Über die Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen aus *Phenylobacterium immobile* Stamm E

On the Rieske non-heme iron oxygenases of *Phenylobacterium immobile* strain E

Von der Fakultät 4: Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung.

Vorgelegt von

Andreas Hunold

aus Oberhausen

Hauptberichter:	Prof. Dr. Bernhard Hauer
Mitberichter:	Prof. Dr. Karl-Heinrich Engesser
Vorsitzender:	Prof. Dr. Ralf Takors

Tag der mündlichen Prüfung: 02.12.2019

Institut für Biochemie und Technische Biochemie der Universität Stuttgart

Abteilung Technische Biochemie

- 2019 -

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer am Institut für Biochemie und Technische Biochemie an der Universität Stuttgart angefertigt. Die experimentellen Arbeiten entstanden im Zeitraum vom Januar 2016 bis Dezember 2018 und wurden finanziell unterstützt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des Projektes PowerCART (Förderkennzeichen: 031B0369A).

Erklärung über die Eigenständigkeit der Dissertation

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Über die Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen aus *Phenylobacterium immobile* Stamm E“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Des Weiteren bestätige ich ausdrücklich, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Institution zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Declaration of Autorship

I hereby declare that the present thesis entitled “On the Rieske non-heme iron oxygenases of *Phenylobacterium immobile* strain E” is the result of my own work, that all sources used or quoted have been indicated, and that I have not used any illegitimate means. I further declare that I have not submitted this thesis for a degree in some form or another.

Stuttgart, 01.07.2019

Andreas Hunold

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Personen bedanken, die mich in der Zeit der Arbeit begleitet, unterstützt und gefördert haben.

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hauer, der mir die Möglichkeit gegeben hat mich mit diesem faszinierenden Bakterium zu beschäftigen. Ich danke auch für die stete Unterstützung durch gute Ideen und konstruktive Gespräche, die mir durch die vermittelte Erfahrung einen neuen Blick auf die Dinge gewährten.

Bei Dr. Bettina Nestl und Dr. Bernd Nebel möchte ich mich für die Unterstützung in Fragen der Analytik bedanken. Besonders möchte ich mich bei Dr. Bernd Nebel für seine Hilfe bei der Auswahl und dem Aufbau der Sauerstoffmesszelle bedanken. Unsere Versuche und Ansätze, um Reproduzierbarkeit zu erreichen, sind mir im Gedächtnis geblieben.

Dr. Wendy Escobedo möchte ich dafür danken, dass sie sich stets die Zeit für meine Probleme und Ideen im Laboralltag nahm und mich bei allen Projekten unterstützte.

Ich möchte mich bei Sven Richter für seine stetige Hilfe und Unterstützung insbesondere bei verschiedenen Fermentationen und Proteinaufreinigungen bedanken.

Meinen Studenten Elsa Potoudis und Daniela Resende danke ich für ihr Engagement und ihren Enthusiasmus bei der Unterstützung des Projektes.

Ich danke Dr. Sandra Facey für die Hilfe bei der Einarbeitung in das Projekt.

Ich möchte Lenz Lorenz für die Hilfe bei der Erstellung der Homologie-Modelle danken.

Ich danke dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projektes PowerCART (Förderkennzeichen: 031B0369A).

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Institutes möchte ich für die schöne Zeit und die tolle Arbeitsatmosphäre danken. Besonders möchte ich mich bei meinen gemeinsamen Bewohnern der Wellness Oase bedanken: Dr. Jan Klenk, Max-Philipp Fischer und Jwizz. Danke für die gemeinsame Zeit und danke für die vielen gesungenen Lieder - *It's gonna take a lot to drag me away from you*. Auch möchte ich mich bei Andreas Schneider, Peter Heinemann und Lea Rapp bedanken. Zum einen

für die geballte fachliche Kompetenz. Aber auch weil die vielen gemeinsamen Feierlichkeiten, und auch Tauchgänge, die Zeit in Stuttgart mit zu der schönen Zeit gemacht haben, die sie war.

Abschließend möchte ich meiner Familie danken, die mir stets Rückhalt gibt und mir ein sicherer Heimathafen ist.

Allein der gesunde Menschenverstand, ein so respektabler Geselle er auch in dem hausbackenen Gebiet seiner vier Wände ist, erlebt ganz wunderbare Abenteuer, sobald er sich in die weite Welt der Forschung wagt.

- Friedrich Engels

Inhaltsangabe

1 Einleitung 1
1.1 Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen 2
1.1.1 Funktionsweise 2
1.1.2 Klassifizierungssysteme 4
1.1.3 Initialer Schritt im Katabolismus 7
1.1.4 Biotechnologische Bedeutung 10
1.2 Phenylobacterium 13
1.2.1 *Phenylobacterium immobile* 14
1.2.2 Katabolismus 16
1.2.3 Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenase aus Stamm E 17
1.3 Motivation 19
2 Material und Methoden 20
2.1 Material 20
2.1.1 Chemikalien 20
2.1.2 Enzyme 20
2.1.3 Verwendete Kits 20
2.1.4 Nährmedien 21
2.1.5 Puffer und Lösungen 23
2.1.6 Verwendete Organismen 24
2.1.7 Verwendete Plasmide 24
2.1.8 Oligonukleotide 25
2.2 Mikrobiologische Arbeiten 28
2.2.1 Kultivierung von *P. immobile* 28
2.2.2 Kontrolle der *P. immobile* Kulturen 29
2.2.3 Sublimationstrockung von geernteten Zellen 29
2.2.4 Heterologe Proteinexpression in *Escherichia coli* 29
2.3 Molekularbiologische Arbeiten 31
2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion 31
2.3.2 Elektrophoretische Trennung und Gelextraktion von DNA-Fragmenten 32
2.3.3 Isothermaler Zusammenbau nach Gibson 32
2.3.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen 34
2.3.5 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock 34

2.3.6 Plasmidpräparation und Sequenzierung 34
2.4 Proteinchemische Arbeiten 35
2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bicinchoninsäure-Test 35
2.4.2 SDS-PAGE 35
2.4.3 CN-PAGE 36
2.4.4 Proteomanalyse 36
2.4.5 Aufreinigung der Redoxpartner 37
2.4.6 Triton X-100-Aufschluß nach Rosenberg 39
2.4.7 Ionenaustauschchromatographie 39
2.5 Biotransformationen 40
2.5.1 Analytische Biotransformationen *in vitro* 40
2.5.2 Analytische Biotransformationen *in vivo* 40
2.5.3 Biotransformationen mit *P. immobile* 41
2.6 Analytische Methoden 41
2.6.1 Flüssigchromatographische Analyse 41
2.6.2 Gaschromatographische Analyse 43
2.6.3 Sauerstoffmessung 44
2.7 Bioinformatische Methoden 46
2.7.1 Basic Local Alignment Search Tool 46
2.7.2 Multiples Sequenzalignment 46
2.7.3 Homologie-basierte Proteinmodellierung 46
3 Ergebnisse 48
3.1 Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen 48
3.1.1 Sequenzidentität der α-Untereinheiten 49
3.1.2 Variable Sequenzregion 51
3.2 Kohlenstoffquellen 54
3.2.1 Umsetzung Pyrazon und Phenazon durch *P. immobile* E 54
3.2.2 Sauerstoffmessungen 55
3.2.3 Anzucht mit *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle 58
3.3 Proteomanalysen 60
3.3.1 Oligomerstruktur 60
3.3.2 Kohlenstoffquellen 61
3.3.3 Wachstumsbedingungen 64
3.4 Redoxpartner 65

3.4.1 Klonierung und Expression der Redoxpartner in *E. coli* 65
3.4.2 *In vitro* Biotransformationen 66
3.5 Rekonstitution der Aktivität 67
3.5.1 Klonierung und Expression 68
3.5.2 *In vivo* Biotransformationen 69
3.5.3 Optimierung der Expressions- und Reaktionsbedingungen 70
4 Diskussion 73
4.1 Substratspektrum 73
4.2 Klassifizierung der kodierten ROs 77
4.2.1 Fehlen eines Gen-Clusters 78
4.2.2 Redoxpartner 80
4.2.3 α-Untereinheiten 82
4.3 Substratspezifität 84
4.3.1 Variable Sequenzregion 84
4.3.2 Proteomanalysen 87
4.4 Ausblick 89
5 Literaturverzeichnis 91
6 Anhang 110
6.1 Sequenzen 110
6.2 Ionenaustauschchromatogramm 122
6.3 SDS-Gele 123
6.4 Standard-ROs 124

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	KOD	*Thermococcus kodakaraensis*
A	Amper	KPi	Kaliumphosphat
Å	Ångström	L	Liter
BFM	Biofeuchtmasse	LB	*Lysogeny Broth*
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	LC	engl. *liquid chromatography*
bp	Basenpaar	LD_{50}	mittlere letale Dosis
BSA	Rinderserumalbumin	M	Molar (mol L^{-1})
BSTFA	N,O-Bistrifluoroacetamide	m	Meter
CH	Schweiz	*m*/*z*	Masse durch Ladung
CV	engl. *column volume*	min	Stunde
Da	atomare Masseneinheit	mod.	modifiziert
DAD	Diodenarray-Detektor	MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
ddH_20	doppelt demineralisiertes Wasser	MTBE	Methyl-*tert*-butylether
DE	Deutschland	MWCO	engl. *molecular weight cut-off*
dH_20	destilliertes Wasser	*N. aromaticivorans*	*Nocardioides aromaticivorans*
DMSO	Dimethylsulfoxid	NAD(P)H	β-Nicotinamidadenin-dinukleotid(phosphate)
DNA	engl. *deoxyribonucleic acid*	OD	optische Dichte
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat	ORF	engl. *open reading frame*
DOx	Untereinheit x aus dem Genom von *P. immobile* E	*P. immobile*	*Phenylobacterium immobile*
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen	*P. resinovorans*	*Pseudomonas resinovorans*
DTT	Dithiothreitol	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
E. coli	*Escherichia coli*	PCR	*polymerase chain reaction*
engl.	englisch	PDB	engl.*protein data bank*
eV	Elektronenvolt	*r*	Primer *reverse*
f	Primer *forward*	RO	Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	rpm	Rotationen pro Minute
FID	Flammenionisationsdetektor	s	Sekunde
FMN	Flavinmononukleotid	s.	siehe
FNR	Ferredoxin-Reduktase	SDS	Natriumdodecylsulfat
g	Gramm	TAE	Tris-Acetat-EDTA
G6P	Glucose-6-Phosphat	TB	*terrific broth*
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	USA	engl. *United States of America*
GC	Gaschromatographie		
h	Stunde		
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid		
K_m	Michaeliskonstante		

Zusammenfassung

Phenylobacterium immobile zeichnet sich durch seine ungewöhnlichen Kohlenstoffquellen aus. Es verwendet Xenobiotika wie Pyrazon und Phenazon als einzige Kohlenstoffquellen, während es kein Wachstum auf Komplexmedien zeigt. Der initiale Schritt im Katabolismus ist die Oxidation der Substrate am unsubstituierten Aromaten zum *cis*-Dihydrodiol. Diese Reaktion wird in der Natur durch Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen (RO) katalysiert. Der Arbeit vorrangegangen ist die Sequenzierung des Typstammes *P. immobile* E, welche zeigte, dass im Genom 17 verschiedene α-Untereinheiten von ROs kodiert sind. Zwei weitere sind auf dem Plasmid des Stammes kodiert. Die hohe Anzahl an neuen Biokatalysatoren, sowie ihr ungewöhnliches Substratspektrum, gaben den Anlass zu der vorliegenden Arbeit.

Das Substratspektrum der *P. immobile*-Zellen wurde durch Sauerstoffmessungen charakterisiert. Die kinetischen Werte der Substrate variierten dabei in Abhängigkeit zur Kohlenstoffquelle des Stammes. Daraufhin wurde der Stamm auf drei Substraten angezogen (Pyrazon, Phenazon und *L*-Phenylalanin) und das Proteom auf die exprimierten α-Untereinheiten hin untersucht. Es konnten 16 der 19 α-Untereinheiten im Proteom detektiert werden. Das Expressionslevel der α-Untereinheiten verhält sich dabei dynamisch in Abhängigkeit von Kohlenstoffquelle und Expressionsbedingung. Eine der auf dem Plasmid kodierten α-Untereinheiten (bezeichnet als DO30) wird nach Wachstum mit den Kohlenstoffquellen Pyrazon und Phenazon besonders stark exprimiert. So können in den Proteomanalysen 42,9 ± 2,4 % (Pyrazon) und 48,8 ± 4,0 % (Phenazon) der Gesamtheit aller Peptide von α-Untereinheiten der α-Untereinheit DO30 zugeordnet werden.

Eine erste bioinformatische Analyse zeigte, dass 15 der 19 α-Untereinheiten eine sehr hohe Sequenzidentität von 63,7 – 89,0 % zu einander aufwiesen. Sie unterscheiden sich primär in einer variablen Sequenzregion anhand derer sie sich in zwei Gruppen unterteilen lassen. Bei den acht Vertretern der Gruppe 1 besteht der variable Sequenzbereich aus etwa 25 – 28 Aminosäuren (zugeordnete α-Untereinheiten: DO14, DO15, DO16, DO17, DO18, DO21, DO22, DO30). Die sieben Vertreter der Gruppe 2 besitzen hier einen Deletionsbereich von 11 - 23 Aminosäuren (zugeordnete α-Untereinheiten: DO4, DO7, DO8, DO9, DO10, DO23, DO29). Homologie-Modelle von Vertretern jeder Gruppe konnten zeigen, dass es sich bei der variablen Sequenzregion um einen Bereich über dem katalytisch aktiven Eisen handelt. Zwei

weitere der α-Untereinheiten (DO6 und DO11) besitzen nur eine geringe Sequenzidentät von 19,2 - 23,6 % mit den den übrigen α-Untereinheiten. Die anderen zwei α-Untereinheiten (DO2 und DO31) besitzen starke Sequenzdeletionen, weshalb sie wahrscheinlich nicht mehr katalytisch aktiv sind.

Um die Quartärstruktur der Oxygenasekomponenten zu bestimmen, wurde der Rohextrakt der Bakterien durch eine Native-PAGE aufgetrennt und mit einer Proteomanalyse untersucht. Die 15 sequenzhomologen α-Untereinheiten liegen in den Zellen als ein Heteromer mit der Quartärstruktur $\alpha_3\beta_3$ vor. Von heteromeren Oxygenasen war bisher bekannt, dass sich α-Untereinheit und β-Untereinheit immer zusammen in einem Gen-Cluster im Genom finden. Im Genom des Stammes E findet sich das Gen der β-Untereinheit getrennt von den über das Genom verteilten Genen der 19 α-Untereinheiten. Ebenfalls finden sich die möglichen Elektronentransportproteine nicht in einer Operon-Struktur zusammen mit der Oxygenasekomponente, sondern sie sind im Genom verstreut. Um eine Zuordnung der Elektronentransportproteine zu den Oxygenasekomponenten zu ermöglichen, wurden die Gene der Elektronentransportproteine in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und gemeinsam mit den aufgereinigten Oxygenasekomponenten aus *P. immobile* auf Aktivität getestet. Ferredoxin 4 und Ferredoxin-Reduktase 2 zeigten die stärkste Produktbildung mit dem Substrat Phenazon und wurden deshalb für die folgenden Arbeiten ausgewählt.

Abschließend wurde eine Plasmidbibliothek erstellt, die alle α-Untereinheiten auf getrennten Plasmiden enthielt. Die α-Untereinheiten wurden gemeinsam mit der β-Untereinheit und den gewählten Elektronentransportproteinen heterolog in *E. coli* exprimiert. In Biotransformationen mit *E. coli*-Zellen, in welchen die α-Untereinheit DO16 exprimiert wurde, konnte nach Zugabe der Substrate Pyrazon und Phenazon die Bildung des Dihydrodiol detektiert werden. DO16 besitzt eine Sequenzidentität von 89,0 % mit der α-Untereinheit DO30, welche im Proteom überwog.

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit sollen im Weiteren auf andere ROs übertragen werden, um die entdeckte Sequenzvariabilität zur Modifikation der Substratspezifität von ROs zu nutzen. Als erstes Modell wird hierfür die Cumol-Dioxygenase von *Pseudomonas fluorescens* IP01 dienen, welche am Institut für Technische Biochemie bereits erforscht wird und eine variable Region über dem über dem katalytisch aktiven Eisen ähnlich der α-Untereinheiten aus *P. immobile* E besitzt.

Abstract

Phenylobacterium immobile is characterised by its unique carbon sources, as it growths on xenobiotics like phenazon and pyrazon. The initial degradation step in its catabolism is the *cis*-dihydroxylation of the phenyl moiety by a Rieske non-heme oxygenase (RO). Previously to this work, the genome of the type strain *P. immobile* E was sequenced. Genomic sequencing revealed that 17 different α-subunits of ROs are coded in the genome. Two others are coded on the plasmid of the strain. The high amount of new biocatalyst, as well as their unusual substrate spectrum, gave the cause to study these ROs.

The substrate spectrum of the *P. immobile* cells was characterised by oxygen measurements. The kinetic data for the substrates varied depending on the carbon source the strain was grown on. To check how many of the α-subunits were expressed by the bacterium, the proteome of *P. immobile* was analysed after the growth on three substrates (pyrazon, phenazon, and *L*-phenylalanine). In the proteome 16 out of 19 α-subunits were detected. However, the expression level of the α-subunits depended on carbon source and expression conditions. One of the α-subunits coded on the plasmid (referred to as DO30) is strongly expressed after growth with the carbon sources pyrazone and phenazone. Thus, in proteome analyses 42.9 ± 2.4 % (pyrazone) and 48.8 ± 4.0 % (phenazone) of all peptides of α-subunits can be assigned to the α-subunit DO30.

Bioinformatic analyses showed that 15 out of 19 α-subunits have an increased sequence identity of 63.7 – 89.0 % among each other. By a variable sequence region this 15 α-subunits can be classified into two groups. For the eight representatives of group 1, the variable sequence region consists of about 25 - 28 amino acids (assigned α-subunits: DO14, DO15, DO16, DO17, DO18, DO21, DO22, DO30). The seven members of group 2 have a deletion of 11 - 23 amino acids in this region (assigned α-subunits: DO4, DO7, DO8, DO9, DO10, DO23, DO29). Homology models on a representative of each group revealed that the variable sequence region is a region above the catalytic active iron. Two of the 19 α-subunits (DO6 and DO11) share a low sequence identity of 19.2 – 23.6 % with the other α-subunits, and two α-subunits (DO2 and DO31) have strong sequence deletions, which suggests they are not catalytically active anymore.

To determine the quaternary structure of the oxygen component, the crude extract of the bacterium was separated by Native-PAGE and analysed by proteome analysis. The results showed that the 15 sequence-homologous α-subunits exist as heteromers with a quaternary structure of $\alpha_3\beta_3$ in the cells. It is known from the literature that the α-subunit and β-subunit are always clustered together in the genome. In contrast, in the genome of *P. immobile* 19 α-subunits genes are scattered throughout the genome isolated from a single β-subunit. Also, the possible electron transport proteins are not found in an operon structure together with the oxygenase component, but are scattered in the genome. In order to assign the electron transport proteins to the oxygenase components, the genes of the electron transport proteins were expressed in *E. coli*, purified and tested for activity together with the purified oxygenase components from *P. immobile*. Ferredoxin 4 and Ferredoxin reductase 2 showed the strongest product formation with the substrate phenazone and were therefore selected for the following work.

Finally, a plasmid library was created containing all α-subunits on separate plasmids. The α-subunits were heterologously expressed in *E. coli* together with the β subunit and the selected electron transport proteins. In biotransformations with *E. coli* cells, in which the α-subunit DO16 were expressed, after the addition of the substrates pyrazone and phenazone the formation of the dihydrodiol was detected. DO16 has a sequence identity of 89.0 % with the α-subunit DO30, which predominated in the proteome.

The findings from this work will be transferred to other ROs in order to use the discovered sequence variability to modify the substrate specificity of ROs. The first model to be used is the cumene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens* IP01, which is already being investigated at the Institute of Technical Biochemistry and has a variable region above the catalytically active iron similar to the α-subunits of *P. immobile* E.

1 Einleitung

Die asymmetrische Dihydroxylierung von Olefinen ist eine wichtige Reaktion in der pharmazeutischen und chemischen Industrie. Die vicinalen *cis*-Diole dienen hier als chirale Auxiliare und Synthesebausteine.[1–4] 2001 wurde der Chemie-Nobelpreis an Barry Sharpless vergeben, der sich um die Entwicklung von chiralen Katalysatoren für die Oxidation verdient gemacht hat. Die sogenannte Sharpless-Dihydroxylierung ermöglicht die enantioselektive Darstellung von vicinalen *cis*-Diolen durch die Verwendung von Osmium(VIII)-oxid in Anwesenheit eines chiralen Liganden zur Steuerung der Stereoselektivität.[5]

Die Bildung von vicinalen *cis*-Diolen ist aber auch aus der Bioremediation bekannt. Beim bakteriellen Abbau von aromatischen Kohlenwasserstoffen in der Umwelt wird die Dihydroxylierung des Aromaten beobachtet.[6] Bereits 1968 konnte die Bildung des *cis*-Dihydrodioles bei Wachstum des Stammes *Pseudomonas putida* F1 mit Benzol als Kohlenstoffquelle beobachtet werden.[7] In Bakterienzellen wird diese Reaktion durch ein Multikomponentensystem, den Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen (ROs), katalysiert. Ihre natürliche Reaktion ist in Abbildung 1-1 dargestellt.

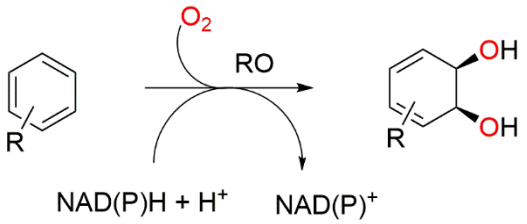

Abbildung 1-1: Enantioselektive *cis*-Dihydroxylierung durch ROs.

Die Oxidation ermöglicht die Aufhebung der Aromatizität des Ringsystems, wodurch die Substanz den Folgeenzymen des bakteriellen Katabolismus zur Verfügung steht.[8] Die Nutzbarkeit dieses Enzymsystems in industriellen Prozessen wurde bereits durch Merck bei der Synthese des HIV-Proteaseinhibitors Indinavir (Crixivan®) oder durch Imperial Chemical Industries bei der Synthese von Polyphenylen gezeigt.[9,10] Dennoch bleibt eine Anwendung dieses Enzymsystems durch die geringe Anzahl zur Verfügung stehender Biokatalysatoren und einer damit einhergehenden Beschränkung des Substratspektrums begrenzt.

