecere F, Galli G, Morisi F** (1978). A new method for the production of optically active amino acids. In: Pye, E K, Weetall, HH (eds) Vol III, Plenum Publishing Corporation, 477-481

**Eadie GS, Bernheim F, Bernheim MLC** (1949). The partial purification and properties of animal and plant hydantoinases. *J Biol Chem.* 181, 449-458

**Ensign JC, Rittenberg SC** (1963). A crystalline pigment produced from 2-hydroxypyridine by *Arthrobacter crystallopoietes* sp.. *Arch Microbiol.* 47, 137-153

**Ensign J, Wolfe RS** (1964). Nutritional control of morphogenesis in *Arthrobacter crystallopoietes*. *J Bacteriol.* 87, 924-932

**Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, McKenney K, Sutton G, FitzHugh W, Fields C, Gocayne JD, Scott J, Shirley R, Liu LI, Glodek A, Kelley JM, Weidman JF, Phillips CA, Spriggs T, Hedblom E, Cotton MD, Utterback TR, Hanna MC, Nguyen DT, Saudek DM, Brandon RC, Fine LD, Fritchman JL, Fuhrmann JL, Geoghagen NSM, Gnehm CL, McDonald LA, Small KV, Fraser CM, Smith HO and Venter JC** (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 269, 496-512

**Fritz C** (2000). Klonierung und Expression der Gene des *hyu*-Genclusters aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117, Studienarbeit; Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart

**Grifantini R, Frascotti G, Galli G & Grandi G** (1995). Process for the production of D-alpha-amino acids. European Patent 0677585 A1, Eniricerche S.p.A., Italy

**Grifantini R, Pratesi C, Galli G, Grandi G** (1996). Topological mapping of the cysteine residues of N-carbamyl-D-amino-acid amidohydrolase and their role in enzymatic activity. *J Biol Chem.* 271, 9326-9331

**Hannig G, Makrides SC** (1998). Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Tibtech.* 16, 54-60

Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam LA, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O, Salzberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM (2000). DNA Sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. Nature. 406, 477-483

Heimgartner H (1991). 3-Amino-2*H*-azirine, Bausteine für  $\alpha,\alpha$ -disubstituierte  $\alpha$ -Aminosäuren in Heterocyclen- und Peptidsynthesen. Angew Chem. 103, 271-297

Hils M (1998). Mutanten der D-Carbamoylase zur Bildung aktiven Enzyms bei Expression des Gens in *Escherichia coli* und Analyse eines Genclusters für die Enzyme des Hydantoin-Abbaus aus *Agrobacterium sp.* IP I-671. Dissertation; Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart

Ikenaka Y, Nanba H, Yamada Y, Yajima K, Takano M, Takahashi S (1998). Screening, characterization, and cloning of the gene for N-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase from thermotolerant soil bacteria. Biosci Biotechnol Biochem. 62, 882-886

Ishikawa T, Watabe K, Mukohara Y, Nakamura H (1997). Mechanism of stereospecific conversion of DL-5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids by *Pseudomonas sp.* strain NS671. Biosci Biotech Biochem. 61, 185-187

**International Union of Biochemistry and Molecular Biology** (1993). Enzyme nomenclature, Academic Press Inc., New York

Jahnke K, Podschun B, Schnackerz DK, Kautz J, Cook PF (1993). Acid-Base catalytic mechanism of dihydropyrimidinase from pH studies. Biochem. 32, 5160-5166

John W (1994). A one-step enzymatic digestion procedure for PVDF-bound proteins that does not require PVP-40. In: Techniques in Protein Chemistry V. Crabb ed., Academic Press, 215-222

Kim DM, Kim GJ, Kim HS (1994). Biotechnol Lett. 16, 11-16

Kim GJ, Cheon YH, Kim HS (2000). Directed evolution of a novel D-hydantoinase fusion enzyme for functional expression with enhanced stability. Biotech and bioeng. 68, 211-217

Kim JM, Shimizu S, Yamada H (1986). Purification and characterization of a novel enzyme, N-carbamoylsarcosine amidohydrolase, from *Pseudomonas putida* 77. J Biol Chem. 261, 11832-11839

**Kita M, Goodkin DE** (2000). Drugs to treat spasticity. *Drugs*. 95, 487-495

**Kleinpeter E** (1997). The structure of hydantoins in solution and in the solid state. *Structural Chemistry*. 8, 161-173

**Koch C, Rainey FA, Stackebrandt E.** (1994). 16S rDNA studies on members of *Arthrobacter* and *Micrococcus*: An aid for their future taxonomic restructuring. *FEMS Microbiol Lett*. 123, 167-172

**Kunst F et al.** (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256

**Kutscher B, Bernd M, Beckers T, Polymeropoulos E, Engel J** (1997). Chemie und Molekularbiologie bei der Suche nach neuen LHRH-Antagonisten. *Angew Chem*. 109, 2240-2254

**LaPointe G, Viau S, LeBlanc D, Robert N Morin A** (1994). Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D-hydantoinase gene from *Pseudomonas putida* and distribution of homologous genes in other microorganisms. *Appl Environ Microbiol*. 60, 888-895

**Lee SG, Lee DC, Hong SP, Sung MH, Kim HS** (1995). Thermostable D-hydantoinase from thermophilic *Bacillus stearothermophilus* SD-1: characteristics of purified enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol*. 43, 270-276

**Lee SG, Lee DC, Kim HS** (1997). Purification and characterisation of thermostable D-Hydantoinase from thermophilic *Bacillus stearothermophilus* SD-1. *Appl Biochem Biotechnol*. 62, 251-266.