Das α-Proteobakterium *Phenylobacterium immobile* wurde erstmals 1969 in Bodenproben als Abbauer des Herbizids Pyrazon entdeckt. *P. immobile* verwendet Xenobiotika wie das Herbizid Pyrazon oder das Analgetikum Phenazon als einzige Kohlenstoffquelle, während es kein Wachstum auf Komplexmedien zeigt. Der erste Schritt im Katabolismus dieses Bakteriums ist die Oxidation des Aromaten durch ROs.[11] Die Sequenzierung des Genomes im Jahr 2015 zeigte, dass im Genom 19 verschiedene ROs kodiert sind, die nur eine geringe Ähnlichkeit zu bereits bekannten RO-Systemen aufweisen.[12] Die hohe Anzahl an neuen Biokatalysatoren, sowie ihr ungewöhnliches Substratspektrum, gaben den Anlass zu der vorliegenden Arbeit. Im ersten Teil der Einleitung werden zunächst die Funktionsweise (1.1.1) und der Aufbau (1.1.2) von ROs vorgestellt, sowie ihre Rolle in der Natur (1.1.3) und ihre Anwendung in der Biotechnologie (1.1.4). Im zweiten Teil der Einleitung folgt eine Beschreibung des Bakteriums *Phenylobacterium immobile*.

1.1 Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen

Oxygenasen katalysieren den direkten Einbau von Sauerstoff in ein organisches Substrat. Sie gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen und werden in Dioxygenasen (EC 1.13), welche den Einbau von molekularem Sauerstoff in einen einzelnen Donoren katalysieren, und Monooxygenasen (EC 1.14), welche die Umsetzung von zwei Donoren bei Reduktion oder Einbau von molekularem Sauerstoff katalysieren, unterschieden.

1.1.1 Funktionsweise

Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen (ROs) sind Multikompontensysteme, welche aus einem oder zwei Elektronentransportproteinen und einer Oxygenase bestehen.[13] Die löslichen Elektronentransportproteine (eine Reduktase und gegebenenfalls ein Ferredoxin) übertragen in der Zelle Elektronen vom reduzierten Cofaktor NAD(P)H auf die katalytische aktive Oxygenasekomponente. Eine detailliertere Darstellung der Elektronentransportproteine ist in Abschnitt 1.1.2 gegeben. Die Oxygenasekomponente kann auf Ebene der Quartärstruktur in Homo- (α_3 und α_6) und

Heterooligomere ($\alpha_3\beta_3$) unterschieden werden.[14,15] Dabei ist immer die α-Untereinheit katalytisch aktiv und die β-Untereinheit erfüllt nur eine strukturgebende Rolle. Die α-Untereinheit trägt ein [2Fe-2S] Cluster, welches in einem Rieske Cluster durch zwei Histidine und zwei Cysteine koordiniert ist. Das Sequenzmotiv **C**-X-**H**-$X_{16,17}$-**C**-X_2-**H** der Rieske Domäne ist hochkonserviert.[16] Es nimmt die Elektronen auf und überträgt es auf das katalytisch aktive, mononukleare Eisen.[17]

Die Naphthalin-1,2-Dioxygenase (NDO) aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 war die erste RO deren Kristallstruktur gelöst wurde und ist die in der Literatur am besten beschriebene RO.[16,17] Im Folgenden wird an ihr stellvertretend die Funktionsweise von ROs dargestellt. Es handelt sich um ein Dreikomponentensystem. Die Oxygenasekomponente besitzt die Quartärstruktur $\alpha_3\beta_3$. Innerhalb der Quartärstruktur beträgt der Abstand zwischen dem Rieske Cluster einer α-Untereinheit und dem mononuklearen Eisen der Nachbaruntereinheit 12 Å, während der Abstand innerhalb einer α-Untereinheit 45 Å beträgt. Ein Eisen des [2Fe-2S] Cluster wird durch zwei Cysteine (C81 und C101) koordiniert, das andere durch zwei Histidine (H83 und H104). Das katalytisch aktive Eisen wird durch zwei Histidine (H208 und H213) und dem zweizähnigen Liganden Aspartat (D362) koordiniert.[18] Das Aspartat D205 bildet Wasserstoffbrücken zwischen H104 (Rieske Cluster) und H208 (katalytisch aktives Eisen der benachbarten Untereinheit) aus und ermöglicht so wahrscheinlich den Elektronentransfer.[19] Der Reaktionsmechanismus der *cis*-Dihydroxylierung von Naphthalin ist in Abbildung 1-2 gezeigt.

In einem ersten Schritt (**I**) wird das Substrat gebunden und der oktaedrisch koordinierte Eisen(II)-Komplex lagert sich durch Eliminierung des Wasserliganden zu einem quadratisch-pyramidalen Komplex um. Im zweiten Schritt (**II**) bindet O_2. Die Co-Kristallistation von NDO und O_2 (PDB: 107N) konnte die *side-on*-Bindung des Sauerstoffs zeigen, welcher im Weiteren die enantiomerenreine *cis*-Diol Bildung ermöglicht.[20] Nach der O_2-Bindung erfolgt der Elektronentransfer vom Rieske Cluster, wodurch ein Peroxid-Komplex gebildet wird, der durch Protonierung und Abspaltung des Wasserliganden in einen Hydroperoxid-Komplex (Fe(III)-OOH) überführt wird. Dieses Intermediat wurde durch Röntgenkristallographie bestätigt.[20] Über welches Intermediat die Bildung des Eisen(III)-Alkoxyhydroxynaphthalin-Komplex führt ist nicht geklärt. Die Spaltung der Sauerstoffbindung und die Oxidation des Substrates können gleichzeitig stattfinden (Eisen(IV)-Komplex (**IIIa**)) oder die Spaltung der

Sauerstoffbindung (Eisen(V)-Komplex) und die Oxidation des Substrates (Eisen(IV)-Komplex) laufen sukzessive ab (**IIIb**).[16,21] Im **IV** Schritt wird der Eisen(III)-Alkoxyhydroxynaphthalin-Komplex erst durch ein weiteres Elektron des Rieske Clusters zum Alkoxid reduziert. Die nachfolgende Protonierung führt zur Freisetzung des Produktes. Die Bindung zweier H_2O-Moleküle führt zur Regeneration des Katalysators.

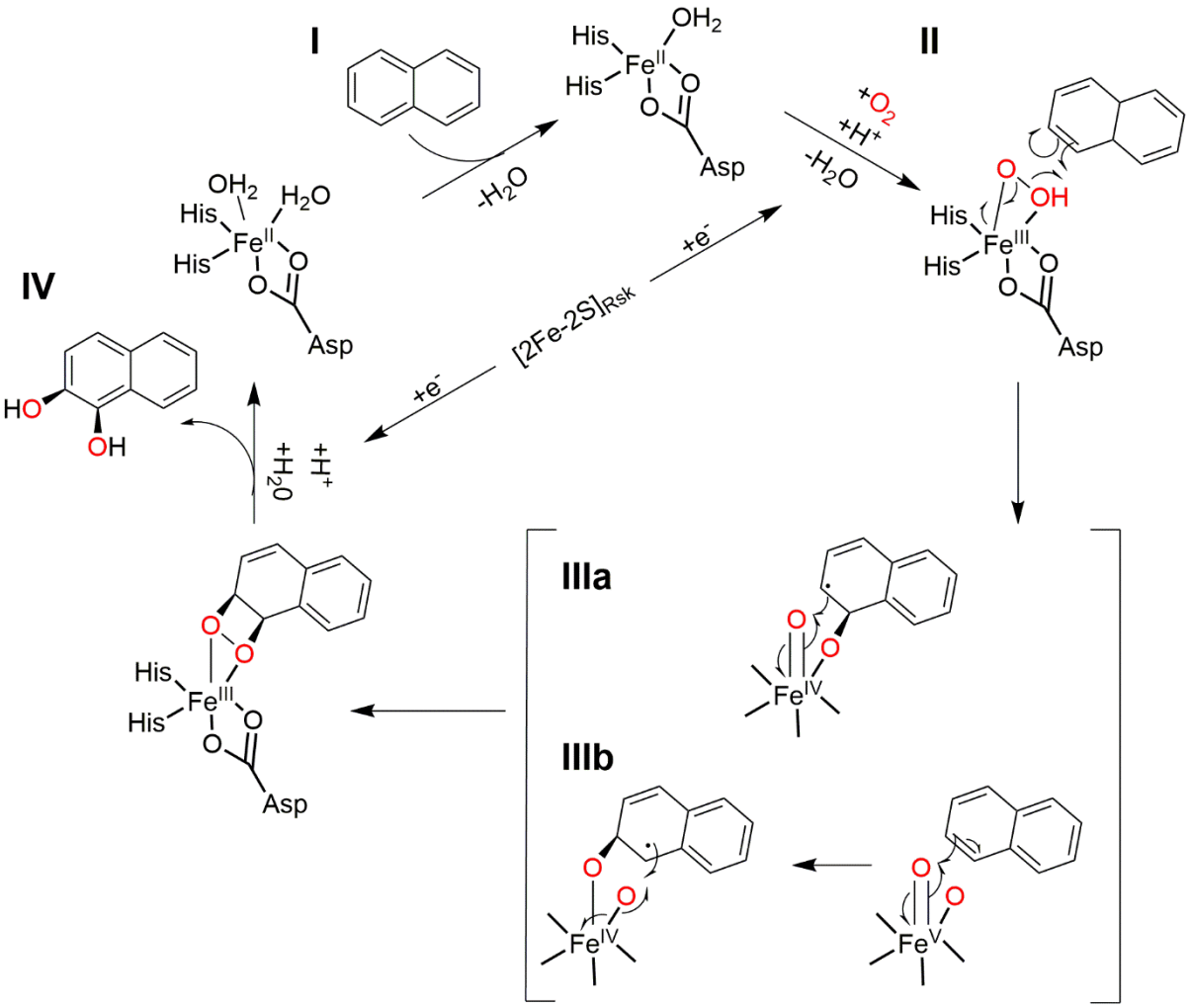

Abbildung 1-2: Möglicher Reaktionsmechanismus für die Dihydroxylierung durch ROs. (mod. nach [16,21])

1.1.2 Klassifizierungssysteme

Eine erste Gliederung dieser Systeme erfolgte 1991 durch Batie und Kollegen.[22] Sie unterschieden diese anhand der Anzahl der Elektronentransportproteine und deren prosthetischen Gruppen (FAD/FMN/[2Fe-2S]) in drei Klassen (vgl. Tabelle 1-1). ROs der Klasse I sind zwei Komponentensysteme bestehend aus einer Oxygenasekomponente und einer Reduktase, welche ein Flavin und ein

Eisen-Schwefel-Cluster trägt. Klasse II umfasst drei Komponentensysteme, in denen das Flavin und das [2Fe-2S] Cluster getrennt auf Reduktase und Ferredoxin vorliegen. In der Klasse III sind Dreikomponentensysteme eingeordnet, welche eine Reduktase, die das Flavin und das [2Fe-2S] Cluster trägt, und ein zusätzliches Ferredoxin mit [2Fe-2S] Cluster besitzen.[22]

Werlen und Kollegen zeigten 1996, dass fast alle Komponenten, der damals bekannten ROs, sich phylogenetisch in vier Familien aufteilen. 2000 schlugen Nam und Kollegen ein Klassifizerungssystem für ROs vor, dass sich nicht mehr auf die Art und Anzahl der Redoxpartner bezieht, sondern sich nach der phylogenetischen Einordnung der α-Untereinheit richtet. Sie klassifizierten 54 Oxygenasekomponenten in vier Gruppen, denen sie ein bestimmtes Substratspektrum zuordneten. In die erste Gruppe fallen Oxygenasen mit geringer Homologie und einem breiten Substratspektrum. Die Gruppe 2 umfasste Benzoat- und Toluat-Dioxygenasen. Die Gruppe 3 umfasst Dioxygenasen, die Naphthalin und andere polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe als Substrat umsetzen. Die Dioxygenasen der Gruppe 4 akzeptieren Benzol, Toluol und Biphenyl als Substrate. Vorteil dieser Klassifizierung ist, dass keine Informationen mehr über die zugehörigen Elektronentransportproteine nötig sind. Zur Klassifizierung reicht die Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes.

Im Jahr 2008 präsentierten Kweon und Kollegen ein neues Klassifizierungsystem, welches auf der Phylogenese der α-Untereinheit aufbaut, und diese mit der Zusammensetzung der Enzymkomponenten verknüpft. Diese systematische Klassifizierung umfasst fünf Typen (Tabelle 1-1).[23] Typ I Systeme sind Zweikomponentensysteme bestehend aus einer Reduktase und einer Oxygenase, welche entweder ein Homo-Oligmer (Typ Iα) oder Hetero-Oligomer (Typ Iαβ) sein kann. Die Reduktase ist eine Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase (FNR), welche das [2Fe-2S] Cluster am N-Terminus der Flavinbindedomäne trägt (vgl.

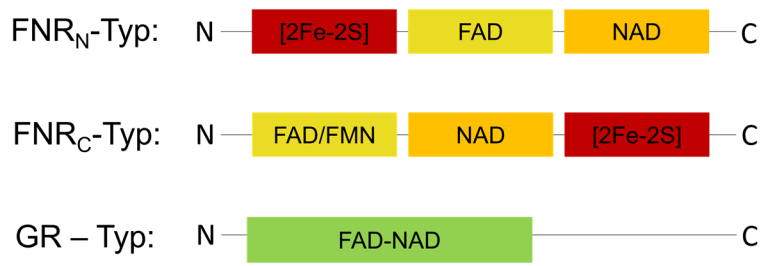

Abbildung 1-3: Anordnung der konservierten Domänen. Ferredoxin-NADP⁺-Reduktasen (FNR) werden anhand der Anordnung ihrer Domänen unterschieden. FNR$_N$-Typ: [2Fe-2S] ist N-terminal gebunden. FNR$_C$-Typ: [2Fe-2S] ist C-terminal gebunden. GR: Glutathion-Reduktase;. FAD/FMN: Flavin-Bindedomäne; NAD: NADP(H)-Bindedomäne. (mod. nach [23])

Abbildung 1-3). Typ II beinhaltet Zweikomponentensysteme, welche aus einer heteromeren Oxygenase und einer FNR_C-Reduktase bestehen. Die ROs in Typ III besitzen zusätzlich zu Oxygenase (Homo- und Heteromere) und FNR_C-Reduktase ein Ferredoxin, welches die Elektronen zwischen Reduktase und Oxygenase überträgt. Das Ferredoxin hat ein Rieske [2Fe-2S] Cluster gebunden. Kweon und Kollegen vermuten, dass Typ III den evolutionären Übergang von Zweikomponentensystemen zu Dreikomponentensystemen beschreibt, in denen ein Ferredoxin mit Eisen-Schwefel-Cluster die Elektronen zwischen Reduktase und Oxygenase überträgt. Die Reduktasen in Typ IV und V besitzen selbst kein Eisen-Schwefel-Cluster mehr. Der Typ IV repräsentiert Dreikomponentensysteme, welche aus einer Oxygenase, einem [2Fe-2S] Ferredoxin und einer Glutathion-Reduktase bestehen. Sie umfasst die meisten bekannten RO-Enzymsysteme.[23]

In Gruppe V fallen Dreikomponentensysteme mit einer Oxygenase, Glutathion-Reduktase und einem Ferredoxin, welches ein [3Fe-4S] Cluster trägt. Die Oxygenasen in Gruppe V besitzen Eigenschaften, die den vorherigen Klassifizierungssystemen unbekannt waren. Die Gene der Elektronentransportproteine sind nicht immer in der Nähe des Oxygenasegenes auf dem Genom kodiert (*genetic discreteness*) und mehrere Oxygenasen teilen sich eine begrenzte Zahl an Elektronentransportproteinen (*numeric imbalance*). In ihrer Publikation nannten Kweon und Kollegen ein Set von 25 Standard-ROs, die dem Anwender des Klassifizierungssystems eine einfache phylogenetische Einordnung der Oxygenase ermöglichen soll. Chakraborty und Kollegen ergänzten 2012 das Klassifizierungssystem um vier weitere Klassen.[24] Kweon und Kollegen kannten für Klasse II und IV nur Heteromere als Oxygenasekomponenten. Diese wurden um die Klassen IIα und IVα ergänzt, für die aber jeweils nur ein Vertreter bekannt ist. In der Gattung Rhodococcus konnten ROs gefunden werden, die ein Rubredoxin (Seqeunzmotiv: **C**-X_2-**C**-X_n-**C**-X_2-**C**) als Elektronentransportprotein nutzen. Diese gründeten die neue Klasse VI. In der neuen Klasse VII werden ROs zusammengefasst, die ein Ferredoxin mit *plant-type* [2Fe-2S] Cluster besitzen. In *plant-type* [2Fe-2S] Clustern werden die zwei Eisenmoleküle durch vier Cysteine koordiniert. Die Domäne besitzt das konservierte Sequenzmotiv **C**-$X_{4,5}$-**C**-X_2-**C**-X_n-**C**. Eine Übersicht über die Klassen mit einer RO als Beispiel ist in Tabelle 1-1 gegeben.

Tabelle 1-1: Klassifizierung von Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen entsprechend ihrer Elektronentransportproteine. (mod. nach [24])

Batie (1991) [22]	Kweon (2008) [23]	Chakraborty (2012) [24]	Struktur				Beispiel
			Oxygenase		Ferredoxin*	Reduktase**	
I	**Iαβ**	**Iαβ**	α	β	-	FNR_N-Typ	Anilin-Dioxygenase (*Acinetobacter* sp. YAA)
	Iα	**Iα**	α	-	-	FNR_N-Typ	Phthalat-Dioxygenase (*Burkholderia cepacia* DB01)
	II	**IIαβ**	α	β	-	FNR_C-Typ	Benzoat-1,2-Dioxygenase (*Acinetobacter* sp. ADP1)
	-	**IIα**	α	-	-	FNR_N-Typ	Dihydroquinolin-8-Monoox. (*Pseudomonas putida* 86)
III	**IIIαβ**	**IIIαβ**	α	β	$[2Fe\text{-}2S]_{Rsk}$	FNR_C-Typ	Naphthalin-1,2-Dioxygenase (*Pseudomonas* sp. 9816-4)
	IIIα	**IIIα**	α	-	$[2Fe\text{-}2S]_{Rsk}$	FNR_C-Typ	Carbazol-1,9a-Dioxygenase (*P. resinovorans* CA10)
II	**IV**	**IVαβ**	α	β	$[2Fe\text{-}2S]_{Rsk}$	GR-Typ	Biphenyl-Dioxygenase (*Pseuomonas* sp. KKS102)
-	**-**	**IVα**	α	-	$[2Fe\text{-}2S]_{Rsk}$	GR-Typ	Carbazol-Dioxygenase (*N. aromaticivorans* IC177)
-	**V**	**Vαβ**	α	β	[3Fe-4S]	GR-Typ	Phenanthren-Dioxygenase (*Nocardiodies* sp. KP7)
-	**-**	**VIαβ**	α	β	$[Fe]_{Rub}$	?	Inden-Dioxygenase (*Rhodococcus* sp. I24)
-	**-**	**VIIα**	α	-	$[2Fe\text{-}2S]_{PT}$	GR-Typ	Carbazol-Dioxygenase (*Sphingomonas* sp. KA1)

*$[2Fe\text{-}2S]_{Rsk}$ = Cys_2His_2-Koordination des [2Fe-2S] Cluster; $[Fe]_{Rub}$ = Cys_4-Koordination des [Fe]; $[2Fe\text{-}2S]_{PT}$ = Cys_4-Koordination des des [2Fe-2S] Cluster. **Für Aufbau und Bezeichnung der Reduktasen s. Abbildung 1-3.

1.1.3 Initialer Schritt im Katabolismus

ROs können in allen drei Domänen des Lebens gefunden werden.[25] Die in eukaryotischen Systemen gefundenen ROs spielen eine Rolle im Anabolismus. In *Arabidopsis thaliana* konnten fünf ROs entdeckt werden, von denen vier an der Chlorophyll-Biosynthese beteiligt sind.[26] Bei der RO namens DAF-36/Neverland (Nvd) handelt es sich um eine Cholesterol-7,8-Dehydrogenase, welche in verschiedenen eukaryotischen Systemen wie Insekten, Zebrafischen und Fröschen gefunden werden konnte.[14,27]

Die meisten literaturbekannten ROs stammen aus Prokaryoten. Hier finden sie sich vorallem in (α-, β-, und γ-) Proteobakterien und in der Ordnung der *Actinomycetales*.[24] In bakteriellen Systemen sind sie Teil des Katabolismus und katalysieren den initialen Schritt.[16]

Durch die thermodynamische Stabilität des aromatischen Systems besitzen Arene eine hohe Beständigkeit in der Natur. Deshalb besitzen auch viele akkumulierende Schadstoffe in der Umwelt aromatische Ringstrukturen.[8] Dennoch besitzen einige Prokaryoten wie das α-Proteobakterium *P. immobile* die Fähigkeit diese als Kohlenstoffquelle zu nutzen.[11] Die Fähigkeit hierzu entwickelten sie vermutlich, in dem sie phenolischen Substanzen, welche Pflanzen produzieren, als Kohlenstoffquelle verwerteten.[28] Der Abbau des oxidativen Katabolismus lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: *upper pathway* und *lower pathway*. Im ersten Schritt des *upper pathway* wird durch eine RO das aromatische System durch eine Dihydroxylierung aufgebrochen. 1968 konnten Gibson und Kollegen zeigen, dass ein Mehrkomponentensystem aus *Pseudomonas putida* F1 Benzol zu Dihydroxy-cyclohexa-3,5-diene oxidieren kann. Der Stamm konnte dabei Benzol oder andere einfacher aromatischer Verbindungen, wie Toluol und Ethylbenzol, als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen.[7] Über die Elektronentransportproteine werden zur Aktivierung zwei Elektronen auf die Oxygenasekomponente übertragen. In der Oxygenasekomponente wird der Sauerstoff an ein mononukleares Eisenzenter gebunden. Hier findet der katalytische Einbau des Sauerstoffs in den Aromaten statt, wodurch das *cis*-Dihydrodiol gebildet wird.[29] Das *cis*-Dihydrodiol wird durch eine Dihydrodiol-Dehydrogenase oxidiert. Eine ringspaltende Dioxygenase öffnet das Ringsystem.[30,31] Im darauffolgenden *lower pathway* wird das geöffnete Ringsystem weiter zu Intermediaten des Zitratsäurezyklus abgebaut.[32,33]

In Abbildung 1-7 sind die Metaboliten für die Schritte des Katabolismus am Beispiel des Pyrazon-Abbaus in *P. immobile* Stamm E gezeigt. Die Gene, welche für die Enzyme des *upper pathways* kodieren, liegen häufig zusammen in einem Operon, ebenso wie die Gene des *lower pathways*.[34] Diese Cluster besitzen eine besondere Bedeutung für Mikroorganismen, welche Xenobiotika als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen. Um eine schnelle Adaption der Bakterien an neue Substanzen zu ermöglichen, befinden sich die Cluster häufig in mobilen genetischen Elementen wie Transposons oder Plasmiden.[8] Diese ermöglichen zum einen die Verbreitung der Stoffwechselwege zwischen den Organismen.[35] Zum anderen aber auch die Umgestaltung des Clusters selbst, wenn das Bakterium sich an neue Umweltbedingungen adaptieren muss.[36]

Bakterielle Transposons, welche am Katabolismus beteiligt sind, können strukturell in drei Klassen eingeteilt werden: Elemente der Klasse I beinhalten katabolische Gene, welche von zwei Insertionssequenzkopien flankiert werden.[37] Zum Beispiel wird das Cluster, welches unter anderem die Gene der Anilin-Dioxygenase kodiert, auf dem Plasmid pTDN1 in *P. pudita* UCC22 von zwei Kopien der Insertionssequenz IS*1071* flankiert.[38] Elemente der Klasse II besitzen kurze sich gegenläufig wiederholenden Endsequenzen (*inverted repeats*) und benötigen zur Replikation eine Transposase und Resolvase.[37] Das Plasmid pWW0 (TOL) aus *P. putida* mt-2 trägt die Gene zum Toluol-Abbau (*xyl*), welche in zwei Operons organisiert sind. Das *upper pathway*-Operon trägt die Gene, welche für die Enzyme zum Abbau von Toluol zu Benzoat kodieren. Die weiteren Gene sind im *meta pathway*-Operon organisiert.[39] Alle *xyl*-Gene liegen auf dem Plasmid pWW0 in zwei verschiedenen Klasse II Transposons (der Tn*3*-Familie): Tn*4651* und Tn*4653*. Tn*4651* (56 kb) liegt im größeren Transposon Tn*4653* (72 kb). Beide Elemente sind unabhängig voneinander funtionsfähig.[40,41] Die Elemente der Klasse III sind die konjugativen Transposons. Sie sind vorallem verbreitet in gram-positiven Bakterien und der gram-negativen *Bacteroides* Spezies. Anders als die Elemente der Klasse I und II besitzen sie keine *inverted repeats* an ihren Enden. Dafür besitzen sie alle notwendigen Gene zum Ausschneiden des Transposons, der Konjugation mit einer anderen Zellen, und abschließenden erneuten Insertion im fremdem Genom.[37] Sie ermöglichen damit wie die *catabolic plasmids* den horizontalen Gentransfer.

Die am Katabolismus beteiligten Gen-Cluster sind in vielen Bodenbakterien auf Plasmiden kodiert. Diese *catabolic plasmids* sind mit 80 – 4200 kb relativ groß und können oft mehrere Cluster mit bis zu 10 -15 Genen tragen.[42] Zusätzlich zu den katabolischen Genen tragen die Plasmide die Gene des *mating pair formation (MPF) complex*, welcher die eigenständige Übertragbarkeit des Plasmids durch Konjugation ermöglicht,[43] und Cluster von Transfergenen (*tra*-Operonen).[42,44] Die Plasmide sind *broad host range plasmids* und können zwischen Bakterien aus verschiedenen phylogenetischen Untergruppen transferiert werden.[45,46] All diese Eigenschaften ermöglichen eine schnelle und breite Verteilung der genetischen Information in der bakteriellen Population.[47] Der Austausch führt nicht nur zu einer Verbreitung der genetischen Information, sondern auch zu einer Neuordnung, indem Gene neu miteinander kombiniert werden. So haben der *upper* und der *lower pathway* auf dem bereits erwähnten pWWO-Plasmid eine unterschiedliche Herkunft.[39,42]

1.1.4 Biotechnologische Bedeutung

ROs katalysieren in der Natur den Einbau von molekularen Sauerstoff in Aromaten, wodurch das *cis*-Dihydrodiol des Arenes als Produkt entsteht. Allgemein sind vicinale Diole wichtige Bausteine in der pharmazeutischen und chemischen Industrie:

In der pharmazeutischen Industrie werden chirale, vicinale Diole der Zimtsäure für die Synthese des Herzmedikamentes Dilitazem und der Seitenkette des Krebsmedikamentes Taxol® verwendet.[1] Eine Syntheseroute zum HIV-Proteaseinhibitor Indinavir (Crixivan®) beinhaltet als Schlüsselintermediat *cis*-Aminoindanol, welches mit dem chiralen Diol *cis*-(1*S*,2*R*)-Indandiol synthetisiert werden kann.[9] In der chemischen Industrie finden Diole wie Propylenglykol und Ethylenglykol als Monomere für Polyester und Frostschutzmittel Verwendung.[48] 1,2-Hexandiol und 2,3-Butandiol werden als Feinchemikalien in der Kosmetik verwendet.[49,50] Des Weiteren finden vicinale *cis*-Diole Anwendung als Auxiliare in asymmetrischen Synthesen. So wird das Auxiliar Hydrobenzonin zur Racematspaltung bei der Synthese von enantiomerenreinem (-)-Morphin verwendet.[2]

Der häufigste Weg zur Synthese von vicinalen *cis*-Diolen ist die Osmium-katalysierte asymmetrische Dihydroxylierung von Olefinen nach Sharpless und Kollegen.[51] Die asymmetrische Dihydroxylierung (*AD*) von Olefinen wird hierbei durch Osmium(VIII)-oxid in Anwesenheit eines chiralen Liganden zur Steuerung der Stereospezifität katalysiert. Die dafür benötigten Stoffe sind fertig gemischt als *AD-Mix* käuflich erhältlich. Diese Mixturen beinhalten $K_2OsO_2(OH)_4$ als Osmiumquelle und stöchiometrische Mengen des Kooxidans $K_3Fe(CN)_6$. Als chirale Liganden sind wahlweise $(DHQ)_2PHAL$ (Dihydroquinin 1,4-Phtalazindiyldiether im *AD-Mix α*) oder $(DHQD)_2PHAL$ (Dihydroquinidin 1,4-Phtalazindiyldiether im *AD-Mix β*) enthalten.[52] Die Reaktion läuft dabei in einem Zweiphasensystem ab. In der wässrigen Phase oxidiert das Kooxidans das wasserlösliche Osmium(VI)-oxid zum katalytisch aktiven Osmium(VIII)-oxid. In der organischen Phase (oft *tert*-Butanol) findet die Oxidation des Olefins statt.[53] Zunächst wird dabei das Osmium(VIII)-oxid über ein freies Elektronenpaar des tertiären Amines der Alkaloide gebunden.[54] Das Alkaloid schafft eine chirale Umgebung ähnlich der Bindetasche eines Enzymes.[55] Danach erfolgt die cyclische Addition des Olefins und des Osmium-Liganden-Komplexes.[56] Das Intermediat wird durch Hydrolyse gespalten und das Diol freigesetzt. Das Osmium(VI)-

oxid geht zurück in die wässrige Phase, wird dort reoxidiert, und steht einem neuen Zyklus zur Verfügung.[57] Einige Pharmawirkstoffe wie die Angiogenesehemmer Cortistatin A[58] und (-)-Ovalicin[59] oder die Krebsmedikamente Lomaiviticin-Aglycon[60] und Trioxacarcinose A[61,62] werden mit Hilfe des *AD-Mixes* synthetisiert.

Als Hauptnachteil bleibt die Verwendung des akut toxischen Osmium(VIII)-oxids (LD_{50}-Wert Ratte: 13,5 – 14,1 mg/kg Körpergewicht) zur Synthese von Pharmawirkstoffen.[63] Eine weitere Einschränkung ist die langsame Umsetzung von elektronenarmen Alkenen durch das elektrophile OsO_4.[64]

1968 konnten Gibson und Kollegen das vicinale *cis*-Diol 5,6-*cis*-Dihydroxycyclohexa-1,3-dien (DHCD) (**1**, Abbildung 1-4) erstmalig stabil isolieren. Es wurde als Metabolit des Bodenbakteriums *P. putida* F1 bei Wachstum mit der Kohlenstoffquelle Benzol gebildet. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass die Bildung in den Zellen von einem Dreikomponentensystem katalysiert wird.[7] Für die biotechnologische Anwendung gab es zwei Haupthindernisse: 1.) Die Sensitivität von *P. putida* gegenüber hohen Benzolkonzentrationen, und 2.) Die Weiteroxidation des Produktes zum Catechol und sein weiterer Abbau.

Die erste industrielle Anwendung zur DHCD-Produktion geschah 1983 durch Imperial Chemical Industries (ICI). Diese entdeckten den Stamm *P. putida* NCIMB 11767, welcher eine erhöhte Toleranz gegenüber Benzol besaß.[10,65] Der durch Arbeiten von Stephan Taylor (ICI Biological Products) aus diesem Stamm hervorgegangene Stamm *P. putida* UV4 wird heute noch in vielen chemoenzymatischen Synthesen eingesetzt. Dieser kann durch genetische Modifikation das Dihydrodiol nicht weiter oxidieren. Bis heute sind mehr als 50 monosubstituierte Benzole bekannt, welche durch *P. putida* UV4 zum enantiomerenreinen Dihydrodiol umgesetzt werden können.[65–67] Der Prozess lief in 1000 L-Fermentern mit Produktkonzentrationen bis 40-50 g/L ohne inhibitorischen Effekt ab. Das akkumulierte Produkt wurde als Monomer zur Synthese des Polymers Polyphenylen eingesetzt.[10,68]

Ein weiterer Durchbruch war die Synthese von (+)-Pinitol durch Ley und Sternfeld im Jahr 1987. Sie nutzten als Ausgangsmaterial von *P. putida* produziertes DHCD.[69,70] (+)-Pinitol verhindert das Larvenwachstum von *Heliothis zea* auf Sojapflanzen, zeigt eine antidiabetische Wirkung und kann zur Behandlung einer nichtalkoholischen Fettleber verwendet werden.[71–73] Heute sind eine Vielzahl von Synthesen bekannt die

enantiomerenreines DHCD und verschieden substitutierte Derivate aus Biotransformationen als Grundbaustein verwenden. Zu den Produkten gehören Carbozucker, Pharmazeutika und Liganden für achirale Synthesen.[74]

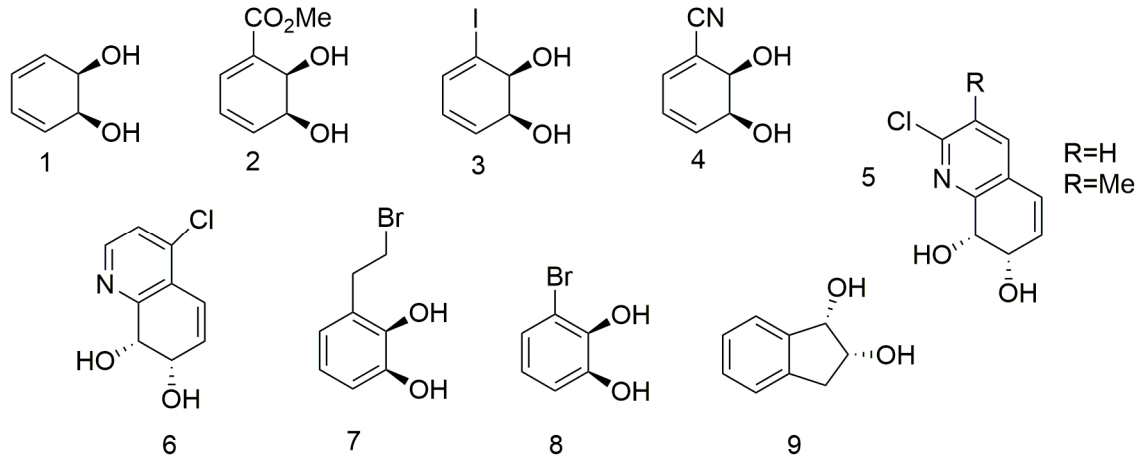

Abbildung 1-4: Auswahl an *cis*-Diolen aus Biotransformationen, welche Verwendung in chemoenzymatischen Synthesen fanden.

In Abbildung 1-4 ist eine Auswahl an möglichen Bausteinen gegeben. Die aus Biotransformationen mit *P. pudia* UV4 entstandenen Verbindungen **2**-**4** können als Grundbaustein für die weitere chemische Synthese von Carbozuckern wie Carba-*β*-*L*-Galactopyranose[75], Carba-*β*-Glucose[66] und (+)-Pericosine A–C[76] genutzt werden. Das enantiomerenreine *cis*-Dihydrodiol von 2-Chlorochinolin (**5**) dient als Ausgangsmaterial für die Synthese von 2,2‘-Bipyridin. Dieses kann als chiraler Ligand für allylische Oxidationen, Cylcopropanierung, und asymmetrischen Aminolysen verwendet werden.[77,78] Der chirale Ligand 4,4‘-Bipyridin kann chemoenzymatisch aus 4-Chlorochinolin (**6**) synthetisiert werdern.[79] Das Opiat (+)-Codein kann chemoenzymatisch mit Verbindung **7** als Intermediat synthetisiert werden. 2-Bromethylbenzol wird hierbei in Ganzzellumsetzungen mit dem vom rekombinanten *E. coli* Stamm JM109 (pDTG601A) enzymatisch oxidiert (Ausbeute: 10 - 15 g/L/h).[80] Das Analgetikum (-)-Epibatidin ist stärker als Morphium. Es konnte aus dem ecuadorianischen Pfeilgiftfrosch *Epipedobates tricolor* isoliert werden. Aufgrund der Knappheit des Materials wurde nach einer Syntheseroute geforscht. Eine dieser Syntheserouten beginnt mit der enzymatischen Dihydroxylierung von Brombenzol (**8**).[81] Kommerziell Verwendung finden ROs in der Synthese des HIV-Proteaseinhibitors Indinavir (Crixivan®): Verbindung **9** wird durch die Biotransformation von Indan mit einem *Rhodoccus* sp.-Isolat produziert. Dieses kann zur weiteren Synthese von Indinavir verwendet werden.[6,9] Die Reaktion wurde 1997 von der Firma Merck patentiert.[82]

1.2 Phenylobacterium

Domäne	Bacteria
Abteilung	Proteobacteria
Klasse	Alphaproteobacteria
Ordnung	Caulobacterales
Familie	Caulobacteraceae
Gattung	*Phenylobacterium*
Art	*P. immobile*

Die Gattung *Phenylobacterium* wurde erstmals 1985 von Lingens und Kollegen beschrieben.[11] Zu diesem Zeitpunkt umfasste diese Gattung nur eine Art: *P. immobile*. Diese zeichnete sich durch ihr sehr eingeschränktes Substratspektrum aus. Es zeigt das beste Wachstum mit Xenobiotika wie Pyrazon, Phenazon und Aminophenazon. Es zeigt hingegen kein Wachstum auf Komplexmedien. Erst 2004 konnte das Bakterium um eine weitere Spezies erweitert werden. Bei Bohrungen im Großen Artesischen Becken in Australien, welches eines der größten unterirdischen Wasserreservoirs der Welt ist, wurde in einer Wasserprobe (42 °C Wassertemperatur) in 295 m Bohrtiefe die Spezies *Phenylobacterium lituiforme* entdeckt. Anders als *P. immobile* zeigte das Bakterium Wachstum mit Kohlenstoffquellen wie Zuckern und Fettsäuren. Das beste Wachstum wurde mit Hefeextrakt als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle erreicht. *P. lituiforme* ist fakultativ anaerob, was es bedeutend von der Art *P. immobile* unterscheidet, dessen Katabolismus die sauerstoffverbrauchende Reaktion von ROs vorraussetzt. Dennoch besitzt die 16S rRNA des Bakteriums eine Sequenzidentiät von 96 % mit der von *P. immobile*. Weitere Gemeinsamkeiten wie die Fähigkeit beider Bakterien *L*-Phenylalanin als einziger Kohlenstoffquelle zu verwenden, gaben den Anlass das Bakterium als neue Art der Gattung *Phenylobacterium* einzuordnen. Heute sind vierzehn Arten bekannt, die aus den unterschiedlichsten Habitaten wie dem Reservoir eines Wasserfilters[83], Wüstensand[84] oder menschlichem Blut[85] stammen. Bis zur Entdeckung der Art *Phenylobacterium falsum* im Jahr 2005 wurde die Fähigkeit *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle nutzen zu können als gemeinsame Charakteristik trotz der sonst variierenden Phänotypen betrachtet.[86] Die als erste beschriebene und lange als einzige bekannte Art *P. immobile* wird im nächsten Kapitel vorgestellt.

1.2.1 *Phenylobacterium immobile*

Pyrazon, auch als Chloridazon bezeichnet, ist der Wirkstoff des Herbizids Pyramin®, welches gegen Unkräuter und Gräser beim Zucker- und Futterrübenanbau verwendet werden kann. Drescher und Otto konnten 1969 zeigen, dass die Substanz im Boden mikrobiell unter Abspaltung des Phenylringes abgebaut wird. So wurde in Böden, welche statt bei Raumtemperatur bei + 6 °C oder + 37 °C inkubiert wurden, kein Abbau des Pyrazons (vgl. Abbildung 1-6) mehr detektiert.[87,88]

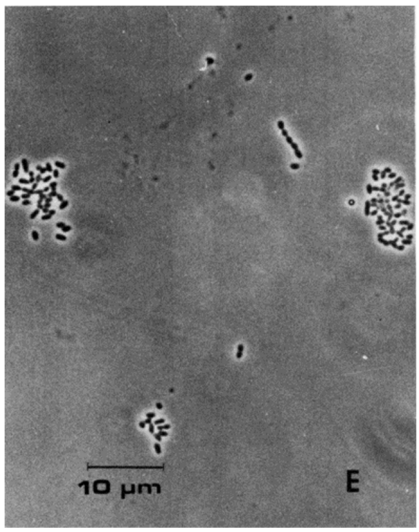

Abbildung 1-5: Phasenkontrast-mikroskopische Aufnahme von *P. immobile* Stamm E.[11]

Das Bakterium wurde unabhängig voneinander 1969 von Engvild und Jensen und 1970 von Fröhner und Kollegen isoliert.[89,90] Beide Gruppen bemerkten, dass das Bakterium nur bei Zusatz von Cobalamin zum Medium isoliert werden konnte. Bis 1985 konnten 22 Stämme aus Bodenproben aus verschiedenen Erdteilen isoliert werden. Die Stämme konnten mit den Xenobiotika Pyrazon, Phenazon und Aminophenazon als einziger Kohlenstoffquelle aus Bodenproben angereichert werden, obwohl die Böden vorher nie mit diesen Substanzen in Berührung kamen. Nach einer teilweisen Sequenzanalyse der 16S rRNA wurden die vorher als „Chloridazon-abbauenden Bakterien“ bezeichneten Stämme zu einer neuen Gattung mit nur einer Art zusammengefasst: *Phenylobacterium immobile.* Der 1970 von Fröhner und Kollegen aus einer Bodenprobe aus Ecuador isolierte Stamm **E** (DSM 1986) wurde als Typstamm der Art festgelegt.[11]

Diese α-Proteobakterien der Familie Caulobacteraceae sind gram-negativ und strikt aerob. Sie sind katalase-positiv, schwach oxidase-positiv und zeigen eine schwache H_2S-Bildung. Das Bakterium ist gesundheitlich unbedenklich.[91] Die Zellen sind Stäbchen oder Kokken, welche einzeln, gepaart, in kurzen Ketten und auch Klumpen auftauchen können. In Abbildung 1-5 ist eine phasenkontrastmikroskopische Aufnahme des Typstammes E gezeigt. Die Zellen aller Stämme sind dabei unbeweglich, unpigmentiert und nicht sporenbildend. Ausgestrichen auf Agarplatten sind die Kolonien bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C erst nach einer Woche sichtbar. Nach drei Wochen zeigen sich kreisförmige Kolonien von 1 bis 2 mm

Durchmesser, die sich leicht vom Agar ablösen lassen. Die Kolonien des Typstammes E sind leicht rau, trocken und lassen sich gut in H_20 lösen. Das Temperaturoptimum der Stämme liegt zwischen 28 und 30 °C. Kein Wachstum wird bei 4 und 37 °C festgestellt. Das pH-Optimum liegt zwischen 6,8 und 7,0. Kein Wachstum wird bei pH-Werten von 4,0 und 9,0 festgestellt. Es ist osmotisch sensitiv (kein Wachstum ab NaCl-Konzentration von 10 g/L).

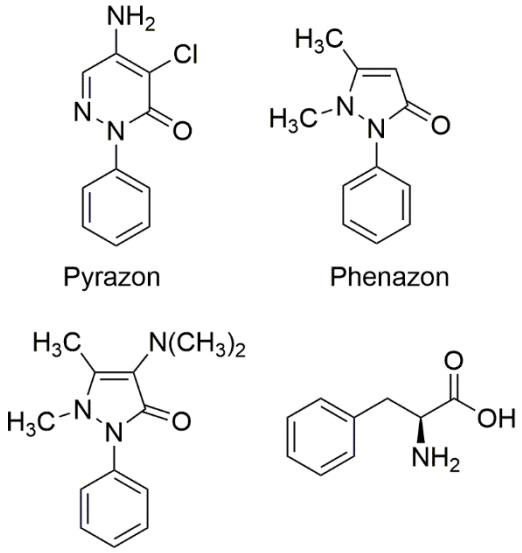

Abbildung 1-6: Kohlenstoffquellen von *Phenylobacterium immobile*.

Die Stämme zeigen kein Wachstum auf den meisten Zuckern (Glukose, Arabinose, Fruktose usw.), Alkoholen, Aminosäuren (Ausnahme: *L*-Glutaminsäure und *L*-Phenylalanin) und Carboxylsäuren. Ebenfalls wird kein Wachstum auf Komplexmedien beobachtet, weshalb das Ausstreichen auf Agarplatten mit Komplexmedium zur Kontaminationskontrolle der Kulturen verwendet werden kann. Schwaches Wachstum kann auf manchen Intermediaten des Citratzyklus wie Succinat, Fumarat und Malat beobachtet werden. Einige Phenylcarbonsäuren werden als Kohlenstoffquelle akzeptiert.[92] Die Stämme wurden entweder mit Pyrazon, Phenazon, und Aminophenazon als Kohlenstoffquelle isoliert, wobei keiner der isolierten Stämme alle drei Substanzen verwerten konnte. Alle Stämme zeigten Wachstum mit *L*-Phenylalanin (vgl. Abbildung 1-6). Allerdings benötigen alle Stämme außer dem Stamm N eine lag-Phase von etwa 3 Wochen, bevor sie *L*-Phenylalanin verwerten können. Die Bakterien besitzen alle Enzyme des Citratzyklus.[11,93] Ihr Abbauschema entspricht dem des in Abschnitt 1.1.3 skizzierten oxidativen Katabolismus.