**Liebermann I, Kornberg, A** (1954). Enzymatic synthesis and breakdown of a pyrimidine, orotic acid. II. Dihydroorotic acid, ureidosuccinic acid, and 5-Carboxymethylhydantoin. *J Biol Chem*. 207, 911-924

**Luksa V, Starkuviene V, Starkuviene V, Dagys R** (1997). Purification and characterisation of the D-Hydantoinase from *Bacillus circulans*. *Appl Biochem Biotechnol*. 62, 219-231

**Luria SE, Adams JN, Ring RC** (1960). Transduction of lactose utilizing ability among strains of *Escherichia coli* and *Saccharomyces dysenteriae* and the properties of the transducing phage particle. *Virology*. 12, 348-390

**Louwrier A, Knowles CJ** (1996). The purification and characterization of a novel D-specific carbamoylase enzyme from *Agrobacterium* sp.. *Enzyme Microb Technol*. 19, 562-571



- Marin A** (1997). Isolierung und Charakterisierung einer D-Hydantoinase aus *Arthrobacter crystallopoietes* DSM 20117. Dissertation; Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart
- May O, Habenicht A, Mattes R, Syldatk C, Siemann C** (1998). Molecular evolution of hydantoinases. *Biol Chem.* 379, 743-747
- May O, Nguyen PT, Arnold FH** (2000). Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat Biotech.* 18, 317-320
- Möller A** (1986). Stereo- und Substratspezifität von Hydantoinasen und *N*-Carbamoyl-Aminosäure-Amidohydrolasen aus neu isolierten Mikroorganismen. Dissertation; Carolo-Wilhelmina Technische Universität Braunschweig
- Morin A, Hummel W, Schutte H, Kula MR** (1986). Characterization of hydantoinase from *Pseudomonas fluorescens* strain DSM 84. *Biotechnol Appl Biochem.* 8, 567-574
- Mukohara Y, Ishikawa T, Watabe K, Nakamura H** (1993). Molecular cloning and sequencing of a thermostable N-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase from *Bacillus stearothermophilus* strain NS1122A. *Biosci Biotechnol Biochem.* 57, 1935-1937
- Mukohara Y, Ishikawa T, Watabe K, Nakamura H** (1994). A thermostable hydantoinase of *Bacillus stearothermophilus* NS1122A: cloning, sequencing, and high expression of the enzyme gene, and some properties of the expressed enzyme. *Biosci Biotechnol Biochem.* 58, 1621-1626
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf S, Saiki R, Horn GT, Ehrlich HA** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol.* 51, 263-273
- Müller H, Ziegler B, Schweizer B** (1993). UV/VIS-Spektroskopie in der Nucleinsäureanalytik. *Bio Tec Life Science.* 4, 25-29
- Nakai T, Hasegawa T, Yamashita E, Yamamoto M, Kumasaka T, Ueki T, Nanba H, Ikenaka Y, Takahashi S, Sato M, Tsukihara T** (2000). Crystal structure of *N*-carbamyl-D-amino acid amidohydrolase with a novel catalytic framework common to amidohydrolases. *Structure.* 729-739
- Nakamura Y, Gojobori T, Ikemura T** (1999). Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases; its status 1999. *Nucl Acids Res.* 27, 292

**Nanba H, Ikenaka Y, Yamada Y, Yajima K, Takano M, Takahashi S** (1998). Isolation of *Agrobacterium* sp. strain KNK712 that produces *N*-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase, cloning of the gene for this enzyme, and properties of the enzyme. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62, 875-881

**Newton CR, Graham A** (1994). PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

**Nishida Y, Nakamichi K, Nabe K, Tosa T** (1987). Enzymatic production of L-tryptophan from DL-5-indolylmethylhydantoin by *Flavobacterium* sp. *Enzyme Enzyme Microb Technol.* 9, 721-725

**Ogawa J, Shimizu S, Yamada H** (1993). *N*-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase from *Comamonas* sp. E222c purification and characterization. *Eur J Biochem.* 212, 685-691

**Ogawa J, Shimizu S** (1994). Beta-ureidopropionase with *N*-carbamoyl- $\alpha$ -L-amino acid amidohydrolase activity from an aerobic bacterium, *Pseudomonas putida* IFO 12996 *Eur J Biochem.* 223, 625-630

**Ogawa J, Chung MC, Hida S, Yamada H, Shimizu S** (1994). Thermostable *N*-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase: screening, purification and characterization. *J Biotechnol.* 38, 11-19

**Ogawa J, Honda M, Soong CL, Shimizu S** (1995). Diversity of cyclic ureide compound-, dihydropyrimidine-, and hydantoin-hydrolyzing enzymes in *Blastobacter* sp. A17p-4. *Biosci. Biotech Biochem.* 59, 1960-1962