1.2.2 Katabolismus

Der Katabolismus von Pyrazon durch den Stamm E ist in Abbildung 1-7 dargestellt. In einem ersten Schritt erfolgt die Dihydroxlierung des Aromaten durch eine RO.[94] Im folgenden Schritt wird das Dihydrodiol von einer Dehydrogenase oxidiert bei gleichzeitiger Umsetzung von NAD^+ zu NADH + H^+. Eberspächer und Lingens konnten 1978 zwei Dehydrogenasen aus dem Proteom aufreinigen. Diese unterschieden sich in ihrer Substratspezifität. Die Dehydrogenase A oxidierte bevorzugt Dihydrodiole von Pyrazon und Phenazon, während die Dehydrogenase B Dihydrodiole von Aromaten wie Toluol und Benzol bevorzugte.[95,96]

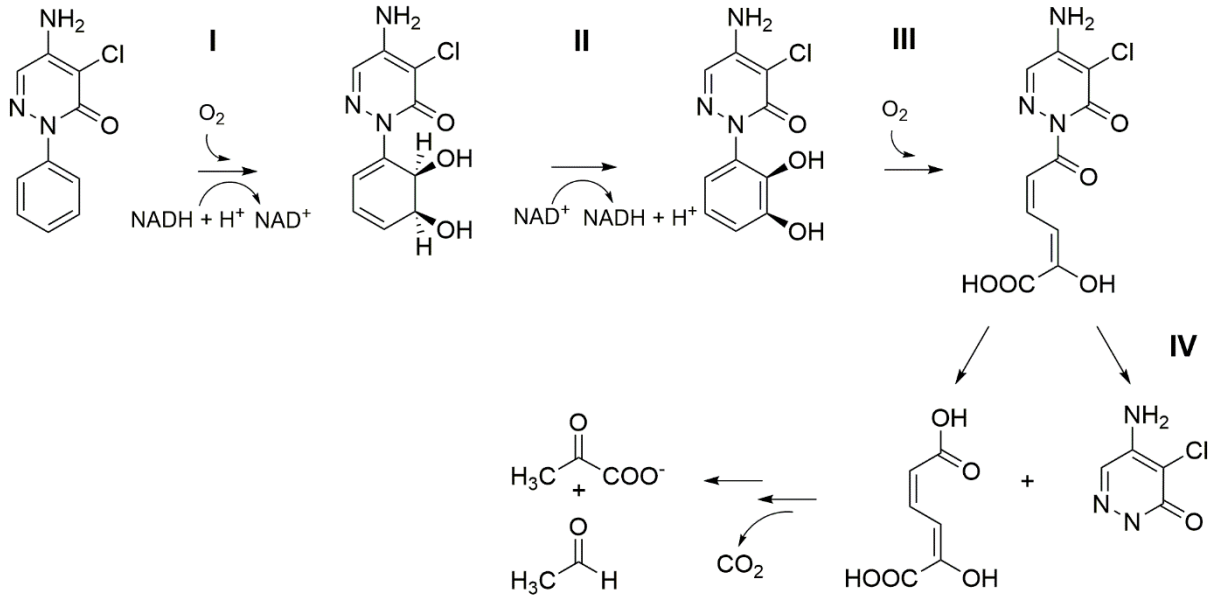

Abbildung 1-7 Abbauschema von Pyrazon durch das Bakterium *Phenylobacterium immobile* E. (mod. nach [11]) Erster Abbauschritt ist der Einbau von Sauerstoff in den Aromaten durch eine *cis*-2,3-Dioxygenase (**I**)[94]. Eine 2,3-Dihydro-2,3-Dioldehydrogenase (**II**)[95] oxidiert das Produkt zum Catechol. Dieses wird unter Sauerstoffverbrauch von einer Catechol-2,3-Dioxygenase (**III**)[97–100] gespalten. Eine Amidase (**IV**)[101] spaltet abschließend das Molekül in den Heterozyklus des Pyrazons, welches im Medium akkumuliert, und 2-Hydroxymuconsäure, welche erst zu Acetaldehyd und Pyruvat und dann weiter im Citratzyklus zur Energiegewinnung abgebaut wird.

Das Catechol wird durch eine Catechol-2,3-Dioxygenase in *meta*-Position gespalten. Die Catechol-2,3-Dioxygenase ist ein eisenhaltiges Homomer mit sechs, identischen Untereinheiten.[97–100] Das Ringspaltungsprodukt zerfällt bei der *in vitro*-Umsetzung mit der aufgereinigten Catechol-1,2-Dioxygenase spontan in den Heterozyklus des Pyrazons und 2-Hydroxymuconsäure-δ-lacton, welches von den Bakterien nicht weiter umgesetzt werden kann.[97] Die Zugabe einer Amidase, welche aus dem Rohextrakt des Bakteriums angereicht werden konnte, unterdrückt die Lactonbildung und es wird 2-Hydroxymuconsäure detektiert, welche von den Bakterien verwertet werden kann.[101]

Die einzelnen Intermediate konnten auch für den Abbau von Phenazon durch den Stamm E nachgewiesen werden.[102]

1.2.3 Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenase aus Stamm E

1977 konnten Sauber und Kollegen eine Pyrazon-Dioxygenase aus dem Stamm E aufreinigen. Diese bestand aus drei Komponenten, die nur zusammen Pyrazon dihydroxylieren konnten. Die Größe der Komponenten wurde durch Größenausschlusschromatographie und Referenzproteine bestimmt. Die Komponente A_1 war ein rotbraunes Protein von 180 kDa. Durch Atomabsorptionsspektrometrie konnte gezeigt werden, dass 1 mol Protein etwa 2,2 mol Eisen gebunden hatte. Desweiteren band 1 mol Protein etwa 1,6 mol inorgansichen Schwefel, weshalb A_1 als Eisenschwefelprotein mit [2Fe-2S] Cluster vermutet wurde. Die gelbe Komponente A_2 besaß eine Größe von etwa 67 kDa. Das Absorptionsspektrium dieser Komponente deutete darauf hin, dass es FAD gebunden hatte. Das EPR-Spektrum der kleinsten Komponente B (12 kDa) wies auf ein gebundenes $[2Fe\text{-}2S]_{PT}$ Cluster hin. Zur Oxidation musste der Cofaktor NADH zugegeben werden. NADPH wurde nicht akzeptiert. Das Temperaturoptimum der Dioxygenase betrug 30 °C. Das pH-Optimum des Dreikomponentensystemes lag zwischen 6,8 – 7,2 in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer. Es wurde vermutet, dass Komponente A_2 als Ferredoxin-Reduktase agierte, die durch das Cosubstrat NADH reduziert wird. Die Komponente B dient als Ferredoxin und überträgt die Elektronen zum katalytische aktiven Komponente A_1.[94] In Abbildung 1-8 ist die Anordnung des Dreikomponentensystems skizziert.

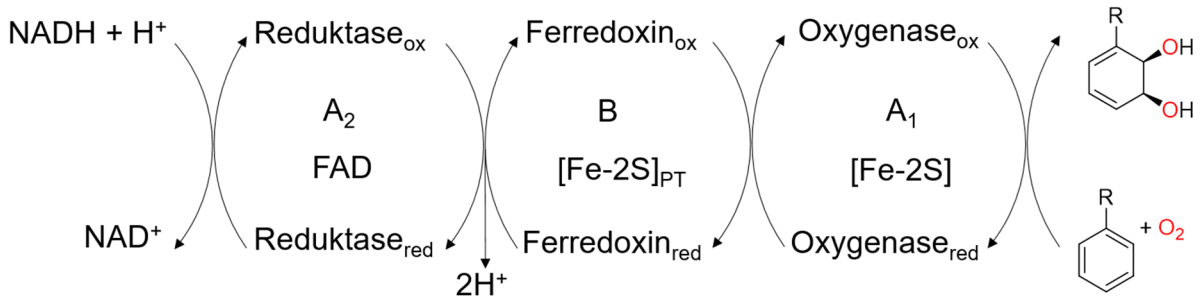

Abbildung 1-8: Schema für die Abfolge der Elektronentransportproteine der Pyrazon-Dioxygenase aus *P. immobile* Stamm E. (mod. nach [94]) Die Bezeichnung A_2, B und A_1 für die Elektronentransportproteine, sowie die genannten prosthetischen Gruppen, sind der Arbeit von Sauber und Kollegen entnommen.[94]

Sauber und Kollegen nahmen an, dass nur eine Dioxygenase (oder RO) aus dem Rohextrakt von *P. immobile* Stamm E aufgereinigt wurde.[94] Im Jahr 2015 wurde das Genom des Stammes E vom Institut für Technische Biochemie in Stuttgart sequenziert. In der 3,3 Mbp großen Genomsequenz wurden 19 ORFs annotiert, welche für α-Untereinheiten von ROs kodieren. Nur ein ORF kodierte dabei für eine β-Untereinheit. Außerdem wurden sechs ORFs annotiert, die für Catechol-Dioxygenasen kodierten. Die Gene der α-Untereinheiten, β-Untereinheit, Ferredoxine und Reduktasen lagen dabei nicht in klassischen Operon-Strukturen zusammen, sondern waren im Genom verteilt.[12]

1.3 Motivation

Das α-Proteobakterium *Phenylobacterium immobile* zeichnet sich durch seine ungewöhnlichen Kohlenstoffquellen aus. Es kann Xenobiotika, wie das Analgetikum Phenazon und das Herbizid Pyrazon, als einzige Kohlenstoffquelle nutzen, während es kein Wachstum auf Komplexmedium zeigt. Der initiale Abbauschritt in den Zellen ist die Oxidation des Phenylrestes zum *cis-ortho*-Dihydrodiol. Vicinale *cis*-Diole sind wichtige chirale Liganden, Auxiliare und Synthons in der pharmazeutischen und agrochemischen Industrie. Eine Möglichkeit ihrer chemischen Synthese ist die Sharpless-Dihydroxylierung. Diese nutzt Osmium(VIII)-oxid oder andere Übergangsmetalle als Katalysator. Der Nachteil dieser Methode liegt in der Toxizität des Katalysators, sowie die Nebenproduktbildung durch Überoxidation und Spaltung der *cis*-Diole. In der Natur wird diese Reaktion von Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen (ROs) katalysiert. Die Vorteile dieser Biokatalysatoren liegen in der hohen Stereoselektivität und gesundheitlichen Unbedenklichkeit. Ihre industrielle Verwendung bleibt aber auf wenige Beispiele begrenzt aufgrund der geringen Anzahl verfügbarer Biokatalysatoren und dem damit verbundenen begrenzten Substratspektrum. Das Genom des *P. immobile* Stammes E wurde 2015 sequenziert und 19 ORFs annotiert, welche für die katalytisch aktive α-Untereinheit von ROs kodieren. Die hohe Anzahl und Vielfalt von α-Untereinheiten, sowie das ungewöhnliche Substratspektrum, machen die ROs aus *P. immobile* Stamm E zu einem geeigneten Studienobjekt darüber wie die Natur die Substratspezifität von ROs generiert. Um die Substratspezifität der α-Untereinheiten einzeln zu untersuchen, sollte die Aktivität der ROs in *E. coli* rekonstituiert werden. Um dies zu ermöglichen, musste zuerst der Aufbau der ROs aus *P. immobile* verstanden werden. ROs sind Mehrkomponentensysteme deren Komponenten (bis auf wenige Ausnahmen) gemeinsam in Gen-Clustern angeordnet sind. Das Fehlen eines solchen Gen-Clusters im Genom von *P. immobile* Stamm E, welche eine Zuordnung der RO-Komponenten ermöglicht hätte, stellte die besondere Herausforderung beim Verstehen der ROs und der Rekonstitution ihrer Aktivität in *E. coli* da.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich (Steinheim, DE), Carl Roth (Karlsruhe, DE), Merck (Darmstadt, DE), Alfa Aesar (Karlsruhe, DE) und Serva (Heidelberg, DE) erworben.

Weitere in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2-1 aufgelistet.

Tabelle 2-1: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Herkunft
peqGREEN Fluoreszenzfarbstoff	VWR, Erlangen, DE
6x DNA-Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, DE
NativeMark™ Unstained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.2 Enzyme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme sind in Tabelle 2-2 aufgelistet.

Tabelle 2-2: Verzeichnis der verwendeten Enzyme.

Enzym	Herkunft
KOD HotStart-Polymerase	Novagen®, Darmstadt, DE
Lysozym	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
DNase I	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, CH
T5 Exonuklease	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, DE
Phusion®High-Fidelity DNA-Polymerase	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, DE
Taq DNA Ligase	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, DE

2.1.3 Verwendete Kits

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 2-3 aufgelistet.

Tabelle 2-3: Verzeichnis der verwendeten Kits.

Kit	Herkunft
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research Corp. Irvine, CA, USA
DNA Clean & Concentrator™ Kit	Zymo Research Corp. Irvine, CA, USA
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Corp. Irvine, CA, USA
Pierce™ BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; USA
SERVAGel™N *Native Gel* Starter *Kit*	Serva, Heidelberg, DE

2.1.4 Nährmedien

Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Nährmedien, Lösungen und Puffer vor der Verwendung für 20 min bei 121°C und 2 bar Druck sterilisiert oder bei Temperaturempfindlichkeit sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße). Sofern Antibiotikum zur Selektion benötigt wurde, wurde dies nach der Sterilisation und Abkühlen der Nährlösung auf 50 °C zugegeben. Bei Flüssigkulturen geschah dies kurz vor der eigentlichen Anzucht.

2.1.4.1 Phenylobacterium immobile

Phenylobacterium immobile wurde auf Minimalmedium B angezogen.[11]

Tabelle 2-4: Minimalmedium B für *Phenylobacterium immobile.*

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration
Salzlösung (10x)*	KH_2PO_4	3 g/L
	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	7 g/L
	$(NH_4)H_2PO_4$	3 g/L
	$(NH_4)_2HPO_4$	7 g/L
	$(NH_4)_2SO_4$	1 g/L
Calciumlösung (100x)*	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	1 g/L
Magnesiumlösung (100x)*	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g/L
Spurenelementelösung (100x)*	H_3BO_3	10 mg/L
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.8 mg/L
	KI	2 mg/L
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	4 mg/L
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	8 mg/L
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8 mg/L
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	4 mg/L
Biotinlösung (1000x)**	Biotin	10 mg/L

Cobalaminlösung (1000x)**	Cobalamin	3 mg/L

*Die Stammlösungen werden seperat autoklaviert und dem sterilen Medium zugefügt.

**Die Stammlösungen werden seperat sterilfiltriert (0,2 µM) und dem sterilen Medium zugefügt.

Die in Tabelle 2-4 gelisteten Stammlösungen wurden der benötigten Menge an autoklaviertem, deionisiertem Wasser zugefügt.

Abschließend wurde dem sterilen Medium eine Kohlenstoffquelle zugesetzt. Die Kohlenstoffquellen Phenazon (100x Stammlösung) und *L*-Phenylalanin (10x Stammlösung) wurden sterilfiltriert zugegeben (Endkonzentration: 1 g/L). Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit von Pyrazon wurde dieses bereits dem deionisierten Wasser in einer Endkonzentration von 0,4 g/L zugegeben. Durch die Hitze des Autoklavierens ging das Pyrazon in Lösung.

Zum Herstellen fester Nährböden wurde dem Medium vor der Sterilisation 2 % (w/v) Agar zugesetzt.

2.1.4.2 Escherichia coli

In Tabelle 2-4 sind die Zusammensetzungen der Komplexmedien für die Anzucht von *Escherichia coli* aufgeführt.

Tabelle 2-5: Komplexmedien für *Escherichia coli*.

Bezeichnung	**Bestandteile**	**Konzentration**
Luria Bertani-Medium (LB)	Trypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	Natriumchlorid	5 g/L
Terrific Broth-Medium (TB)	Trypton	12 g/L
	Hefeextrakt	24 g/L
	Glycerin	5 g/L
	Kaliumphosphatpuffer (10x)	89 mM
Kaliumphosphatpuffer (10x)*	KH_2PO_4 (0,17 M)	23,1 g/L
	K_2HPO_4 (0,72 M)	125,4 g/L

*Die Stammlösung des Kaliumphosphatpuffers wurde separat autoklaviert und dem sterilen Medium hinzugefügt.

2.1.5 Puffer und Lösungen

In Tabelle 2-6 sind die Zusammensetzungen der in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen aufgeführt.

Tabelle 2-6: Verzeichnis der in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration
TfB I-Puffer (pH 5,8)	Rubidiumchlorid	100 mM
	Mangan(II)-chlorid	50 mM
	Kaliumacetat	30 mM
	Calciumchlorid	10 mM
	Glycerin	15 % (w/v)
		mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen
TfB II-Puffer (pH 8)	MOPS	10 mM
	Rubidiumchlorid	10 mM
	Calciumchlorid	75 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
TAE-Puffer	Tris-Acetat (pH 8)	40 mM
	EDTA	1 mM
6x SDS-Ladepuffer	Tris-HCl (pH 8)	350 mM
	DTT	600 mM
	Glycerin	30 % (v/v)
	Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,12 % (w/v)
Aufreinigungspuffer	KPi (pH 7,0)	50 mM
	Glycerol	10 %
	DTT	5 mM
Aufschlusspuffer	Tris-HCl (pH 7,8)	100 mM
	EDTA	10 mM
	Saccarose	1 M
Solubilisierungspuffer	KPi (pH 7,0)	50 mM
	Triton X-100	1 % (w/v)
	DTT	5 mM

2.1.6 Verwendete Organismen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Organismen sind in Tabelle 2-7 aufgelistet.

Tabelle 2-7: Verzeichnis der verwendeten Organismen.

Organismus	Genotyp	Charakteristik	Herkunft
E. coli XL1-Blue	*rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *hsd*R17 *sup*E44 *rel*A1 *lac* [F´ *pro*AB *lac*I^q ZΔ*M15* Tn*10* (Tet^r)]	Klonierungsstamm	Agilent Technologies Inc. Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn, DE
E. coli M15(pREP4)	F-, Φ80Δ*lac*M15, *thi*, *lac*-, *mtl*-, *recA*+,Km^R	Expressionsstamm	Qiagen, Hilden, DE
E. coli JW5510	F– Δ(*ara*D-*ara*B)567 Δ*lac*Z4787(::*rrn*B-3) *λ*- Δ*ygj*G763::*kan rph*-1 Δ(*rha*D-*rha*B)568 *hsd*R514	Expressionsstamm	Coli Genetic Stock Center (Yale Universität)
Phenylobacterium immobile Stamm E	wildtypisch	in Ecuador isoliert	DSM 1986

2.1.7 Verwendete Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten und konstruierten Plasmide sind in Tabelle 2-8 und Tabelle 2-8 aufgelistet.

Tabelle 2-8: Verzeichnis der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Größe [bp]	Charakteristik	Herkunft
pQE-31	3463	Amp^r, Cm^r Expressionsvektor für 6xHis-tagged Proteine T5-Promotor; ori: ColE1	QIAGEN N.V., Hilden, DE
pBAD18_CamA_CamB	6370	Amp^r Expressionsvektor PBAD-Promotor; ori: pBR322	J. Klenk/ pITB1776
pBAD33	5352	Cm^r Expressionsvektor PBAD-Promotor; ori: p15A	Beckwith Lab
pT7-7_Pi-DO16-ETC1	6034	Amp^r Expressionsvektor T7-Promotor; ori: pBR322	Dr. O. Reznicek/ pITB1095

Tabelle 2-9: Verzeichnis der konstruierten Plasmide.

Plasmid	Größe [bp]	Insert	ITB Nummer
pQE-31_Fxd3	3732	Ferredoxin 3	pITB5502
pQE-31_Fxd4	3754	Ferredoxin 4	pITB5503
pQE-31_FerRed1	4654	Ferredoxin-Reduktase 1	pITB5504
pQE-31_FerRed2	4228	Ferredoxin-Reduktase 2	pITB5505
pBAD18_Fxd4_FerRed2	6012	Ferredoxin 4 Ferredoxin-Reduktase 2	pITB5506
pBAD33_DO4	7621	α-Untereinheit DO4 + β-Untereinheit	pITB5507
pBAD33_DO6	7105	α-Untereinheit DO6 + β-Untereinheit	pITB5508
pBAD33_DO7	7345	α-Untereinheit DO7 + β-Untereinheit	pITB5509
pBAD33_DO8	7282	α-Untereinheit DO8 + β-Untereinheit	pITB5510
pBAD33_DO9	7285	α-Untereinheit DO9 + β-Untereinheit	pITB5511
pBAD33_DO10	7342	α-Untereinheit DO10 + β-Untereinheit	pITB5512
pBAD33_DO11	7030	α-Untereinheit DO11 + β-Untereinheit	pITB5513
pBAD33_DO14	7330	α-Untereinheit DO14 + β-Untereinheit	pITB5514
pBAD33_DO15	7333	α-Untereinheit DO15 + β-Untereinheit	pITB5515
pBAD33_DO16	7339	α-Untereinheit DO16 + β-Untereinheit	pITB5516
pBAD33_DO17	7336	α-Untereinheit DO17 + β-Untereinheit	pITB5517
pBAD33_DO18	7321	α-Untereinheit DO18 + β-Untereinheit	pITB5518
pBAD33_DO21	7324	α-Untereinheit DO21 + β-Untereinheit	pITB5519
pBAD33_DO22	7324	α-Untereinheit DO22 + β-Untereinheit	pITB5520
pBAD33_DO23	7255	α-Untereinheit DO23 + β-Untereinheit	pITB5521
pBAD33_DO29	7315	α-Untereinheit DO29 + β-Untereinheit	pITB5522
pBAD33_DO30	7327	α-Untereinheit DO30 + β-Untereinheit	pITB5523
pBAD33_alpha	6740	α-Untereinheit DO16	pITB5524
pBAD33_beta	5855	β-Untereinheit	pITB5525

Die klonierten Gensequenzen befinden dem Anhang 6.1 beigefügt.

2.1.8 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind in Tabelle 2-10 aufgelistet Sie sind von Metabion International AG (Planegg, DE) synthetisiert worden.

Tabelle 2-10: Verzeichnis der verwendeten Oligonukleotidsequenzen.

			Oligonukleotidsequenzen (5' -> 3')
Insert:	Ferredoxin 3	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGGCTAACATCACCTACGTCC
		r	CTATCAACAGGAGTCCAAGCTAGCGCTGGCTTTCCGGG

Vektor:	pQE31	*f*	CTCCCGGAAAGCCAGCGCTAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGT AATGACC
		r	ACGTAGGTGATGTTAGCCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	Ferredoxin 4	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGAGCTACATCGTGATGGATCC
		r	CTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGGAGCCGCGGC
Vektor:	pQE31	*f*	AGCCTGGCCGCGGCTCCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGAT
		r	TCCATCACGATGTAGCTCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	Ferredoxin-Reduktase 1	*f*	TGAAAGAAGTCGCCGCCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGAT
		r	CTCATCTGCTTCTCTACCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Vektor	pQE31	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGACCGAAGCTTCCATCG
		r	CTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGGTCTCGACGAAAGCC
Insert:	Ferredoxin-Reduktase 2	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGACCGAAGCTTCCATCG
		r	CTATCAACAGGAGTCCAAGCTCAGGTCTCGACGAAAGCC
Vektor:	pQE31	*f*	AGGCTTTCGTCGAGACCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGAT
		r	GCGATGGAAGCTTCGGTCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert	DO4	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGCGTGATCTG
		r	GATATCGGCGAACGATAGACGAGCACGCCTTCGGTCAG
Vektor	pBAD33	*f*	CCCTGACCGAAGGCGTGCTCGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAGCC C
		r	AGCCGGACCAGATCACGCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO6	*f*	GATATCGGCGAACGATAGACCTACAAGCGAGGCGACCCGTCTTCGCC
		r	ACCATCACCATACGGATCCGATGGCTCGCGGTTGCG
Vektor:	pBAD33	*f*	ACGGGTCGCCTCGCTTGTAGGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAG
		r	GCGTCGCAACCGCGAGCCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO7	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGAACAGTCAGGCCGAACAG
		r	ACCATCACCATACGGATCCGATGCTCTACGAGAACGGCAAG
Vektor:	pBAD33	*f*	AAGCCGGCGGCCGGATCTAGGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAGCC
		r	TTGCCGTTCTCGTAGAGCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO8	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGAAAGTCGCC
		r	GATATCGGCGAACGATAGACGACCACGCCGTC
Vektor	pBAD33	*f*	CGCCTGTGGACGGCGTGGTCGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAGCC CGGGG
		r	AAGTTATGGGCGACTTTCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO9	*f*	GATATCGGCGAACGATAGACTTAGAGCCGATCGGATGGC
		r	ACCATCACCATACGGATCCGATGCTCTACGAGAACGGCAAG
Vektor:	pBAD33	*f*	TGCCATCCGATCGGCTCTAAGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAG
		r	TTGCCGTTCTCGTAGAGCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO10	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGGAGCTACGGATGCTG
		r	GATATCGGCGAACGATAGACCTAGGCTGGCGTAAGCG
Vektor:	pBAD33	*f*	CGCCGCTTACGCCAGCCTAGGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAG
		r	TGCAGCATCCGTAGCTCCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO11	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGACGCAGCAGGACCAGTTCGAGAAG
		r	GATATCGGCGAACGATAGACCTAGCTGCGCCAACGCAGAACG
Vektor:	pBAD33	*f*	TTCTGCGTTGGCGCAGCTAGGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAGCC C

		r	AACTGGTCCTGCTGCGTCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO14	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGCTCTATGAAAACAGAGGTCCGTT
		r	GATATCGGCGAACGATAGACCTAAGGTCGGCTATCGGCCG
Vektor:	pBAD33	*f*	CGGCCGATAGCCGACCTTAGGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAGCC
		r	CCTCTGTTTTCATAGAGCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO15	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGACCATGCTTCACGACGC
		r	GATATCGGCGAACGATAGACCTAGGGCCTCGCGTC
Vektor:	pBAD33	*f*	CGGCGGACGCGAGGCCCTAGGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAGCC C
		r	CCTCTCGTCTCGTAGAGCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert	DO16 + β	*f*	ACCCGTTTTTTTGGGCTAGCAGGAGGATTAACCA
		r	TCTCATCCGCCAAAACAGCCATTAGAAGAAGTTGCTCAG
Vektor	pBAD33	*f*	CCTGAGCAACTTCTTCTAATGGCTGTTTTGGCGGATGAG
		r	CTCTCATGGTTAATCCTCCTGCTAGCCCAAAAAAACGGGTATGG
Insert:	DO17	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGCTCTACGAGACGAGAGGAC
		r	GATATCGGCGAACGATAGACCTAGGGTCGGGCGCC
Vektor:	pBAD33	*f*	AGGCCGGCGCCCGACCCTAGGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAGC
		r	CCTCTCGTCTCGTAGAGCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO18	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGCTTCACGAA
		r	GATATCGGCGAACGATAGACCCGAACGCCGTC
Vektor	pBAD33	*f*	CGCCCCTCGACGGCGTTCGGGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAGCC CGG
		r	CCCCGGATTTCGTGAAGCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO21	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGCTTTACGACACACAGGGC
		r	GATATCGGCGAACGATAGACTCAGACCAGATCGCCGGGAT
Vektor:	pBAD33	*f*	ATCCCGGCGATCTGGTCTGAGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAGCC C
		r	GTCTTCATCTCGTGCAGCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO22	*f*	GATATCGGCGAACGATAGACCTAGATCAGGTCGCCG
		r	ACCATCACCATACGGATCCGATGCTGCACGAGATGAAG
Vektor:	pBAD33	*f*	CCCACGGCGACCTGATCTAGGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAG
		r	CCTTTTTCGGCGTCGACCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO22	*f*	GATATCGGCGAACGATAGACCTAGACCAGTTCGCCGGC
		r	ACCATCACCATACGGATCCGATGGTCGACGCCGAAAAAG
Vektor:	pBAD33	*f*	AGGCCGGCGAACTGGTCTAGGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAGCC C
		r	CCTTTTTCGGCGTCGACCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO29	*f*	ACCATCACCATACGGATCCGATGCTGTATGACAGCACAAAG
		r	GATATCGGCGAACGATAGACTCAGACGGCGCCGACCGG
Vektor:	pBAD33	*f*	CGCCGGTCGGCGCCGTCTGAGTCTATCGTTCGCCGATATCGAAAGCC
		r	TTTGTGCTGTCATACAGCATCGGATCCGTATGGTGATGGTGAT
Insert:	DO30	*f*	ACCCGTTTTTTTGGGCTAGCAGGAGGATTAACCA
		r	TCTCATCCGCCAAAACAGCCATTAGAAGAAGTTGCTCAG
Vektor:	pBAD33	*f*	CCTGAGCAACTTCTTCTAATGGCTGTTTTGGCGGATGAG
		r	CTCTCATGGTTAATCCTCCTGCTAGCCCAAAAAAACGGTATGG

Insert 1:	Fxd3	*f*	GGCTAGCAGGAGGATTAACCATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATAC
		r	TCGACTCTAGACCCGGGTTATCAGGAGCCGCGGCC
Insert 2:	Promotor-region pBAD	*f*	AGCCTGGCCGCGGCTCCTGATAACCCGGGTCTAGAGTCGAC
		r	TGATGGTGAGATCCTCTCATATGTAATCCTCCTGGTACCAAAAAAGAGC
Insert 3:	Ferredoxin-Reduktase 2	*f*	TGGTACCAGGAGGATTACATATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATA
		r	AGCTTCTGCAGTCTAGATTATCAGGTCTCGACGAAAGCCTTC
Vektor:	pBAD18	*f*	AGGCTTTCGTCGAGACCTGATAATCTAGACTGCAGAAGCT
		r	TGATGGTGAGATCCTCTCATGGTTAATCCTCCTGCTAGCCC
Insert:	DO16 ohne β-Untereinheit	*f*	GGCTAGCAGGAGGATTAACCATGAGAGGATCT
		r	CTCATCCGCCAAAACAGCC ATTAAATGAGGTCGCCAACCTTAGGC
Vektor:	pBAD33	*f*	AGGTTGGCGACCTCATTTAATGGCTGTTTTGGCGGATGAGAG
		r	TGATGGTGAGATCCTCTCATGGTTAATCCTCC
Insert:	β-Untereinheit	*f*	GGCTAGCAGGAGGATTAACCATGGTTGACGTGATTGAAAAGCCGGC
		r	CTCATCCGCCAAAACAGCCATTAGAAGAAGTT
Vektor:	pBAD33	*f*	AGGTTGGCGACCTCATTTAATGGCTGTTTTGGCGGATGAGAG
		r	TGATGGTGAGATCCTCTCATGGTTAATCCTCC

2.2 Mikrobiologische Arbeiten

2.2.1 Kultivierung von *P. immobile*

P. immobile wächst nur auf Minimalmedium und erreicht im Schüttelkolben eine maximale OD von 0,6. Um genug Zellmasse für die Versuche zu erhalten, wurde das Bakterium im Maßstab von 30 L fermentiert (NLF, Bioengineering AG, Wald, CH). Eine frisch kultivierte Agarplatte wurde genutzt, um 100 mL Kultur (Minimalmedium B +1 % Phenazon) in einem 500 mL Erlenmeyerkolben anzuimpfen. Nach 2 Tagen Inkubation (30 °C, 180 rpm) wurden 400 mL Kultur in einem 2 L Erlenmeyerkolben auf eine OD von 0,06 angeimpft und bis zu einer OD von 0,6 inkubiert. Das Kulturvolumen wurde sukzessive erhöht bis 3 L *P.immobile*-Kultur als Vorkultur zum Animpfen des Fermenters auf eine OD von 0,06 zur Verfügung standen. Die Fermentation erfolgte über 48 h (30 °C, pH 7,0; 0,5 vvm, 100-200 rpm) in Minimalmedium B und 1 % (w/v) Phenazon. Nach 7 h wurden alle Medienkomponenten erneut zugegeben. Nach etwa 31 h erfolgte nochmals die Zugabe von 0,5 % (w/v) Phenazon. Die Zellen wurden durch einen Zentrifugationschritt geerntet (15.000 x g, 30 min, 4 °C). Es wurden 1 g BFM pro eingesetztem g Phenazon erhalten. Die Zellen wurden tiefgefroren gelagert (- 80 °C) oder direkt lyophilisiert (2.2.3).

Für die Anzucht mit *L*-Phenylalanin wurde entsprechend verfahren. Das Kulturvolumen wurde dabei in 2 L Erlenmeyerkolben mit 400 mL-Medium sukzessive bis zu einem Gesamtvolumen von 6 L-Kultur mit einer OD von 0,6 erhöht. Die Kultur wurde danach nicht weiter in einen Fermenter überführt.

2.2.2 Kontrolle der *P. immobile* Kulturen

P. immobile-Kulturen sind aufgrund des langsamen Wachstums des Bakteriums empfindlich für Kontaminationen. Da *P. immobile* nicht auf Komplexmedien wachsen kann, wurde ein Teil der Kultur bei jeder Subkultivierung auf LB-Agarplatten (Tabelle 2-5) ausgestrichen, die Platten für 5 Tage bei 30 °C inkubiert, und danach auf Wachstum kontrolliert. Weitere Methoden der Kontrolle waren die lichtmikroskopische Begutachtung der Kultur und die PCR (2.3.1) auf Gene des Bakteriums (2.1.8).

2.2.3 Sublimationstrockung von geernteten Zellen

Die Zellen aus der Fermentation (2.2.1) wurden in einer Lyophille (ALPHA 2-4 LDplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, DE) gefriergetrocknet (0,016 hPa, -85 °C), nachdem sie in flüssigem N_2 schockgefroren wurden. Die schonende Sublimationstrocknung der Zellen ermöglichte eine höhere Reproduzierbarkeit der Messungen durch vereinfachteres Einwiegen der Zellen und eine Abnahme der Zellatmung (2.6.3).

2.2.4 Heterologe Proteinexpression in *Escherichia coli*

2.2.4.1 Expression der Redoxkomponenten

Der Stamm *E. coli* M15(pREP4) wurde mit den klonierten pQE31-Vektoren, welche die Gene der Redoxpartner tragen, transformiert (2.3.5). Die transformierten Zellen wurden auf selektiven Agarplatten ausgestrichen, welche 100 µg/mL Ampicillin und 30 µg/mL Kanamycin enthielten. 5 mL LB-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie von der selektiven LB-Agarplatte inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm

kultiviert. Am folgenden Tag wurden 400 mL TB-Medium in einem 2 L Schikanekolben mit 4 mL Vorkultur inokuliert. Der Selektionsdruck wurde dabei aufrechterhalten. Die Kultivierung erfolgte im Inkubationsschüttler (Infors AG, Bottmingen, CH) bei 37 °C und 100 rpm bis zu einer OD_{600} von 1,2. Die Expression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur bei 25 °C, 100 rpm für 20 h exprimiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (5000 x *g*, 30 min, 4 °C). Die Zellen wurden in 3 mL Aufreinigungspuffer (s. Tabelle 2-6) (50 mM KPi (pH 7,0), 10 % (w/v) Glycerin, 5 mM DTT) pro g Zellpellet resuspendiert. Die Zellen wurden auf Eis gelagert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (30 min; output 3-4; duty circle: 35 %) (Branson Sonifier 250, Danbury, USA). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (40 min, 50000 x *g*, 4 °C). Der erhaltene Überstand wurde filtriert (0,45 µm).

2.2.4.2 Expression der Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen

Kompetente *E. coli* JW5510-Zellen wurden zuerst mit dem Plasmid pITB5506 und danach mit einem der Plasmide pITB5507-pITB5523, welche die Gene für die α- und β-Untereinheiten tragen, transformiert (2.3.5) und über Nacht bei 37 °C auf selektiven LB-Agarplatten (100 µg/mL Ampicillin, 30 µg/mL Chloramphenicol) inkubiert. 5 mL LB-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Inkubationsschüttler (Infors AG, Bottmingen, CH) kultiviert. Die Antibiotikakonzentrationen blieben zur Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes über die gesamte Anzucht konstant. 400 mL TB-Medium in einem 2 L Erlenmeyerkolben mit Schikane wurden mit 4 mL Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C und 100 rpm bis zu einer OD_{600} von 1,2 inkubiert. Die Expression wurde durch die Zugabe von 0,1 % (w/v) Arabinose induziert. Zusätzlich wurde dem Medium 0,5 mM $FeSO_4$ beigefügt. Nach 20 h Expression bei 25 °C und 100 rpm wurden die Zellen durch eine Zentrifugation (4 °C, 8000 x *g*, 30 min) geerntet. Um einen Aktivitätsverlust zu vermeiden, wurden die Zellen direkt für die *in vivo*-Biotransformationen verwendet (2.5.2).

Für die Optimierung der Expressionsbedingungen in Abschnitt 3.5.3 wurden Expressionstemperatur und Induktionszeitpunkt variiert.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die DNA-Fragmente für den Zusammenbau nach Gibson wurden durch eine Polymerase-Kettenreaktion (englisch: *polymerase chain reaction*, **PCR**) amplifiziert. Die Plasmide, welche als Templat-DNA für die Vektor-Fragmente dienten, sind in Abschnitt 2.1.7 beschrieben. Die inserierten Gene wurden aus dem Genom von *P. immobile* amplifiziert. Die genomische DNA wurde von Dr. O. Reznicek[29] erhalten. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit der KOD Hot Start Polymerase von Novagen® (Merck, Darmstadt, DE) durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 2-11 aufgelistet.

Tabelle 2-11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Polymerase-Kettenreaktion.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Puffer für KOD Hot Start Polymerase (10x)	5	1x
$MgSO_4$ (25mM)	3	1,5 mM
dNTPs (je 2 mM)	5	0,2 mM
Primer *forward* (10 µM)	1,5 µL	0,3 µM
Primer *reverse* (10µM)	1,5 µL	0,3 µM
Templat-DNA	X µL	100 ng
KOD Hot Start Polymerase (1U/µL)	1 µL	0,02 U/µL
dH_20	ad 50 µL	

Die Primer, welche im Reaktionsansatz verwendet wurden, sind in Abschnitt 2.1.7 gelistet. Sie wurden mit der Software SnapGene® 3.3.2 designt. Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler (Mastercycler epgradient, Eppendorf, Hamburg, DE) auf die in Tabelle 2-12 angegebenen Temperaturen temperiert.

Tabelle 2-12: Temperaturprogramm für die Polymerase-Kettenreaktion.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	20 s	
Annealing	x	30 s	30
Elongation	70 °C	30 s/ kb	
Finale Elongation	70 °C	3 min	1

Die verwendete Annealingtemperatur entsprach dem Mittel der Bindungstemperaturen des Primerpaares an die Templat-DNA.

Nach der PCR wurde der gesamte Reaktionsansatz auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Fragment wurde hiernach aus dem Gel extrahiert. Dies ermöglichte die Kontrolle auf eine erfolgreiche Amplifikation und eine Aufreinigung des Ansatzes.

2.3.2 Elektrophoretische Trennung und Gelextraktion von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden durch eine Elektrophorese in einer Agarose-Matrix ihrer Größe nach aufgetrennt. 1 % (w/v) Agarose (Carl Roth, Karlsruhe, DE) wurde in 1x TAE-Puffer (2.1.5) gelöst und aufgekocht. Nach einem Abkühlen auf ~ 40 °C wurde der Lösung 0,1 µL/mL PeqGREEN (Peqlab, Erlangen, DE) zugefügt. Der fluoreszierende Farbstoff PeqGREEN bindet an das DNA-Rückgrat. Das Agarose-Gel wurde zum Aushärten in die Gelkammer gefüllt (PerfectBlue Mini, Peqlab, Erlangen). Die PCR-Ansätze (2.3.1) wurden mit 6x Ladepuffer (Tabelle 2-1) versetzt und die Taschen des Geles pipettiert. Die DNA-Leiter GeneRuler 1kb plus (Tabelle 2-1) wurde zur Größenbestimmung der Fragmente in eine eigene Geltasche pipettiert und mit aufgetrennt. Zur Elektrophorese wurde eine Spannung von 110 V für 1 h angelegt. Nach einer Stunde Laufzeit wurden die DNA-Fragmente im Gel unter UV-Licht (312 nm) visualisiert.

Nach einer erfolgreichen PCR konnten abschließend die Fragmente aus dem Agarosegel mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Tabelle 2-3) (Zymo Research Europe GmbH, Freiburg im Breisgau, DE) extrahiert werden. Die Extraktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.3 Isothermaler Zusammenbau nach Gibson

Doppelsträngige DNA-Fragmente mit überlappenden Enden werden beim isothermalen Zusammenbau nach Gibson zu einem neuen DNA-Molekül zusammengefügt. Eine Exonuklease beginnt im ersten Schritt die 5′-Enden der DNA-Doppelstränge zu verdauen und erzeugt so überhängende Einzelstränge. Die homologen Einzelstränge der einzelnen Fragmente lagern sich nun einander an. Die

Lücke zwischen 5′-Ende des einen Fragmentes und 3′-Ende des anderen wird durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt. Abschließend werden die Fragmente durch eine Ligase miteinander zu einem DNA-Molekül verbunden.

Der isothermale Zusammenbau nach Gibson wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Gene der Redoxpartner und α-Untereinheiten aus dem Genom von *P. immobile* in Plasmide zu klonieren. Gene und Plasmid wurden durch eine Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert (2.3.1). Die homologen Enden der benachbarten Fragmente wurden durch entsprechende Primer eingefügt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2-10 aufgelistet. Die PCR-Ansätze wurden durch eine DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt und die amplifizierten Fragmente aus dem Gel extrahiert. Die DNA-Konzentration der Extrakte wurde bestimmt (NanoDrop ND-1000-Spektrometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US). 15 µL des in Tabelle 2-13 gelisteten Reaktionsansatzes wurden auf Eis aufgetaut und zügig mit 5 µL der zu legierenden Fragmente vermischt. Die Fragmente wurden in einem Verhältnis von 5:1 oder 3:1 (Vektor:Insert) zugegeben. Dieser Ansatz wurde bei 50 °C für 1 h inkubiert und dann in *E. coli* XL-1 blue transformiert (2.3.5). Der Erfolg von Klonierung und Amplifikation der Fragmente wurde durch die Sequenzierung einzelner Klone verifiziert (2.3.6).

Tabelle 2-13: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes.

Komponente	Stammlösung	Volumen [µL]
5x ISO Reaktionspuffer		320
T5 Exonuklease	10 U/µL	0,64
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	2 U/µL	20
Taq DNA Ligase	40 U/µL	160
dH_20		699,36

Der fertige Reaktionsansatz wird zu 15 µL aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Zusammensetzung des verwendeten 5x IXO Reaktionspuffer ist in Tabelle 2-14 gegeben.

Tabelle 2-14: Zusammensetzung des 5x ISO Reaktionspuffer.

Komponente	Stammlösung	Menge
25 %(w/v) PEG-8000	PEG-8000	1,5 g
500 mM Tris/HCl (pH 7,5)	1 M Tris/HCl (pH 7,5)	3000 µL
50 mM $MgCl_2$	2 M $MgCl_2$	150 µL
50 mM DTT	1 M DTT	300 µL
1 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP	100 mM/ dNTP	60 µL
5 mM NAD	100 mM NAD	300

Der 5x ISO Reaktionspuffer wurde sterilfiltriert, zu 100 µL aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

2.3.4 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Um die *E. coli*-Zellen für die Hitzeschocktransformation kompetent zu machen, wurden sie mit der Rubidiumchlorid-Methode behandelt. 5 mL LB-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie von einer LB-Agarplatte inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. 100 mL LB-Medium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben wurden mit 0,5 mL Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation (4 °C, 8000 x *g*, 15 min) geerntet. Das erhaltene Pellet wurde vorsichtig in 30 mL kaltem TfB I-Puffer (2.1.5) resuspendiert. Nach 90 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (4 °C, 8000 x *g*, 15 min), Danach wurde das Pellet in 4 mL kaltem TfB II-Puffer (2.1.5) resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die resuspendierten Zellen wurde zu 50 µL aliquotiert, in flüssigem N_2 schockgefroren und bei – 80 °C gelagert. Eine Auflistung der verwendeten *E. coli* Stämme ist in Abschnitt 2.1.6 gegeben.

2.3.5 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Die eingefrorenen, kompetenten Zellen (2.3.4) wurden auf Eis aufgetaut. 1 µL des Reaktionsansatzes aus dem Zusammenbau nach Gibson (2.3.3) wurde zu den Zellen pipettiert und vorsichtig vermischt. Die Zellen wurden mit der DNA für 20 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 90 s. Danach wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt und mit 500 µL LB-Medium versetzt. Die Zellen konnten nun für 1 h bei 37 °C und 300 rpm im ThermoMixer® (Eppendorf, Hamburg, DE) regenerieren. Ein Teil der Zellen wurde hiernach auf selektiven Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Plasmid-DNA einzelner erhaltener Klone wurde isoliert und sequenziert, um den Erfolg der Klonierung zu verifizieren.

2.3.6 Plasmidpräparation und Sequenzierung

5 mL LB-Medium wurden mit einer einzelnen Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Die Zellen in der Kultur wurden am nächsten Morgen abzentrifugiert (5000 x *g*, 5 min, 4 °C) und in 600 µL dH_20 resuspendiert. Die

Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert. Die Plasmidpräparation wurde mit dem Zippy Plasmid Miniprep Kit (Tabelle 2-3) nach Herstellenangaben durchgeführt. Statt des Elutionspuffers wurde 50 °C warmes dH_20 zur Elution von der Silikasäule verwendet. Das isolierte Plasmid wurde durch eine Sequenzierung (GATC Biotech AG, Konstanz, DE) auf seine Korrektheit geprüft.