**Ogawa J, Miyake H, Shimizu S** (1995). Purification and characterization of *N*-carbamoyl-L-amino acid amidohydrolase with broad substrate specificity from *Alcaligenes xylosoxidans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 42, 1039-1043

**Ogawa J, Shimazu S** (1999). Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *Tibtech,* 17, 13-21

**Olivieri R, Fascetti E, Angelini L, Degen L** (1979). Enzymatic conversion of *N*-carbamoyl-D-amino acids to D-amino acids *Enzyme Microb Technol.* 1, 201-204

**Page RDM** (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences.* 12, 357-358

**Rai R, Genbauffe FS, Cooper TG** (1988). Structure and transcription of the allantoate permease gene (DAL5) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 170, 266-271

**Rai R, Rao RB, Taneja V** (1996). Hydrolysis of di-substituted hydantoins by an enzyme preparation from lentil (*Lens lentula*) seeds, for the synthesis of  $\alpha,\alpha$ -dialkylated amino acids with linear and cyclic substituents. *World J Microbiol Biotechnol.* 12, 247-250

**Rai R, Taneja V** (1998). Papain catalysed hydantoin hydrolysis in the synthesis of amino acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 224, 889-892

**Redenbach M, Kieser HM, Denapaite D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, Hopwood DA** (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol Microbiol.* 21, 77-96

**Riley J, Butler R, Finniear R, Jenner D, Powell S, Anand R, Smith JC, Markham AF** (1990). A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucl Acids Res.* 18, 8186

**Runser S, Meyer P** (1993). Purification and biochemical characterization of the hydantoin hydrolyzing enzyme from *Agrobacterium* sp. A hydantoinase with no 5,6-dihydropyrimidine amidohydrolase activity. *Eur J Biochem.* 213, 1315-24

**Sakanyan V, Desmarez L, Legrain C, Charlier D, Mett T, Kochikyan A, Savchenko A, Boyen A, Falmagne P, Pirard A, Glansdorff N** (1993). Gene cloning, sequence analysis, purification, and characterization of a thermostable aminoacylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 59, 3878-3888

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). *Molecular Cloning.* Cold Spring Harbour Laboratory Press

**Schlegel HG, Drews G, Lengeler JW** (1999). *Biology of the Prokaryotes.* Thieme Verlag Stuttgart, 228

**Schleifer KH, Kandler O** (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.* 36, 407-477

**Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool-5864 Identification of signalling domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 585

**Skyring CW, Quadling C** (1970). Soil bacteria: a principal component analysis and guanine-cytosine content of some *arthrobacter-coryneform* soil isolates and of some named cultures. *Can J Microbiol.* 16, 95-106

- Smith** (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol.* 179, 7135-7155
- Stackebrandt E, Fiedler F** (1979). DNA-DNA homology studies among strains of *Arthrobacter* and *Brevibacterium*. *Arch Microbiol.* 120, 289-295
- Stone KL, LoPresti MB, Crawford JM, DeAngelis R, Williams KR** (1989). Enzymatic digestion of proteins and HPLC peptide isolation. In: A practical guide to protein purification for microsequencing. Academic Press; Matsudaira PT ed., 31-47
- Stover et al.** (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature.* 406, 959-964
- Sumrada R, Cooper TG.** (1977). Allantoin Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 131, 839-847
- Syldatk C, Mackowiak V, Höke H, Gross C, Dombach G, Wagner F** (1990). Cell growth and enzyme synthesis of a mutant of *Arthrobacter* sp. (DSM 3747) used for the production of L-amino acids from D,L-5-monosubstituted hydantoins. *J Biotech.* 14, 345-362
- Syldatk C, Müller R, Pietzsch M, Wagner F** (1992). Biocatalytic production of amino acids & derivatives; eds.: Rozzell D, Wagner F, Hanser Publishers, München, 129-176
- Syldatk C, May O, Altenbuchner J, Mattes R, Siemann M** (1999). Microbial hydantoinases – industrial enzymes from the origin of life?. *Appl Microbial Biotechnol.* 51, 293-309
- Takahashi S, Kii Y, Kumagai H, Yamada H** (1978). Purification, crystallization and properties of hydantoinase from *Pseudomonas striata*. *J Ferment Technol.* 56, 492-498
- Taillades J, Beuzelin I, Garrel L, Tabacik V, Bied C, Commeyras A** (1998). Origins of Life and Evolution of the Biosphere, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 28, 61-77
- Takahashi S, Kii Y, Kumagai H, Yamada H** (1978). Purification, crystallization and properties of hydantoinase from *Pseudomonas striata*. *J Ferment Technol.* 56, 484-491
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D** (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.* 24, 4876-4882

**Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ** (1988). A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16, 8186

**Tsang JW, Schmied B, Nyfeler R, Goodman M** (1984). Structural studies on the c-terminal amino acid of L-aspartyl dipeptide sweeteners. *J Med Chem.* 27, 1663-1668

**Yoo HS, Cunningham TS, Cooper TG** (1992). The allantoin and uracil permease gene sequences of *Saccharomyces cerevisiae* are nearly identical. *Yeast.* 8, 997-1006

**Vielhauer O** (2001). Dissertation; Instiut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart (in Vorbereitung)

**Wallach, DP, Grisolia S** (1957). The Purification and Properties of Hydropyrimidine Hydrase. *J Biol Chem.* 226, 277-288