2.4 Proteinchemische Arbeiten

2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bicinchoninsäure-Test

Zweiwertige Kupferionen werden in alkalischer Umgebung an den Peptidbindungen von Proteinen reduziert. Bicinchoninsäure bildet in alkalischer Umgebung mit einwertigen Kupferionen einen violetten Komplex, welcher ein Absoprtionsmaximum bei 562 nm besitzt. Das proportionale Verhältnis zwischen gemessener Absorption und Gesamtproteinkonzentration in einer Lösung wird beim Bicinchoninsäure zur Konzentrationsbestimmung genutzt.

Der Assay (Tabelle 2-3) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Proteinstandard diente gelöstes Rinderserumalbumin (Konzentrationsbereich: 0 - 2 mg/mL).

2.4.2 SDS-PAGE

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (englisch: *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*, **SDS-PAGE**) werden die denaturierten Proteine nach ihrem molekularen Gewicht gelelektrophoretisch getrennt. Zunächst wurde die Proteinkonzentration der zu analysierenden Probe bestimmt (2.4.1). Die Proben (aufgereinigte Proteine: ~15 µg, Lysate: ~50 µg) wurden mit 6x SDS-Ladepuffer (Tabelle 2-6) versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat bindet an die denaturierten Proteine (etwa 1,4 g Natriumdodecylsulfat pro g Protein). Die Proteine erhalten dadurch eine konstante, negative Oberflächenladung proportional zu ihrem Molekulargewicht. Die linearisierten Proteine wurden nun nach ihrer Größe respektive Ladung

elektrophoretisch in einer Polyacrylamidmatrix aufgetrennt. Die Proben wurden hierfür auf ein 12% oder 4 – 20 % ExpressPlus ™ PAGE Gele von GenScript (Piscataway, NJ, USA) geladen. Die Gelelektrophoresekammern dienten die Mini-PROTEAN Tetra cell von Bio-Rad (Hercules, CA, USA), welche mit dem Tris-MOPS-SDS-Laufpuffer von GenScript gefüllt wurde (Piscataway, NJ, USA). Die Gelelektrophorese wurde mit 75 mA für ca. 40 min durchgeführt. Die Gele wurden bei Raumtemperatur mit einer Coomassie-Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie Brillantblau R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Ethanol, 60 % (v/v) ddH_2O) für 20 min angefärbt. Das Entfärben des Gels erfolgte über Nacht in Entfärbelösung (10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) Ethanol, 60 % (v/v) ddH_2O). Das Gel wurde mit dH_20 gewaschen und konnte zur Stärkung des Kontrastes erneut in Entfärbelösung inkubiert werden.

2.4.3 CN-PAGE

Bei der farblosen, nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (englisch: *colorless native-polyacrylamide gel electorphoresis*, **CN-PAGE**) werden die Proteine nach ihrer nativen Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Im Gegensatz zur SDS-PAGE (2.4.2) werden die Protein hier nicht denaturiert und erhaltenen ihre natürliche Faltung und Quartärstruktur, weshalb diese Methode zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen und Quartärstrukturen genutzt werden kann. Ebenfalls wird im Gel und in den Puffern kein SDS verwendet.

Die Native-PAGE (Tabelle 2-3) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.4 Proteomanalyse

Das Proteom des Bakteriums wurde nach Wachstum mit Phenazon, Pyrazon und *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle untersucht. *P. immobile* Stamm E wurde aus dem Glycerolstock auf MMB-Agarplatten (+ 1 % (w/v) Kohlenstoffquelle) ausgestrichen. Diese frisch kultivierten Agarplatten dienten der Inokulation einer 40 mL MMB-Kultur (Phenazon, *L*-Phenylalanin: 1 g/L; Pyrazon: 0,4 g/L) (vgl. 2.1.4.1) in 200 mL Schüttelkolben auf eine OD von 0,1. Die Kulturen wurden bei 30 °C, 180 rpm bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert. Jede Kultur wurde dreifach überimpft. Bei

jedem Überimpfen und jeder Probennahme wurde die Reinheit der Kultur kontrolliert (2.2.2).

Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen geerntet (5000 x *g*, 20 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in KPi-Puffer (50 mM, pH 7,0) resuspendiert und dabei auf ein 1/80 des vorherigen Volumens aufkonzentriert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (6 min; output 1-2; duty circle: 35 %) (Branson Sonifier 250, Danbury, USA). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (40 min, 50000 x *g*, 4 °C) und in KPi-Puffer (50 mM, pH 7,0) resuspendiert. Die Proteinkonzentration von Lysat und resuspendierten Zelltrümmern wurde mit dem Bicinchoninsäure-Test bestimmt (2.4.1). Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein pro Probe auf die Native-PAGE aufgetragen (2.4.1). Der Massenbereich um 217 kDa (vgl. Abbildung 3-8) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine mit Trypsin behandelt.[103]

Der Trypsinverdau und alle weiteren geschilderten Schritte wurden von der Core Facility Hohenheim Modul Massenspektrometrie (Universität Hohenheim, Stuttgart, DE) durchgeführt. Die Peptide wurden direkt auf eine EASY-Spray Säule aufgetragen (PepMap RSLC C18, 2µm 100 Å 75µm x 250mm Säule, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE). Die Nano-LC-ESI-MS/MS Experimente wurden auf einem EASY-nLC 1200 System (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE) durchgeführt. Dieses ist mit einem Q-Exactive Plus Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE) gekoppelt, welches ein EASY-Spray zur Nano-Elektrospray-Ionisation nutzt (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, DE).[104] Die detektierten Peptide wurden mit den im Anhang angefügten Sequenzen der annotierten ROs durch die Software Mascot 2.6 (Matrix Science, UK) abgeglichen und in die Scaffold Software 4.8.6. (Proteome Software, USA) transferiert.

Alle Anzuchten und Proteomanalysen erfolgten im biologischen Triplikat.

2.4.5 Aufreinigung der Redoxpartner

Die Redoxpartner wurden wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben exprimiert. Der Expressionsvektor pQE-31 bot die Möglichkeit die Proteine N-terminal mit einem His-*Tag* von sechs Histidinen zu fusionieren. Die Affinität eines solchen Polyhistidin-tags zu immobilisierten Metallionen wie z.B. Nickel und Cobalt kann zur Aufreinigung von

Proteinen durch eine Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie werden (englisch: *Immobilized metal ion affinity chromatography*, **IMAC**) genutzt werden.[105] Die Metallionen werden häufig an eine Matrix aus Nitriloessigsäure-Agarose (NTA) gebunden. Die gebundenen Proteine können später wieder durch eine Verdrängung mit Imidazol von der stationären Phase gelöst werden.

Zur Aufreinigung wurden His GraviTrap™ Talon®-Säulen (GE Healthcare, Chicago, US) verwendet. Die Säulen wurden mit 4 Säulenvolumen (englisch: column volume, **CV**) dd$H_2$0 gewaschen und mit 8 CV Aufschlusspuffer mit 5 mM Imidazol äquilibriert. Die Säule wurde mit dem filtrierten Zelllysat beladen. Die Elutionsschritte und verwendeten Imidazolkonzentrationen sind in Tabelle 2-15 aufgelistet.

Tabelle 2-15: Elutionsschritte der IMAC.

Enzymkomponente	**Reinigungsschritte**		Aufschlusspuffer mit	
Ferredoxin	1.	2 CV	5 mM Imidazol	
	2.	2 CV	10 mM Imidazol	
	3.	4 CV	50 mM Imidazol	
	4.	4 CV	150 mM Imidazol	<- sammeln
	5.	5 CV	300 mM Imidazol	
Reduktase	1.	2 CV	5 mM Imidazol	
	2.	2 CV	10 mM Imidazol	
	3.	6 CV	50 mM Imidazol	<- sammeln
	4.	4 CV	300 mM Imidazol	

Die His GraviTrap™ Talon®-Säulen wurden mit 2 CV dd$H_2$0 und mit 2 CV wässrigem 20 % (v/v)-Ethanol gewaschen und bei 4 °C in 20 % (v/v)-Ethanol gelagert.

Die Eluate wurden mit Vivaspin® Zentrifugalkonzentratoren (MWCO: 10 kDa) gewaschen, um restliches Imidazol zu entfernen. Hierfür wurden die Eluate mit Aufschlusspuffer (s. Tabelle 2-6) verdünnt und in den Vivaspin® Zentrifugalkonzentratoren zentrifugiert (5000 x *g*, 20 min, 4 °C). Der Durchfluss wurde verworfen und das Eluat viermal gewaschen. Die Proteine wurden auf etwa 1 mL aufkonzentriert, zu 100 µL aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.4.6 Triton X-100-Aufschluß nach Rosenberg

1 g gewaschene *P.immobile*–Zellen, welche durch eine Fermentation (vgl. Abschnitt 2.2.1) des Stammes erhalten wurden, wurden in 5 mL Aufschlusspuffer (Tabelle 2-6) aufgenommen. Die Suspension wurde 5 min auf Eis gelagert. Danach wurde sie mit 10 mg Lysozym in 5 mL 100 mM Tris/HCl (pH 7,8) pro g behandelte *P. immobile*-Zellen versetzt. Die Zellen wurden gevortext und für weitere 30 min auf Eis bis zur Lyse gelagert. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von 10 mM $MgCl_2$ eingestellt (Stammlösung: 0,1 M $MgCl_2$), mit einer Spatelspitze DNase versetzt und 15 min auf Eis gelagert. Nach dem Viskositätsabfall wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (50000 x *g*, 40 min, 4 °C).

Die Zelltrümmer wurden mit Hilfe eines Potter-Homogenisators in 20 mL eiskaltem Solubilisierungspuffer (Tabelle 2-6) pro g lysierten Zellen aufgenommen. Der Solubilisierungspuffer enthielt 1 % (w/v) Triton X-100, welcher nach Rosenberg[106] die Solubilisierung der Dioxygenasen ermöglichen sollte. Die Suspension wurde für 1 h oder maximal über Nacht inkubiert und abschließend abzentrifugiert (50000 x *g*, 40 min, 4 °C). Der Überstand konnte an einer DEAE-Säule aufgereinigt werden (2.4.7).

2.4.7 Ionenaustauschchromatographie

Nach dem Triton X-100-Aufschluß (2.4.6) wurden 45 mL des Überstandes auf eine mit 50 mM KPi-Puffer (pH 7,0) mit 5 mM DTT equilibrierte DEAE-Säule (XK 16/20, GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL; USA) aufgetragen. Die Aufreinigung erfolgte an einer Äktapurifier (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL; USA).

Höhe = 20 cm

Innerer Durchmesser = 1,6 cm

Packungsmaterial: TOYOPEARL DEAE-650M (Tosoh Bioscience, Tokio, Japan)

Äquilibrierungs-/ Waschpuffer = 50 mM KPi-Puffer (pH 7,0) mit 5 mM DTT

Elutionspuffer = 1 M NaCl in Äquilibrierungspuffer

Ungebundenes Protein wurde von der Säule mit dem dreifachen Säulenvolumen an Waschpuffer gewaschen. Dann wurde ein linearer Gradient von 0-1 M NaCl über 50 min gefahren (Pumpleistung: 5mL/min, 5mL/Fraktion). Abschließend wurde die Säule mit dem dreifachen Säulenvolum Elutionspuffer gespült und dem dreifachen Volumen Äqulibrierungspuffer reäquilbriert. Die Absorption im Eluat wurde bei 280 nm verfolgt. Die Dioxygenasen waren im Durchfluss abgetrennt von den Redoxpartnern enthalten. Der Durchfluss wurde mit Vivaspin® Zentrifugalkonzentratoren (MWCO: 10 kDa) aufkonzentriert und in den *in vitro* Biotransformationen eingesetzt (2.5.1).

2.5 Biotransformationen

2.5.1 Analytische Biotransformationen *in vitro*

Die aufgereinigten Redoxkomponenten (2.4.5), sowie die aus *P. immobile* Stamm E aufgereinigte Oxygenasekomponente (2.4.7), wurden auf Eis aufgetaut. Die *in vitro* Reaktionen wurden in einem Volumen von 200 µL in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,0) durchgeführt. Die Komponten Ferredoxin-Reduktase-Oxygenase wurden im stöchiometrischen Verhältnis 1:5:20 (1 µM: 5 µM: 20 µM) zugegeben. Als Cofaktoren wurden 2 mM NADH und NADPH zugesetzt, welche durch das Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)-System regeneriert wurden (12 U/mL G6PDH, 5 mM G6P, 1 mM $MgCl_2$). Als Substrat wurde 2 mM Phenazon zugesetzt. Die Biotransformation wurde für 24 h bei 30 °C durchgeführt. Die Umsetzungen wurden wie in 2.6.1.1 beschrieben analysiert.

2.5.2 Analytische Biotransformationen *in vivo*

Nach der Zentrifugation (2.2.4) wurden die Zellen in 100 mM KPi-Puffer pH 7,0 mit 30 mM Glucose resuspendiert (0,2 g/mL). Die Reaktion der ruhenden Zellen wurde in 20 mL Headspace-Vials mit 1 mL Reaktionsvolumen durchgeführt. Die Substratkonzentration betrug 2 mM (Pyrazon, Phenazon und *L*-Phenylalanin) oder 10 mM (Phenylessigsäure, Phenylpropionsäure und Zimtsäure). Die Biotransformationen wurden für 24 h bei 30 °C und 180 °C im Inkubationsschüttler

inkubiert. Negativkontrollen wurden mit *E. coli* JW5510-Zellen durchgeführt, welche mit dem pBAD33-Leervektor transformiert wurden.

2.5.3 Biotransformationen mit *P. immobile*

Da für die gesuchten Dihydrodiole oft kein Produktstandard kommerziell erhältlich war, wurde die Retentionszeit und das Fragmentierungsmuster des Metaboliten durch eine Biotransformation mit dem Bakterium *P. immobile* Stamm E erhalten. Etwa 100 mg *P. immobile*-Zellen wurden in 1 mL KPi-Puffer (50 mM, pH 7,0) resupendiert. Die Zellen wurden mit 2 mM des Substrates bei 30 °C, 180 rpm für 5-60 min inkubiert und die Reaktion durch Extraktion beendet (vgl. 2.6). Die Analyse der Umsetzungen wurden als Positivkontrolle verwendet.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Flüssigchromatographische Analyse

2.6.1.1 Pyrazon und Phenazon

Die Proben wurden mit dem QuEChERS Universal Dispersive SPE Kit (2 mL) von Agilent (Santa Clara, CA, USA) extrahiert. 750 µL Probe wurden in den im Kit enthaltenen Zentrifugationsröhren mit 750 µL Acetonitril versetzt und für 1 min gevortext. Die Zentrifugationsröhrchen enthielten ein Sorbens (50 mg PSA, 50 mg C18; 7,5 mg GCB) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) zur Reduktion der Hintergrundmatrix und 150 mg $MgSO_4$ zur erleichterten Phasentrennung. Nach einem Zentrifugationsschritt (5000 x *g*, 2 min) wurde die organische Phase mittels Flüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie LC-MS (Agilent 1260 Infinity Binary LC System mit 6130 Quadrupole MS) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) analysiert. Für die Auftrennung der Analytenmoleküle wurde eine Eclipse XDB-C8 Säule (2,1 x 150 mm, 3,5 µm Partikelgröße) (Agilent, Santa Clara, US) verwendet und ein Gradienten-Programm (Tabelle 2-16) bei 40 °C gefahren. Die Flussrate der mobilen Phase betrug 0,4 mL/min. Es wurde 1 -10 µL der Probe auf die Säule injiziert

und das UV Signal bei der maximalen Absorptionswellenlänge verfolgt (Phenazon: 254 nm; Pyrazon: 225 nm).

Tabelle 2-16: LC-Gradienten-Methode zur Analyse von Pyrazon- und Phenazon-Umsetzungen.

Zeit [min]	**Verhältnis der verwendeten Laufmittel**	
	dH_20 + 0,1 % (V/V) Ameisensäure [%]	Methanol [%]
0	98	2
3	98	2
13	80	20
18	40	60
19	98	2
24	98	2

Die Bildung des Dihydrodiols der beiden Substrate wurde im SIM-Modus (ESI Ionisierung; *drying gas flow*: 12,5 L/min; *nebulizer pressure*: 40 psi; *drying gas temperatur*: 325 °C; *capillary voltage*: + 5000 V) mit positiver Ionisierung detektiert (Phenazon: m/z = 223; Pyrazon: m/z = 256).

2.6.1.2 L-Phenylalanin

Die Biotransformationenen wurden abzentrifugiert (5000 x *g*, 2 min). Der Überstand wurde filtriert (Porengröße 0,45 µM) und wässrig auf die LC-MS (Agilent 1260 Infinity Binary LC System mit 6130 Quadrupole MS) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) eingespritzt. Die Biotransformationen wurden über eine Eclipse XDB-CN (4,6 mm×150 mm, 5 µm Partikelgröße) (Agilent, Santa Clara, US) aufgetrennt. Als mobile Phase diente ein Gemisch von H_2O-Acetonitril-Methanol-Ameisensäure-25 % (w/v) Ammoniumhydroxidlösung (23-2-2-0,005-0,005 % (v/v)). Es wurde ein isokratischer Fluss (0,5 mL/min) für 7 min bei 25 °C angelegt. *L*-Phenylalanin wurde im SIM-Modus (ESI Ionisierung; *drying gas flow*: 12,5 L/min; *nebulizer pressure*: 40 psi; *drying gas temperatur*: 325 °C; *capillary voltage*: + 5000 V) mit positiver Ionisierung detektiert (m/z = 166).

2.6.2 Gaschromatographische Analyse

2.6.2.1 Phenylcarbonsäuren

Die *in vivo* Umsetzungen von Benzoesäure, Phenylessigsäure, Phenylpropionsäure und Zimtsäure wurden gaschromatographisch untersucht. 750 µL der Biotransformationenen wurden mit 35 µL 37 %(w/v) HCl versetzt. Die Proben wurden mit MTBE (+ 0,1 mM Methoxyphenylessigsäure als interner Standard) im Verhältnis 1:1 extrahiert. Die organische Phase wurde an einem Genevac EZ-2 Plus Evaporator (Genevec Ltd., Ipswich, England) abgedampft. Die Rückstände wurden in 50 % MTBE und 50 % BSTFA +TMCS (99:1) aufgenommen und in GC Vials überführt. Danach wurden die Proben für 30 min bei 70 °C derivatisiert.

1 µL der Proben wurden mit einem Split von 1:10 auf eine Shimadzu GC-2010-FID, welche mit einem AOC-20i Autoinjektor (Shimadzu, Nakagyo-ku, Japan) ausgestattet war, aufgetragen. Die Proben wurden mit H_2 als Trägergas (30 cm s^{-1}, Injektortemperatur: 250 °C) über eine DB-5 Säule (5% Phenyl/ 95% Methylpolysiloxan) (30m×0,25mm×0,25µm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) aufgetrennt. Die Detektion der Analyten erfolgte über einen Flammenionisationsdetektor (FID, Detektortemperatur 330 °C). Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 2-17 angegeben.

Tabelle 2-17: Temperaturprogramm für GC-FID.

Anfangstemperatur	Gradient	Endtemperatur	Halten für
		90 °C	1 min
90 °C	12 °C/min	280 °C	1 min
280 °C	65 °C/min	320 °C	3 min

Die Proben wurden ebenfalls massenspektroskopisch untersucht. 1 µL der Proben wurden mit einem Split von 50 auf eine Shimadzu GC-2010, welche mit einem AOC-5000 Autoinjektor ausgestattet war, aufgetragen. Die Proben wurden mit He als Trägergas (lineare Geschwindigkeit: 30 cm s^{-1}) über eine HP-5ms Säule (5% Phenyl/ 95 % Methylpolysiloxan) (30m×0,25mm×0,25µm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) aufgetrennt. Als Detektor wurde ein Massenspektrometer (GCMS-QP2010) verwendet. Die Massenspektren wurden mit einer Ionisierung (EI, Electron Ionization) von 70 eV, einer Interface Temperatur von 250 °C und eine Ion Source Temperatur

von 200 °C aufgenommen. Die Massenfragmente wurde in einem Scan-Bereich von *m*/*z*: 40 – 450 detektiert. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 2-18 angegeben.

Tabelle 2-18: Temperaturprogramm für GC-MS.

Anfangstemperatur	Gradient	Endtemperatur	Halten für
80 °C	13 °C/min	300 °C	0 min
300 °C	20 °C/min	320 °C	3 min

2.6.3 Sauerstoffmessung

Im Katabolismus des Bakteriums werden beim Abbau der Kohlenstoffquelle zwei Moleküle Sauerstoff verbraucht. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs des Bakteriums in Anwesenheit eines Substrats, bietet eine Möglichkeit das Spektrum, der als Kohlenstoffquelle akzeptierten Verbindungen, zu charakterisieren und damit auch eine erste Aussage über die Substratspezifität der ROs zu treffen.

Abbildung 2-1: Küvette aus optischem Glas mit eingeklebten, planarem Sauerstoffmesspunkt (rot).

Als Messkammer dienten 3500 µL Küvetten aus optischem Glas in die ein planarer Sauerstoffmesspunkt (SP-PSt3-NAU-D5-YOP, PreSens GmbH, Regensburg, DE) mit Silikonkleber (SG1 Silicone Glue, PreSens GmbH, Regensburg, DE) eingeklebt wurden. Das Licht einer LED, welches durch eine Kunststofflichtleitfaser (POF-1SMA) geleitet wird, regt den optischen Sauerstoffsensor in der Messkammer an Fluoreszenz zu emittieren. Die Energie kann ebenfalls in einem strahlungsfreien Transfer auf den Gelöstsauerstoff übertragen werden, wodurch es zu einer Abnahme oder Löschung des Fluoreszenzsignals kommt.[1] Die Stärke des Fluoreszenzsignals ist somit umgekehrt proportional zur Konzentration des Gelöstsauerstoffs. Die Sensorantwort wird über die Lichtleiterfaser zurück zum Sauerstoffmessgerät (Fibox 4, PreSens, GmbH Regensburg, DE) übertragen (vgl. Abbildung 2-2). Dies ermöglicht eine nicht-invasive Messung des gelösten Sauerstoffes in Messkammer. Die Kalibrierung erfolgt über eine Zweipunktkalibrierung. Die gesättigte Sauerstoffkalbrierlösung bestand aus luftgesättigtem, entioniserten Wasser, welches ca. 1 min stark geschüttelt wurde. Die

[1] URL: www.presens.de/de/wissen/grundlagen/detail/messprinzip-chemisch-optischer-sensoren-1554.html [Stand: Februar 2019]

anoxische Lösung bestand aus einer 0,1 M Natriumascorbat-Lösung mit 0,1 M NaOH. Die Kalibrierlösungen wurde hierbei auf die spätere Messtemperatur von 30 °C temperiert. Die Sauerstofflöslichkeit in mg/L für luftgesättigtes Wasser in Abhängigkeit der Temperatur ist in der europäischen DIN-Norm 25814 hinterlegt.