**Walker JM** (1994). The protein protocols handbook. Humana Press Inc., Totowa, NJ

**Waniek T** (2000) Untersuchungen zur Substratspezifität und Enantioselektivität mikrobieller Hydantoinasen. Dissertation; Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart

**Watabe K, Ishikawa T, Mukohara Y, Nakamura H** (1992). Identification and sequencing of a gene encoding a hydantoin racemase from the native plasmid of *Pseudomonas sp.* NS671. *J Bacteriol.* 174, 3461-3466

**Watabe K, Ishikawa T, Mukohara Y, Nakamura H** (1992). Cloning and sequencing of the genes involved in the conversion of 5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids from the nativ plasmid of *Pseudomonas sp.* NS671. *J Bacteriol.* 174, 962-969

**Watanabe W, Snell EE** (1972). Reversibility of the tryptophanase reaction: synthesis of tryptophan from indole, pyruvate and ammonia. *Proc Nat Acad Sci.* 69, 1086-1090

**Wiese A** (2000). Molekulargenetische und funktionelle Charakterisierung des Hydantoin-Operons aus *Arthrobacter aurescens* DSM 3747. Dissertation; Institut für industrielle Genetik, Universität Stuttgart, Verlag Ulrich Grauer, Stuttgart

**Wiese A, Pietzsch M, Syldatk C, Mattes R, Altenbuchner J** (2000). Hydantoin racemase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747: heterologous expression, purification and characterization. *J Biotechnol.* 80, 217-230

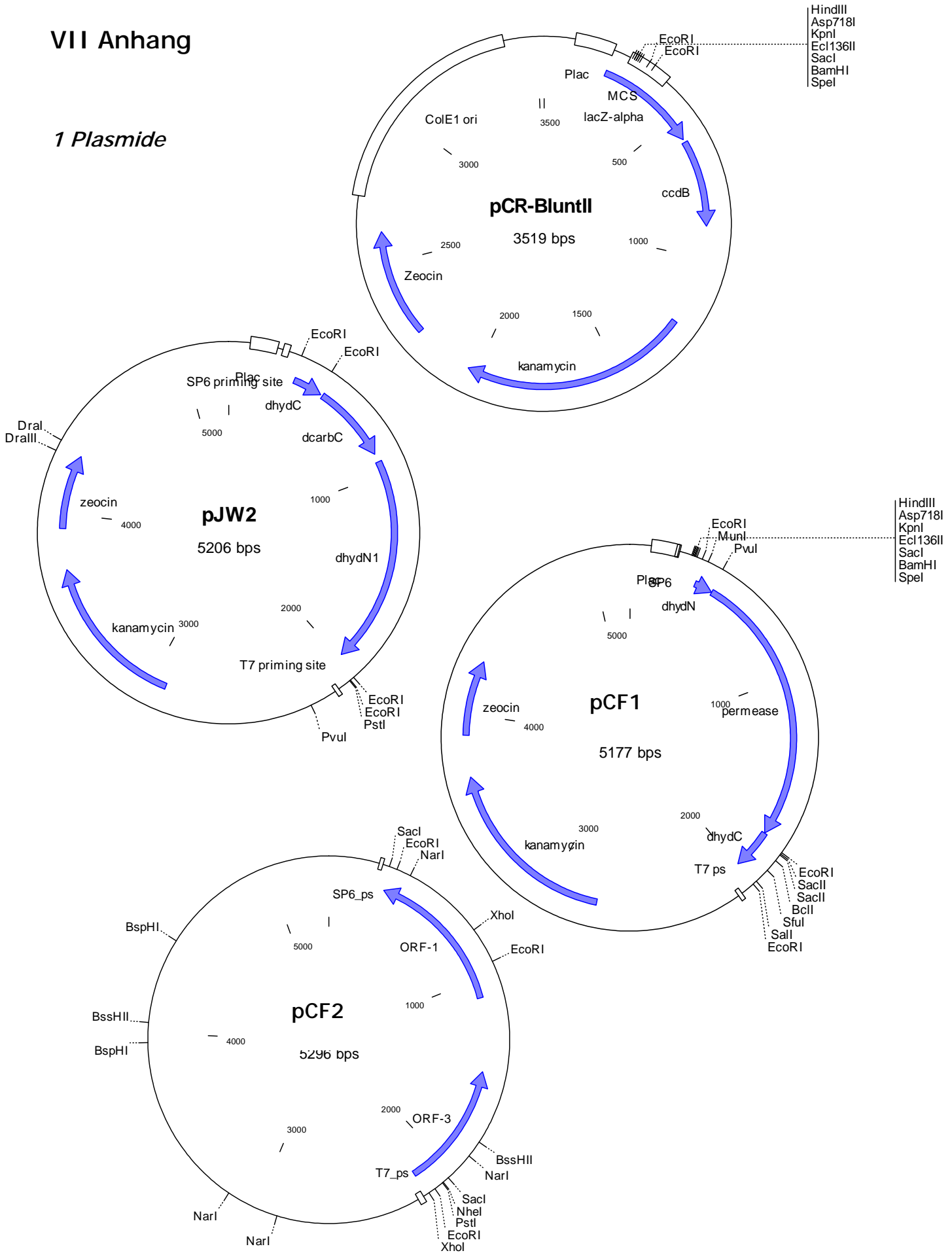
**Wilms B, Wiese A, Sylatk C, Mattes R, Altenbuchner J, Pietzsch M** (1999). Cloning, nucleotide sequence and expression of a new L-N-Carbamoylase gene from *Arthrobacter aurescens* DSM 3747 in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 68, 101-113

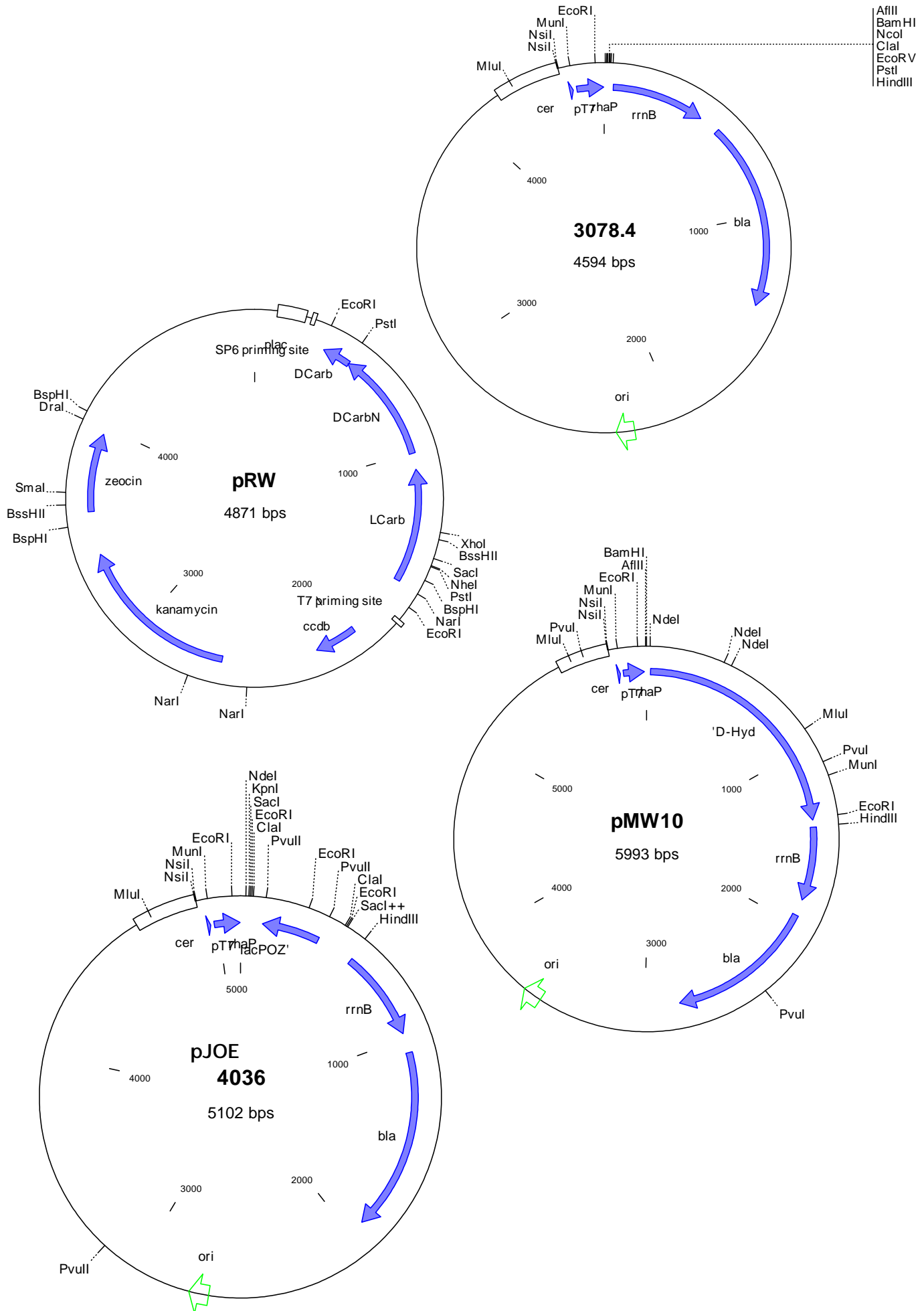
**Wilms B, Hauck, Reuss M, Sylatk C, Mattes R, Siemann M, Altenbuchner J** (2000). Enzyme Microb Technol, accepted

**Yokozeki K, Hirose Y, Kubota K** (1978). Mechanism of asymmetric production of L-aromatic amino acids from the corresponding hydantoins by *Flavobacterium* sp. *Agric Biol Chem.* 51, 737-746