Das Reaktionsvolumen in der Küvette betrug 2 mL. Die Sauerstoffkonzentration in der Lösung (0,5 mg/mL lyophilisierte Zellen und 2 mM NADH in 50 mM KPi (pH 7.0)) wurde solange unter Rühren aufgezeichnet bis die gemessene Sauerstoffkonzentration ein Plateau erreichte (in diesem Versuchsaufbau nach 25 min). Das Rühren durfte nicht so stark sein, dass sich Luftbläschen bildeten, welche die Messung verfälschten. Durch die Zugabe von 100 µL Substratlösung (Substrat in 50 mM KPi (pH 7.0)) wurde die Reaktion gestartet und der Sauerstoffabfall über 10 min verfolgt. Die Messung erfolgt im technischen Triplikat und abzüglich einer Negativkontrolle, in der 100 µL Pufferlösung ohne Substrat zugegeben wurde. Bei Löslichkeitsproblemen des Substrates wurde der Substratlösung (auch in der Negativkontrolle!) DMSO zugesetzt. Eine fünfte Messkammer, welche nur Pufferlösung enthielt, diente als Referenzgefäß

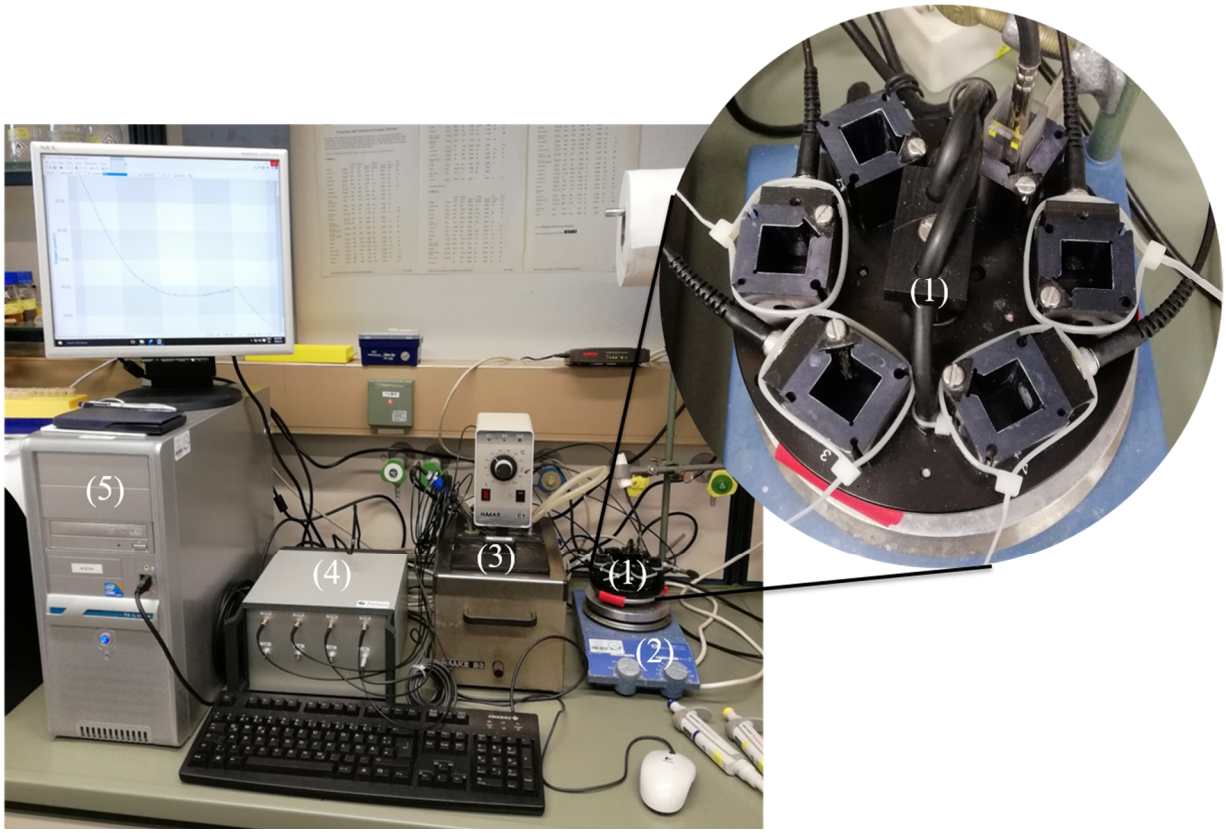

Abbildung 2-2: Aufbau der Sauerstoffmessung von links nach rechts: (1) Heizbarer Küvettenhalter (verbunden mit (3)) zur gleichmäßigen Temperierung der vier Messzellen; (2) Rührplatte zur gleichmäßigen Durchmischung der Messküvetten; (3) Thermostat (HAAKE C1, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA; USA) (4) Mehrkanal-Sauerstoffmeßgerät (OXY-4 SMA, PreSens GmbH, Regensburg, DE); (5) Rechner zur graphischen Darstellung.

für die Temperatursonde (Pt100, PreSens, GmbH Regensburg, DE), die zu jedem Messpunkt (Messintervall: 3 s) die Temperatur aufnahm.

2.7 Bioinformatische Methoden

2.7.1 Basic Local Alignment Search Tool

Um die Ähnlichkeit der untersuchten α-Untereinheiten zu Proteinen aus anderen Organismen abzuschätzen, wurde die Datenbank UniProt (***uni****versal* ***prot****ein database*) mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) nach homologen Proteinsequenzen durchsucht (URL: www.uniprot.org/blast/; Stand: Februar 2019). BLAST vergleicht hierbei mittels lokaler Alignments die Suchsequenz mit den Sequenzen in der Datenbank UniProt. Hiernach werden die Sequenzen aus der Datenbank nach ihrer Homologie geordnet und ausgegeben.

2.7.2 Multiples Sequenzalignment

Das Alignment der α-Untereinheiten, sowie das Erstellen des phylogenetischen Stammbaums, wurde durch ein multiples Sequenzalignment mit dem Programm Clustal Omega durchgeführt (URL: www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/; Stand: Februar 2019). Zur graphischen Darstellung des Alignments wurde die kostenfreie Software Jalview (URL: www.jalview.org; Stand: Februar 2019) verwendet.

2.7.3 Homologie-basierte Proteinmodellierung

Die Lage der variablen Sequenzregion, welche im Alignment (2.7.3) aufgefallen ist, sollte in der dreidimensionalen Struktur bestimmt werden. Eine Möglichkeit einen Eindruck von der dreidimensionalen Struktur eines Proteins zu bekommen ist die Homologie-basierte Proteinmodellierung. Die Grundannahme dieser Methode ist es, dass eine hohe Sequenzidentität zweier Proteine ebenfalls eine hohe Übereinstimmung in der dreidimensionalen Struktur bedeutet. Deshalb wird zu Beginn

der Modellierung nach einem oder mehreren homologen Proteinen mit bekannter dreidimensionaler Struktur gesucht, welche als *template* bzw. Vorlage dienen. Die Aminosäurekette des Zielproteins wird dann in diese Struktur hineinmodelliert. Die Modellierung wurde mit der Software YASARA (YASARA Biosciences GmbH, Vienna, AUT) durchgeführt.[2] Diese durchsucht selbstständig die Datenbank UniProt nach verwandten Sequenzen und nutzt diese, um die Datenbank PDB (***P****rotein* ***D****ata* ***B****ank*) nach geeigneten Proteinstrukturen zu durchsuchen. Die gefundenen Proteinstrukturen dienen YASARA als *template* zur Erstellung der Homologie-Modelle. Die Visualisierung der erhaltenen Proteinmodelle wurde mit Pymol realisiert (URL: www.pymol.org; Stand: Februar 2019).

[2] URL: www.yasara.org/homologymodeling.html [Stand: Februar 2019]

3 Ergebnisse

Das α-Proteobakterium *Phenylobacterium immobile* (vgl. Abschnitt 1.2.1) zeichnet sich durch sein ungewöhnliches Substratspektrum aus. Es nutzt Xenobiotika wie Pyrazon und Phenazon als einzige Kohlenstoffquelle, während es kein Wachstum auf Komplexmedien zeigt. Den Abbauweg von Pyrazon[11] und Phenazon[102] in *Phenylobacterium immobile* Stamm E (DSM 1986) konnten Lingens und Kollegen in den 1970er Jahren aufklären. Es gelang ihnen sowohl die am Abbau beteiligten Enzyme zu isolieren als auch die einzelnen Metabolite nachzuweisen (vgl. Abbildung 1-7).[94,95,97,101] So zeigten 1977 Sauber und Kollegen, dass der initiale Abbauschritt, die Oxidation des Phenylrestes zum *cis*-*ortho*-Dihydrodiol, durch ein Dreikomponentensystem katalysiert wird.[94] Im Jahr 2015 wurde das Genom des Stammes E vom Institut für Technische Biochemie in Stuttgart sequenziert und 19 ORFs annotiert, welche für α-Untereinheiten von Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen kodierten.[12]

Im Abschnitt 3.1 der vorliegenden Arbeit wurden die im Genom kodierten α-Untereinheiten mit bioinformatischen Methoden untersucht. Das Spektrum der Substrate, welche von *P. immobile* dihydroxyliert werden, wurde in Abschnitt 3.2 betrachtet. Anschließend wurden Proteomanalysen nach Wachstum auf diesen Substraten durchgeführt, um zu untersuchen, welche der im Genom kodierten α-Untereinheiten in den *P. immobile*-Zellen exprimiert werden (Abschnitt 3.3). Abschließend sollte die Aktivität der ROs in *E. coli* rekonstituiert werden. Geeignete Redoxpartner für die Oxygenasekomponente wurden in Abschnitt 3.4 gefunden. In Abschnitt 3.5 wurde eine Plasmidbibliothek mit allen im Genom kodierten ROs erstellt, diese heterolog in *E. coli* exprimiert, und gegen ein ausgewähltes Substratpanel auf Aktivität getestet.

3.1 Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen

Im Genom des Stammes E wurden 19 ORFs annotiert, welche für α-Untereinheiten von Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen kodieren.[12] Die Nummerierung der annotierten α-Untereinheiten, sowie ihre Nomenklatur (Beispiel: α-Untereinheiten 4 ≙ DO4) ist der Dissertation von Dr. O. Reznicek entnommen (s. Anhang 6.1).[29] Die zwei

Gene der α-Untereinheiten DO30 und DO31 liegen auf einem 19,24 kbp großen Plasmid. Die restlichen 17 ORFs finden sich im Genom. Zusätzlich wurde im Genom ein ORF annotiert, welcher für eine potentielle β-Untereinheit (DO3) kodiert.

3.1.1 Sequenzidentität der α-Untereinheiten

Den α-Untereinheiten DO2 und DO31 fehlt das charakteristische Rieske-Motiv (**C**X**H**X15-17**C**X2**H**) (vgl. Abschnitt 1.1.1) und sind deshalb wahrscheinlich nicht aktiv.[17] In den folgenden Abschnitten werden diese nicht weiter beachtet. In Tabelle 3-1 ist die Sequenzidentität der 17 potentiell funktionsfähigen α-Untereinheiten zueinander aufgelistet.

Tabelle 3-1: Sequenzidentität der Aminosäuresequenzen in Prozent [%].

		α Untereinheiten Nummer:																
		4	**7**	**8**	**9**	**10**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**21**	**22**	**23**	**29**	**30**	**6**	**11**
α-Untereinheit-Nummer:	4	100	65	68	70	68	69	67	68	69	68	68	68	69	68	69	22	20
	7	-	100	64	70	65	69	67	67	70	68	68	68	69	67	68	21	20
	8	-	-	100	68	66	67	67	67	68	65	66	65	70	69	68	24	21
	9	-	-	-	100	69	70	67	68	68	67	69	68	71	70	68	21	19
	10	-	-	-	-	100	66	65	64	66	65	64	64	69	71	64	22	20
	14	-	-	-	-	-	100	76	81	79	77	74	75	70	73	79	23	22
	15	-	-	-	-	-	-	100	75	74	74	71	76	69	70	75	22	21
	16	-	-	-	-	-	-	-	100	76	78	76	77	70	71	89	23	21
	17	-	-	-	-	-	-	-	-	100	77	73	74	70	70	74	22	21
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	75	74	68	69	74	22	21
	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	74	68	70	77	22	21
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	70	71	74	21	20
	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	71	70	23	21
	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	72	22	21
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	23	21
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	21
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100

Die in der Tabelle 3-1 grün gezeigten 15 α-Untereinheiten besitzen eine hohe Sequenzidentität von 63,7 – 89,0 % und unterscheiden sich nur gering in ihrer Größe: 51,1 ± 0,8 kDa. Die DO6 und DO11 besitzen nur eine sehr geringe Sequenzidentität (19,2 - 23,6 %) mit den anderen α-Untereinheiten. Sie unterscheiden sich mit 43,0 respektive 41,1 kDa auch in ihrer kleineren Größe von den anderen.

Um eine erste phylogenetische Einordnung der kodierten α-Untereinheiten zu ermöglichen, wurde die Datenbank UniProt (***uni****versal* ***prot****ein database*) nach Sequenzhomologen durchsucht (2.7.1). In Tabelle 3-2 sind die ersten zwei Datenbankeinträge mit der höchsten Sequenzidentität für die Suche mit den α-Untereinheiten DO6, DO11 und DO16 gelistet. Die α-Untereinheiten DO16 wurde stellvertretend für die Gruppe aus 15 α-Untereinheiten mit hoher Sequenzidentität (grün gefärbt in Tabelle 3-1) gezeigt.

Tabelle 3-2: Einträge in der UniProt-Datenbank mit hoher Sequenzidentität zu den α-Untereinheiten aus *P. immobile* E.

Query	**Match**			
	ID (UniProt)	Identität [%]	Bezeichnung	Organismus
DO6	A0A1T4TP24	40,3	Phenylpropionat Dioxygenase	*Enhydrobacter aerosaccus*
	A0A235H687	31,0	[2Fe-2S] Bindeprotein	*Azospirillum brasilense*
DO11	A0A328AZT7	75,5	Aromatischer Ring hydroxylierende-Dioxygenase	*Phenylobacterium hankyongense*
	A0A328AJZ9	74.6	Aromatischer Ring hydroxylierende-Dioxygenase	*Phenylobacterium* sp. LX32
DO16	A0A1I4GHU4	48.0	Phenylpropionsäure-Dioxygenase	*Geodermatophilus ruber*
	A0A1C5EXC1	47,2	Phenylpropionsäure-Dioxygenase	*Streptomyces* sp. MnatMP-M27

Die α-Untereinheiten DO11 besitzt die höchste Sequenzidentität (74,6 und 75,5 %) mit Dioxygenasen aus anderen *Phenylobacteria*-Stämmen. Die α-Untereinheiten DO16 hat die höchste Übereinstimmung mit Phenylpropionat-Dioxygenasen aus Actinobacteria (*Geodermatophilius ruber* und *Streptomyces* sp. MnatMP-M27*).* Die α-Untereinheiten DO6 weist die geringste Homologie zu anderen in der Datenbank gespeicherten Proteinen auf. Ähnliche Proteine (40,3 und 31,0 %) finden sich in Proteobacterien wie *Enhydrobacter aerosaccus* und *Azospirillum brasilense.*

3.1.2 Variable Sequenzregion

Die Abbildung 3-1 zeigt einen Ausschnitt aus dem Alignment der 15 α-Untereinheiten, welche eine hohe Sequenzidentität (63,7 – 89,0 %) untereinander aufweisen. Im Alignment zeigt sich, dass sich diese α-Untereinheiten primär in einer variablen Region unterscheiden. Ohne Berücksichtigung dieser variablen Sequenzregion steigt die Sequenzidentität unter den 15 α-Untereinheiten auf 66,0 – 89,3 % an.

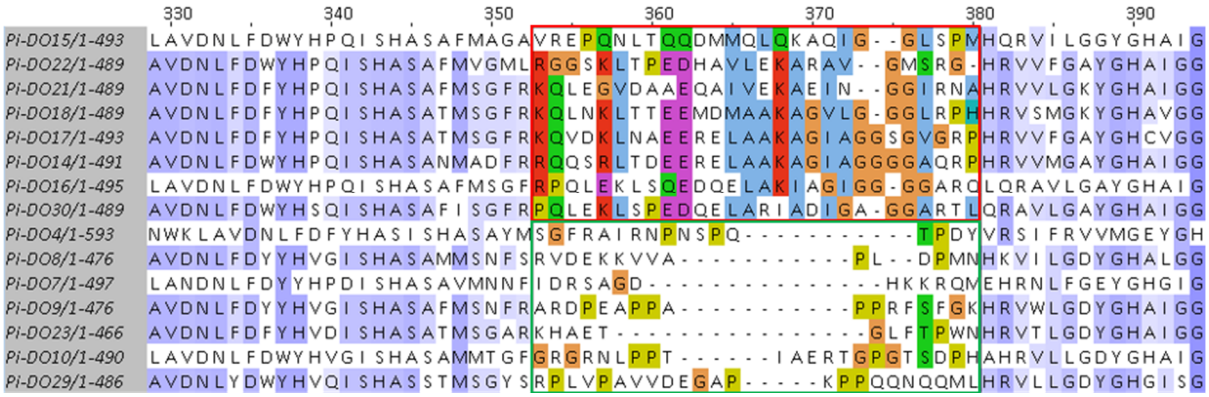

Abbildung 3-1: Alignment der Aminosäuresequenzen. Alignment und Darstellung wurden wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben durchgeführt. Gezeigt sind die 15 Aminosäuresequenzen der α-Untereinheiten, welche eine hohe Sequenzidentität (63,7 – 89,0 %) untereinander aufwiesen (vgl. Tabelle 3-1). Rotes Quadrat: Variabler Sequenzbereich der Gruppe 1. Grünes Quadrat: Variabler Sequenzbereich der Gruppe 2.

Anhand dieser variablen Sequenzregion lassen sich die α-Untereinheiten in zwei Gruppen unterteilen. In der ersten Gruppe besteht der variable Bereich aus 25 – 28 Aminosäuren. Der variable Sequenzbereich lässt sich hier grob in drei Bereiche gliedern. Im ersten Bereich finden sich viele polare Aminosäuren wie Lysin, Glutaminsäure und Asparaginsäure. In der Mitte des Sequenzbereiches finden sich unpolare Aminosäure wie Valin, Alanin und Leucin. Im Ende des Bereiches findet sich in vielen Sequenzen die kleine Aminosäure Glycerin zwei bis viermal hintereinander. Die Sequenzidentität innerhalb der Gruppe 1 beträgt 70,7 – 89,0%.

Der Sequenzbereich, welcher die α-Untereinheiten aus der Gruppe 2 kennzeichnet, ist mit 11 – 23 Aminosäuren deutlich kleiner. Neben einem großen Deletionsbereich findet sich hier häufig die Aminosäure Prolin, welche aufgrund einer fehlenden freien Aminogruppe die Ausbildung von Sekundärstrukturen erschwert. Die Sequenzidentität innerhalb der Gruppe 2 beträgt 64,9 – 71,0%.

In Abbildung 3-2 ist der phylogenetische Stammbaum der kodierten α-Untereinheiten gezeigt. Darunter ist die Lage der annotierten α-Untereinheiten im Genom gezeigt. Die Zugehörigkeit zu der in Abbildung 3-1 dargestellten Unterscheidung in Gruppe 1 und

2 aufgrund eines Unterschiedes in einer variablen Sequenzregion wird durch einen grünen respektive roten Punkt angezeigt.

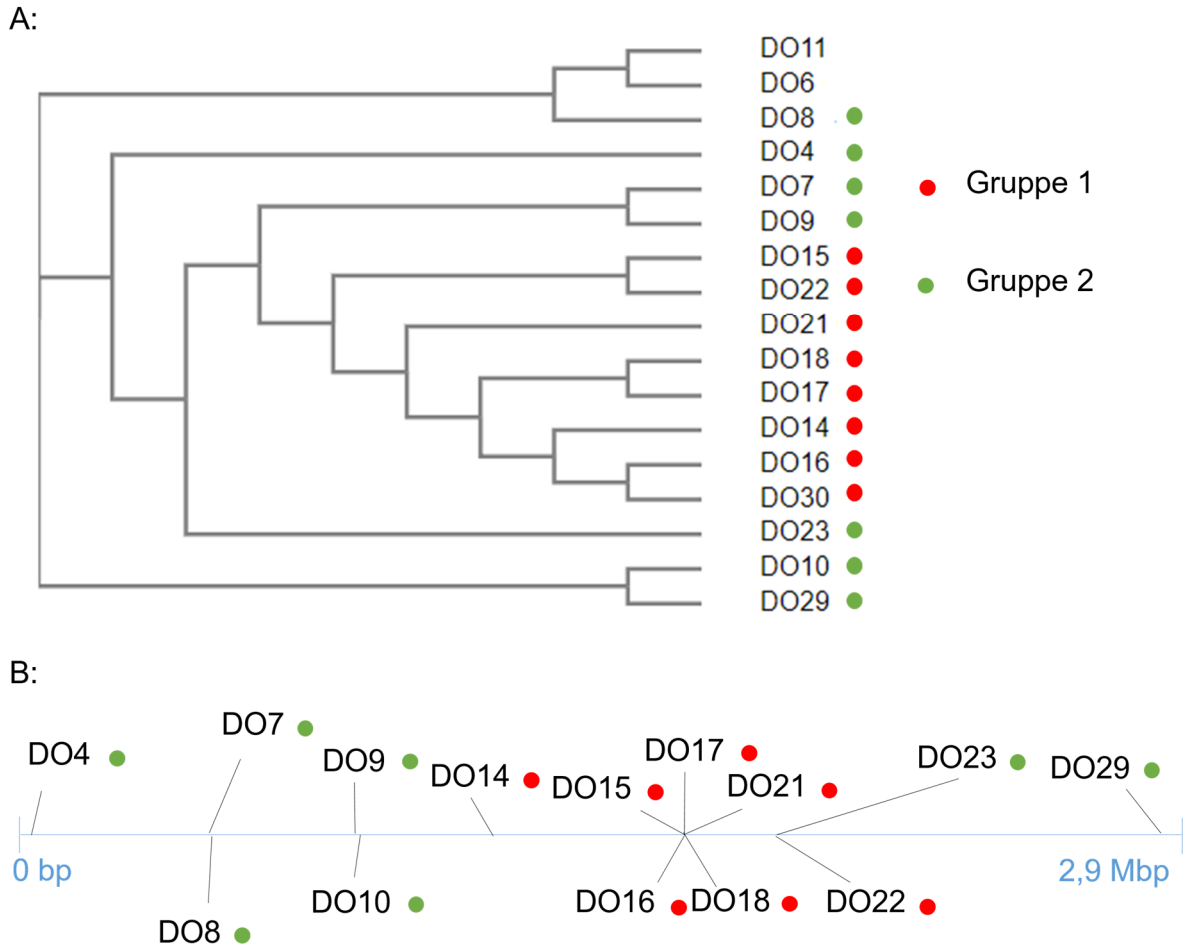

Abbildung 3-2: Verwandtschaft der α-Untereinheiten. A: Phylogenetischer Baum (vgl. 2.7.2) der α-Untereinheiten. Zur Gruppenzuordnung siehe Abbildung 3-1. B: Lage der zugehörigen Gene im Genom. Gezeigt ist der größte Scaffold (2,88 Mbp) aus der Genomsequenzierung des *P. immobile* Stammes E.[12]

Die 15 sequenzhomologen α-Untereinheiten liegen alle in dem größten durch die Genomsequenzierung erhaltenen Scaffold.[12] Der Scaffold 1 umfasst 2,88 Mbp. Während die ORFs der α-Untereinheiten der Gruppe 2 über den gesamten Scaffold verstreut liegen (vgl. Abbildung 3-2), finden sich fast alle α-Untereinheiten (Ausnahmen sind DO14 und DO22), welche in die Gruppe 2 eingeordnet werden können, im selben Bereich auf dem Genom kodiert. In dem Cluster von DO15, DO16, DO17, DO18 und DO21 befinden sich ORFs, die für eine Tn3 Transposase, Resolvase und Invertase kodieren.[107]

Um eine Annahme über die Funktion und Bedeutung der variablen Region in den betrachteten Sequenzen zu treffen, muss ihre Lage in der dreidimensionalen Struktur der Enzyme bestimmt werden. Da keine Kristallstrukturen der Enzyme bekannt sind,

wurden Homologie-Modelle für zwei Stellvertreter aus jeder Gruppe (Gruppe 1: DO8; Gruppe 2: DO18) angefertigt (2.7.1). Die erhaltenen Strukturen sind in Abbildung 3-3 gezeigt.