VII Anhang

1 Plasmide







## 2 DNA-Sequenz des *hyu*-Genclusters aus *A. crystallopoietes* DSM 20117

1 GAGCTCTCAG TCGCAGTCGA TGATTTGCTG GGTGGACGGT TAGCTGCTGA ACATCTGGCG  
 61 GCAGCTGGAC ATGCCGAGAT AGCAATAAATT TCACCCGACA GTTCAGTGAG CACAGGTAGG  
 121 GACAGAGTCG AAGGCTTTTCG GCGCCGCATG CTGGAATTGG GGACAAAGAT AGACGATTTCG  
*orf1* 181 CGGATAGTCC CTGCGGGATT CGATATTGCG TCCGGCCAGC GCGCCGCAGA AACACTCCTT  
 241 GGCTGGCCAA AACTTCCCAC GGCCGTCTTT GCAAGCAACG ACCTAACCGC GCGGGGCATC  
 301 ATGTTTCAGAC TTCGGGAGGC AGGGATATCG ATAGGTCGCG ACGTCGCACT GGTGGGCTAC  
 361 AACGACATAG AAATTTCCAA GCATCTGCCG GTCCCCCTGA CAACCATTGC GTCGCCCTTG  
 421 CACGAGGTTG GAGCCAGAAG CCTCGATACG CTCATTGAGG TGATCGAGGG CAGGGTTC  
 481 GATTCTTAC AACTCACTCC GCGCCTGTTG GCCAGGGAAT CAACTCTTGC GTTCGTTACC  
 541 CTGAACACCT  GAACGTTTTTC TCGAACAGGC CCTTGGTGTG GTCCTGTTTCG AACAAGCATC  
 601 TGCTCCTGCT TTGGCCGTGA AGATGATTAA CGTGCGCGGC GAACCGATGC GTTGGGCCAC  
 661 CCATACCTCG CCGGTCCACA TCATTGTGGC TGCTTGCCAC CTGTACGGTC GTCCTAGCCA  
 721 CGGGTACCCG TGTAGCGAAA GCACCGCACC CTAGACCGGC CTCTCAGCA CGCACTCCCA  
 781 TCCTCACTCG CAGACTTACC TGACCCTTTT AAAAAATGTTT CTGCAATCGA TTGCAATGCC  
 841 GGGCAGGCCT CGCTAAAGTT GTTGTCCAGA GGCATTAAAA GTGATGGGGA TCACTTTTAG  
 901 TCTTGCCATG ATGCTGCTAT TCCGCTCTCT CAAAGGCACT CTCTATGGAA ACAATTGACG  
 961 GCATTTCTAC AGGTCGAATC GATAGATTAT TTGCAGATAT TGAAGCTTTT GTTGATCCCG  
 1021 CATTTGACGG CTGGACAAGG ACTGTATTTA GCCCTGCTTA TAAGGCAGAG CGTTCCTGGA  
 1081 TGGTCGAAGA ATTCAAGCGG GCGGGGCTCG AAGATGTGCA TACCGATGAC TTTGGAAATA  
*hyuCl* 1141 TCGTCGGGAT ATTGCCCGGA CGGCACAGTA CCGCCAAGCC CATCGTGCTG GGCTCCCATA  
 1201 CGGATACTGT CGAGCGCGGC GGCCGTTTTG ATGGAATCGT TGGCGTCCTG GCGCACTCG  
 1261 AGGTAGCCCA ACGGATTAAG GAATCCGGAA GCGTCCTCAA CCGCCGCTT ATGGTCATTG  
 1321 ACTTCTTCGG GGAAGAGGCG AACCCGTTTCG GGCTTACCTG TCTCGGAAGC AGGGCGCTTG  
 1381 CGGGCAGTCT GACGGTGAAG GACCTGGAGC GTGTGAGCCC GGAGGGCAAG CGTTTGGGCG  
 1441 ATGCGATGCA GTCCTTCGGC CTGGACCCCT CGCGTGCCGT CAGCGGCAAG CACCCGGTGC  
 1501 GGGGCAGCTG GCACGCCTAC CTCGAACTGC ACATTGAACA AAGTTCAACG CTGGATCAGA  
 1561 CAGGATGCAA TATCGGCGTC GTCTCGGCCA CCGCCGGAAT CAAGCGGCTG GTAGGCCGGT  
 1621 ACATGGGCCA ATACGACCAT GCGGGCGGCG CCCGGATGAA GAGCAGAAAA GACGCGCTGC  
 1681 TTGCTGCTGC TTCTTCCGCC CTGGCGCTTC ATGAGTTCGC CTGTGGAAGT CCGGAATATG

1741 CGGTCGCAAC CACAACCCAT ATCGACTCCC TGCAGCTAGC CCAGAATGTT GTACCCGGCC  
 1801 GGTACAGAGCT CCGGGCGGAA CTACGCTCAA CCGATTCCGC CTGGTTTGGG GCTATCGAGA  
 1861 AAGACCTCGC GCTGCGGCTG TCCATGCGCG CGACGGAGTT CGGCTGCGAG CTGGACCTCG  
 1921 AGTGGTCTCT CGATAATGAA ATCGCCCACA CCGATGCCAC GCTCCAGGAA ACCATTGCCG  
 1981 CTGCGTCCAC GATCCTGGGA CTGTCTGGA CAGCGGTTCC AAGCGGCGCG ACCCAGACT  
 2041 CGGTACACAT GACGGGAATT GCCCCATGG GCATGATCTT CATCCCCTCG ATAGACGGCC  
 2101 GAAGCCACTG CCCGGAAGAG TTTACCCCA AAAAAGACAT AATCAATGGC ATTGCGGTAC  
 2161 TCGAAAAAAG CGTCCGTCTG GTCGACGAGT CACGGCCCTG  AACAGGCGCT TTTCAAAGGA  
 2221 AAACAGATCT AGGAAACAAA CCGGAAGAAG AGGAAAACAA ATTGGCGAAA AACTTGATGC  
 2281 TCGCGGTTCG TCAAGTCGGC GGTATCGATA GTTCGGAATC AAGACCCGAA GTCGTCGCC  
 2341 GCTTGATTGC CCTGCTGGAA GAAGCAGCTT CCCAGGGCGC GGAAGTGGTG GTCTTTCCCG  
 2401 AACTCACGCT GACCACGTTT TTCCCGGTA CCTGGTTCGA AGAAGGCGAC TTCGAGGAAT  
 2461 ACTTCGATAA ATCCATGCCC AATGACGACG TCGCGCCCTT TTTCGAACGC GCCAAAGACC  
 2521 TTGGCGTGGG CTTCTACCTC GGATACGCGG AACTGACCAG TGATGAGAAG CGGTACAACA  
 2581 CATCAATTCT GGTGAACAAG CACGGCGACA TCGTCGGCAA GTACCGCAAG ATGCATCTGC  
*hyuC<sub>D</sub>* 2641 CGGGCCACGC CGATAACCGG GAAGGACTAC CCAACCAGCA CCTTGAAAAG AAATACTTCC  
 2701 GCGAAGGAGA TCTCGGATTC GGTGTCTTCG ACTTCCACGG CGTGCAGGTC GGAATGTGTC  
 2761 TCTGCAACGA CCGGCATGG CCGGAGGTCT ACCGCTCTTT GGCCCTGCAG GGAGCAGAGC  
 2821 TCGTCGTCCT GGGCTACAAC ACCCCCGATT TCGTTCCCGG CTGGCAGGAA GAGCCTCACG  
 2881 CGAAGATGTT CACGCACCTT CTTTCACTTC AGGCAGGGGC ATACCAGAAC TCGGTATTTG  
 2941 TGGCGGCTGC CGGCAAGTCG GGCTTCGAAG ACGGGCACCA CATGATCGGC GGATCAGCGG  
 3001 TCGCCGCGCC CAGCGGCGAA ATCCTGGCAA AAGCAGCCGG CGAGGGCGAT GAAGTCGTGC  
 3061 TTGTGAAAGC AGACATCGAC ATGGGCAAGC CCTATAAGGA AAGCGTCTTC GACTTCGCCG  
 3121 CCCATCGGCG CCCCAGCGA TACGGCATCA TCGCCGAAAG GAAAGGGCGG GGCGCCCCAC  
 3181 TGCCCGTCCC GTTCAACGTG AATGACTAAG  AGACAGAACG AACAGGAAAG ACGGTAACCA  
 3241 AATGGATGCG AAACCTCTTG TTGGCGGCAC TATTGTTTCC TCGACCGGCA AAATCCGAGC  
 3301 CGACGTGCTG ATTGAAAACG GCAAAGTCGC CGCTGTCCGC ATGCTGGACG CCGCGACGCC  
*hyuH* 3361 GGACACAGTT GAGCGGGTTG ACTGCGACGG CAAATACGTC ATGCCCGGCG GTATCGACGT  
 3421 TCACACCCAC ATCGACTCCC CCCTCATGGG GACCACCACC GCCGATGATT TTGTCAGCGG  
 3481 AACGATTGCA GCCGCTACCG GCGGAACAAC GACCATCGTC GATTTCGGAC AGCAGCTCGC  
 3541 CGGCAAGAAC CTGCTGGAAT CCGCAGACGC GCACCACAAA AAGGCGCAGG GGAAATCCGT

3601 CATTGATTAC GGCTTCCATA TGTGCGTGAC GAACCTCTAT GACAATTTTCG ATTCCCATAT  
 3661 GGCAGAACTG ACACAGGACG GAATCTCCAG TTTCAAGGTC TTCATGGCCT ACCGCGGAAG  
 3721 CCTGATGATC AACGACGGCG AACTGTTCTGA CATCCTCAAG GGAGTCGGCT CCAGCGGTGC  
 3781 CAAACTATGC GTCCACGCAG AGAACGGCGA CGTCATCGAC AGGATCGCCG CCGACCTCTA  
 3841 CGCCCAAGGA AAAACCGGGC CCGGGACCCA CGAGATCGCA CGCCCGCCGG AATCGGAAGT  
 3901 CGAAGCAGTC AGCCGGGCCA TCAAGATCTC CCGGATGGCC GAGGTGCCGC TGTATTTTCGT  
 3961 GCATCTTTCC ACCCAGGGGG CCGTCGAGGA AGTAGCTGCC GCGCAGATGA CAGGATGGCC  
 4021 AATCAGCGCC GAAACGTGCA CCCACTACCT GTCGCTGAGC CGGGACATCT ACGACCAGCC  
*hyuH* 4081 GGGATTTCGAG CCGGCCAAAG CTGTCTCAC ACCACCGCTG CGCACACAGG AACACCAGGA  
 4141 CGCGTTGTGG AGAGGCATTA ACACCGGTGC GCTCAGCGTC GTCAGTTCCG ACCACTGCCC  
 4201 CTTCTGCTTT GAGGAAAAGC AGCGGATGGG GGCAGATGAC TTCCGGCAGA TCCCCAACGG  
 4261 CGGGCCCGGC GTGGAGCACC GAATGCTCGT GATGTATGAG ACCGGTGTGC CGGAAGGAAA  
 4321 AATGACGATC GAGAAATTCG TCGAGGTGAC TGCCGAGAAC CCGGCCAAGC AATTCGATAT  
 4381 GTACCCGAAA AAGGGAACAA TTGCACCGGG CTCCGATGCA GACATCATCG TGGTCGACCC  
 4441 CAACGGAACA ACCCTCATCA GTGCCGACAC CCAAAAAACA AACATGGACT ACACGCTGTT  
 4501 CGAAGGCTTC AAAATCCGTT GCTCCATCGA CCAGGTGTTT TCGCGTGGCG ACCTGATCAG  
 4561 CGTCAAAGGC GAATATGTCT GCACCCGCGG CCGCGCGAA TTCATCAAGC GGTAGACACC  
 4621 GCACTGCAGC TGCAGACGTG CAGGTTTCGC AACCTCAACA ATTATTTACC GGTCAATGGA  
 4681 GACCGCTCAC TAAAGGAACG CTCAATGTCT GTTTCACAGC AAAAGGCCTC TCCGCTCTAC  
 4741 AACAAGGAAC TGTCCCCGA GTCCGCCTCC GGGACATGGA AAACCATCAA CCTGTTCAAC  
 4801 TGGTGGATGT CTGCCTGGCA CAGTCTGGGC GGCTACACCG TAGCCATCGG ACTCTTCGCC  
 4861 CTGGGGCTGA TGGGATGGCA GGTGTTCTG GCCTTCTCCA TCGGCATCAT CATCCTGTAC  
*hyuP* 4921 TTCGTCAACA ACCTCAGCGG CGTCGCGGGT CAACGAGTCA AAGTGCCCTT CCCCCTCTTC  
 4981 GCCCCGCGCT CCTTCGGGGT GTACGGAGCA AACATCCCGG CACTGCTCAG GGCCGTGGTT  
 5041 GCCATCGCCT GGTACGGAAT CCAAACCTAC CTTGCTTCGG CAGTCGTCAT GCTCCTTGCC  
 5101 ATCAAAATAG TGCCAGGAGC CGCCGACCTT CAGGAGTTGA GCTTCCTGGG CCTTTCAGCA  
 5161 CTTGGATGGA TCTGCTTCCT CGGGCTCTCG CTCATCCAGC TCCTCGTGCT CTTGGGCGGT  
 5221 ATGGAAGCAG TCCGCCGGCT CTCCGACTTC GCAGGACCAA CCATCTGGAT CGCAATGCTC  
 5281 GCCCTGGCCA TCTGGGTGCT CTCCGGGCC GAGTGGAGCA TCGACTTCAC CTATTCACCTA  
 5341 ACGGAGCTGG GAAGCGCCGG CGCCAAACC ATCAGCTTCG CCTCGGCGAT CTTTCATCATC  
 5401 GTGGCCTATT TCGCCGGACC GTCGCTGAAC TTCGCCGACT TCACCCGCAA TGCCCCTTCT  
 5461 GAAGCCTCCG TGAAGAAGGG AAACGCCCTC GGCCTCCTGA TTAACGCCAT CGCCTTCGGC

5521 ATCATCTCAG TCGTGATTGC GCTTGCATCC GTGAAAGTCT ACGGAGAGGC GATCCATGAT  
 5581 CCCATCGCCC TGCTCGCAGA CATCGACAGC ATCACGCTGC TTCTCATCGC CATCATCGCC  
 5641 GTGAGTCTGG CCACCGCAGG CATCAACATC ATTCTGAACT TCGTCTCCCC GGTCTATGAC  
*hyuP* 5701 CTCATCAACG TATGGCCCAA GGCCTTTACC TTCCGCAGCG CCGGCGTGCT CGTCGCCGTA  
 5761 CTGGCCATCG TCATCACACC CTGGAACCTG TTCGCGAACC CAGTCATCGT CAACCAGTTC  
 5821 GTCGGAGGCG TAGGCGCTCT CATGGGACCG CTCTTCGGCG TGATCATGAC CGATTACTAC  
 5881 CTGGTCAAGA AGTGCCACAT TCGGACCGAT GAACTCTTCA ACGCCGAACC GACCGGCCTT  
 5941 TACTACTACA CCAAGGGATA CAATCCCAAG GCTGTTTGGT CCCTGCTAGT GGCAGGCCTT  
 6001 TTCACGATCG G

Abkürzung	Strukturgen	Position, [bp]
<i>orf1</i>	potentielles Repressorprotein	1 bis 552
<i>hyuC<sub>L</sub></i>	L-Carbamoylase	945 bis 2201
<i>hyuC<sub>D</sub></i>	D-Carbamoylase	2262 bis 3209
<i>hyuH</i>	D-Hydantoinase	3242 bis 4615
<i>hyuP</i>	Permease	4705 bis 6011

Start- und Stopcodons sind *kursiv* formatiert.