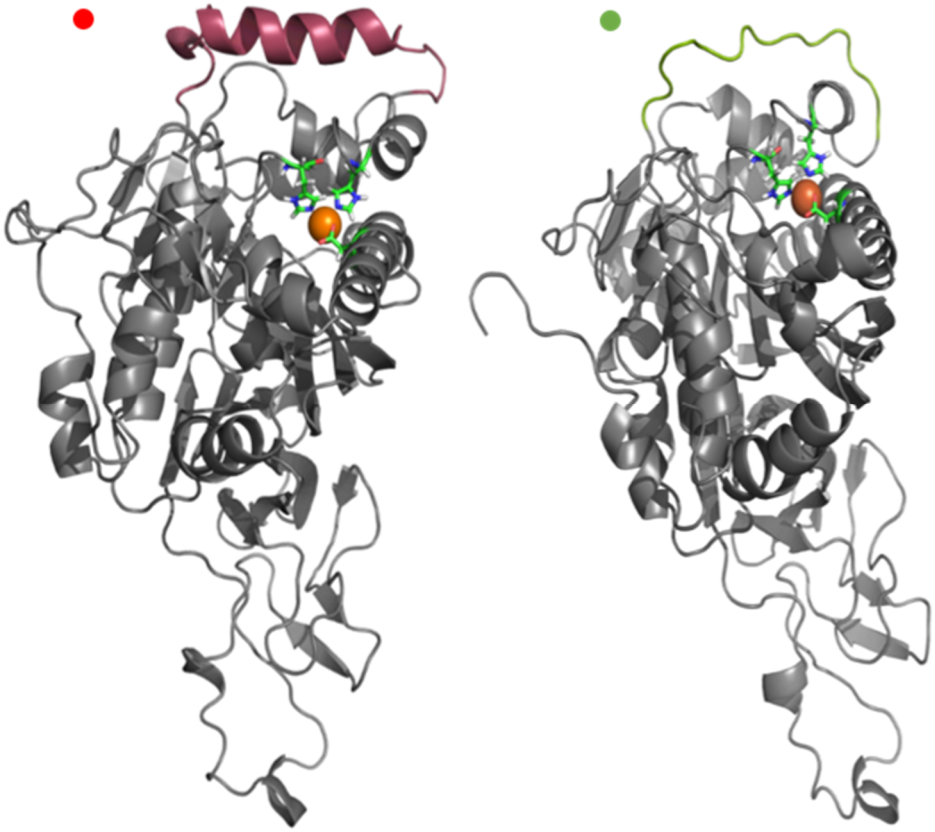

Abbildung 3-3: Homologie-Modelle. Die Homologie-Modelle wurden wie in Abschnitt 2.7.3 beschrieben erstellt. Links: Homologie-Modell der α-Untereinheit DO8. Der variable Sequenzbereich ist in rot gezeigt. Rechts: Homologie-Modell der α-Untereinheit DO18. Der variable Sequenzbereich ist in grün gezeigt. In beiden Strukturen gezeigt ist das katalytisch aktive Eisen (orange) und die koordinierende Triade (grün).

Die Homologie-Modelle zeigten, dass die variablen Sequenzregionen über dem katalytisch aktiven Eisen liegen. Trotz der Sequenzvariabilität besitzen alle α-Untereinheiten die das Eisen koordinierende His-His-Asp-Triade, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich bei allen um funktionale Enzyme handelt. Die Verkürzung der Sequenzregion in den Enzymen der Gruppe 2, sowie die Häufung von Prolinen in diesem Sequenzabschnitt, erschwert die Herausbildung von Sekundärstrukturen, so dass wahrscheinlich eine Loop-Region vorliegt. Das Homologie-Modell bekräftigt diese Annahme.

3.2 Kohlenstoffquellen

Der erste Schritt im Abbauweg von *P. immobile* ist die Oxidation des Phenylrestes zum *cis-ortho*-Dihydrodiol, welche durch eine RO katalysiert wird. Im vorangegangenen Abschnitt wurden die im Genom kodierten, katalytisch aktiven Untereinheiten der ROs mit bioinformatischen Methoden untersucht. In diesem Abschnitt soll ihr Substratspektrum untersucht werden. Der Stamm *P. immobile* E besitzt mit den Kohlenstoffquellen Pyrazon und Phenazon das stärkste Wachstum. Die dabei gebildeten Metabolite werden in Abschnitt 3.2.1 gezeigt. Um einen Eindruck über das Substratspektrum der ROs zu gewinnen, wurden Sauerstoffmessungen durchgeführt, welche die Abnahme der Sauerstoffkonzentration bei der Inkubation von *P. immobile*-Zellen mit möglichen Substraten maßen (3.2.2).

3.2.1 Umsetzung Pyrazon und Phenazon durch *P. immobile* E

Der Stamm *P. immobile* E konnte mit den Kohlenstoffquellen Phenazon und Pyrazon in Flüssigmedium wachsen (Generationszeiten: 7 h mit Phenazon; 7,5 h mit Pyrazon). Da für die gesuchten Dihydrodiole oft kein Produktstandard kommerziell erhältlich war, wurden die Fragmentierungsmuster des Metaboliten durch eine Biotransformation mit dem Bakterium *P. immobile* Stamm E erhalten (vgl. 2.5.3). 100 mL Minimalmedium B mit 0,1 % (w/v) Phenazon wurden in einem 500 mL Schüttelkolben mit einer einzelnen *P. immobile* E Kolonie angeimpft und bis zu einer OD von 0,5 inkubiert (30 °C, 180 rpm). Die Kultur wurde abzentrifugiert (4 °C, 5000 x *g*, 20 min) und das Zellpellet in 1 mL KPi-Puffer (50 mM, pH 7,0) resuspendiert. Die Zellen wurden mit 2 mM Pyrazon respektive Phenazon bei 30 °C, 180 rpm für 5-30 min inkubiert und die Reaktion durch Extraktion beendet. Die Umsetzungen wurden mittels Flüssigkeitschromatographie untersucht (2.6.1). Ein Chromatogramm für die Umsetzung von Phenazon ist beispielhaft in Abbildung 3-4 gezeigt. Die Zuordnung der im UV-Spektrum detektierten Peaks geschah via Massenspektroskopie. Die Fragmentierungsmuster der durch die ROs gebildeten *cis-ortho*-Dihydrodiole sind darunter gezeigt.

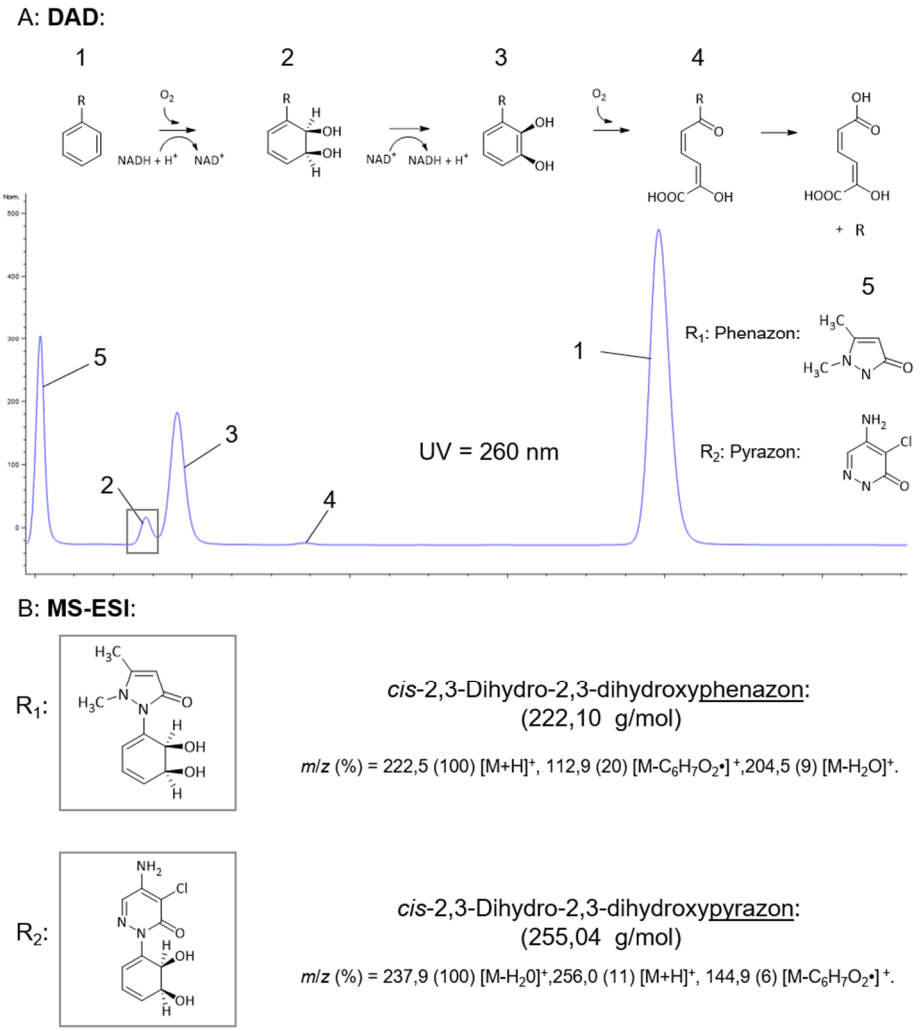

Abbildung 3-4: Biotransformation der Kohlenstoffquellen Phenazon und Pyrazon (vgl. 2.5.3). A: Abbauweg von Phenazon und Pyrazon nach Literatur.[18,26] Beispielhaft darunter ein erhaltenes UV-Chromatogramm. Zuordnung der Peaks durch Massenspektrometrie (2.6.1.1). B: Fragmentierungsmuster der durch die Umsetzung mit ROs gebildeten Dihydrodiole.

3.2.2 Sauerstoffmessungen

Am Abbauweg von Pyrazon[11], Phenazon und Phenylcarbonsäuren[92] sind zwei, sauerstoffverbrauchende Enzyme beteiligt (vgl. Abbildung 1-7). Um das Substratpanel von *P. immobile* E und seiner exprimierten ROs zu ermessen, wurden die Zellen mit den Substraten inkubiert und die Sauerstoffabnahme in der Lösung gemessen. Zusätzlich konnte hier eine erste Aussage über die Affinität der ROs zu den Substraten getroffen werden. Aus Gründen der Vereinfachung wird der Anteil der Catechol-2,3-Dioxygenase (Abbildung 1-7, Enzym III) an der initialen Sauerstoffabnahme nicht weiter beachtet.

Der Stamm E wurde im 30 L-Maßstab fermentiert (2.2.1), um trotz der geringen Zelldichten des Bakteriums in Flüssigkulturen (max. OD 0,6) ausreichend Biomasse für die Messungen zu erhalten. Phenazon diente hierbei als Kohlenstoffquelle. Anschließend wurden die Zellen lyophilisiert (2.2.3). Die Lyophilisierung ermöglichte eine höhere Reproduzierbarkeit durch ein vereinfachtes Einwiegen der Zellen. Außerdem nahm die gemessene Hintergrundaktivität durch ein Wegfallen der Zellatmung ab. Die Messung der Sauerstoffkonzentration in einer Reaktionslösung erfolgte wie in 2.6.3 beschrieben. Eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 0,5 mg/mL Zellen in 50 mM KPi (pH 7,0) mit 2 mM NADH wurde bei 30 °C inkubiert bis die Sauerstoffkonzentration in der Lösung konstant blieb. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Substratlösung gestartet. Alle Messung erfolgten hierbei im technischen Triplikat abzüglich einer Negativkontrolle. War die Änderung der Sauerstoffkonzentration nach Bildung des arithmetischen Mittels und dem Abzug der Negativkontrolle negativ, wurde davon ausgegangen, dass die Substanz ein potentielles Substrat ist.

Keine Abnahme der Sauerstoffkonzentration war bei *L*- und *D*-Phenylalanin, Anilin (und Derivaten), sowie Zimtsäure und Benzoesäure zu beobachten.

Aromatische Carbonsäuren wie Phenylessigsäure, 3-Phenylpropionsäure, 4-Phenylbuttersäure und 5-Phenylpentansäure konnten eine Sauerstoffabnahme induzieren. Genauso die in der Literatur[11,102] beschriebenen Substrate des in Abbildung 1-7 gezeigten Abbauweges: Pyrazon und Phenazon. Die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit steht in hyperbolischer Abhängigkeit zur eingesetzten Substratkonzentration, welche sich durch die Michelis-Menten-Gleichung beschreiben lässt. Die K_m- und v_{max}-Werte für die Umsetzung von Pyrazon, Phenazon und Phenylessigsäure, beispielhaft für die aromatischen Carbonsäuren, unter den in Abschnitt 2.6.3 angegebenen Bedingungen sind in Tabelle 3-3 aufgelistet. Die Graphen in Abbildung 3-5 zeigen die Auftragung der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten der Sauerstoffabnahme gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen.

Der Stamm E zeigt für Phenazon und Pyrazon eine ähnliche Affinität von 13,0 und 12,5 µM. Der v_{max}-Wert ist für Phenazon, welches als Kohlenstoffquelle zur Anzucht des Stammes diente, geringfügig höher mit 6,3 statt 4,8 mU/mg. Die Affinität als auch die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit sind für Phenylessigsäure etwa dreifach

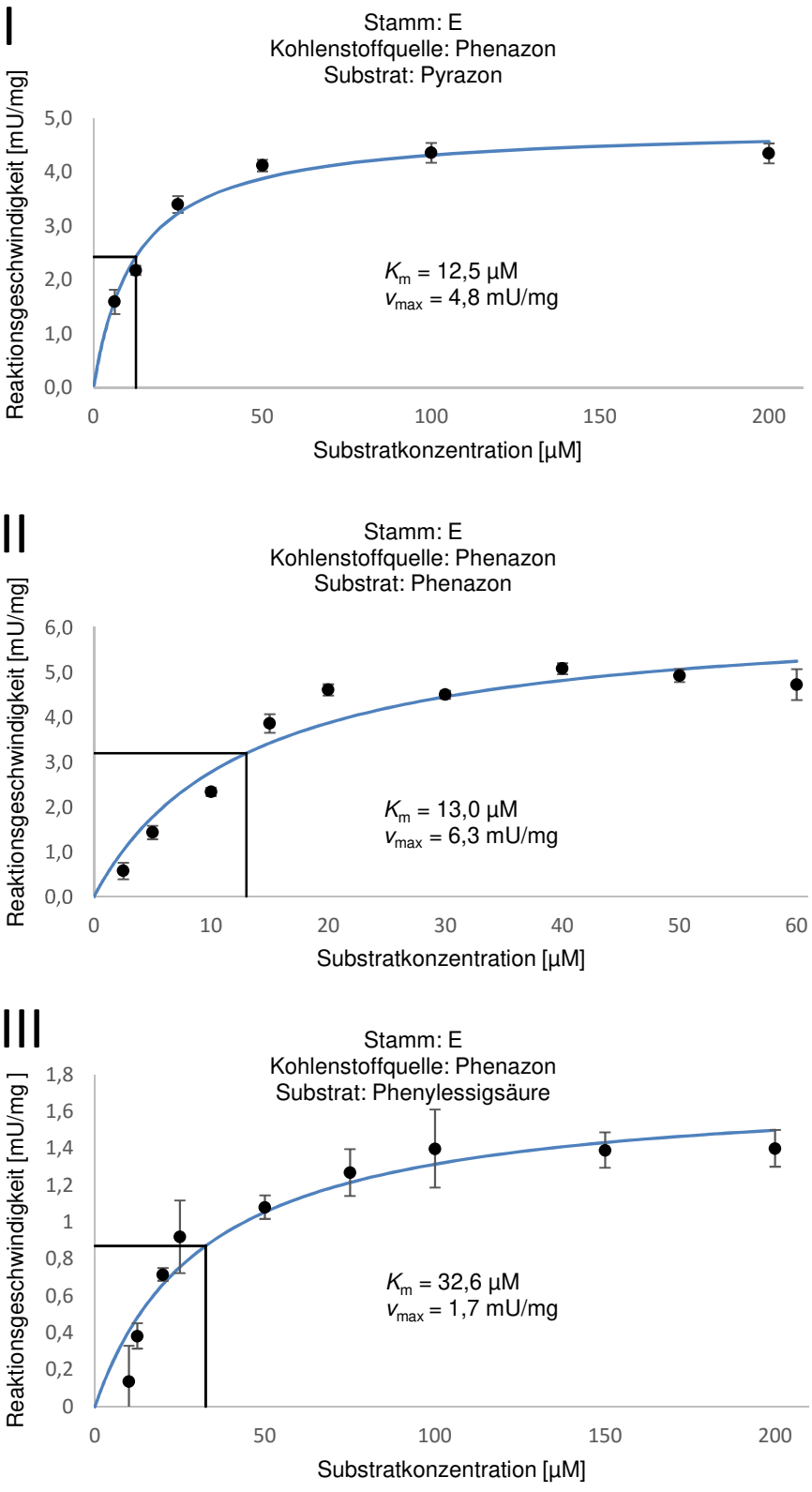

Abbildung 3-5 Sauerstoffmessungen Stamm E nach Wachstum mit Phenazon als Kohlenstoffquelle. Der *P. immobile* Stamm E wurde mit Phenazon als Kohlenstoffquelle heranzgezogen. Eine 2 mL Zellsuspension mit 0,5 mg/mL lyophilisierten Zellen in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,0) und 2 mM NADH wurde unter Rühren bei 30 °C inkubiert bis die Sauerstoffkonzentration in der Suspension konstant war. Messung des Abfalls der Sauerstoffkonzentration nach Substratzugabe über 10 min. Substrate: (I) Phenazon; (II) Pyrazon, (III) Phenylessigsäure. Alle gezeigten Messungen im technischen Triplikat.

geringer als für Phenazon und Pyrazon.

Tabelle 3-3 Sauerstoffmessungen Stamm E nach Wachstum mit der Kohlenstoffquelle Phenazon**.**

Substrat	kinetische Parameter	
	K_m [µM]	v_{max} [mU/mg]
Phenazon	13,0	6,3
Pyrazon	12,5	4,8
Phenylessigsäure	36,6	1,7

3.2.3 Anzucht mit *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle

Nach der Anzucht von *P. immobile* Stamm E mit Phenazon als Kohlenstoffquelle konnte die Zugabe von *L*-Phenylalanin keinen Sauerstoffabfall induzieren (vgl. 3.2.2). Dies änderte sich nach dem Wachstum mit *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle.

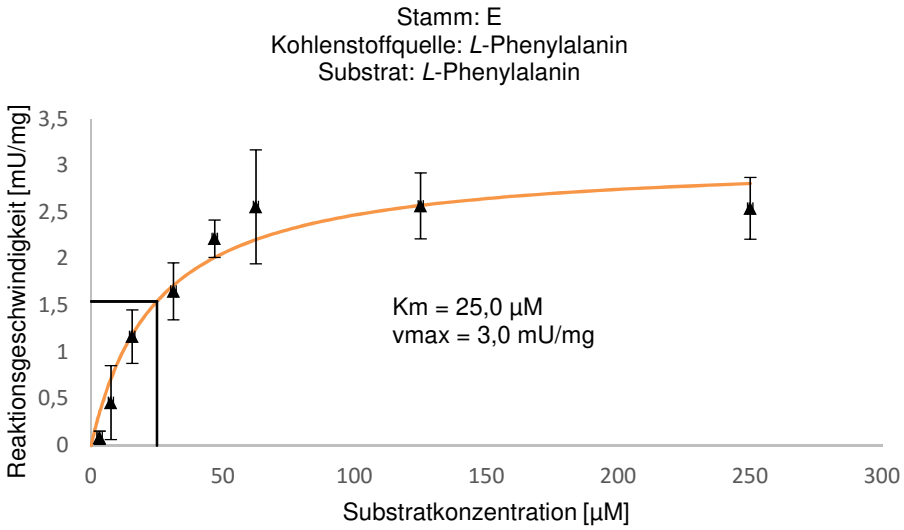

Abbildung 3-6: Sauerstoffmessungen Stamm E nach Adaption an *L*-Phenylalanin. Der *P. immobile* Stamm E wurde mit *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle heranzgezogen. Eine 2 mL Zellsuspension mit 0,5 mg/mL lyophilisierten Zellen in 50 mM KPi-Puffer (pH 7,0) und 2 mM NADH wurde unter Rühren bei 30 °C inkubiert bis die Sauerstoffkonzentration in der Suspension konstant war. Messung des Abfalls der Sauerstoffkonzentration nach Substratzugabe über 10 min.

Ausgestrichen auf Agarplatten mit *L*-Phenylalanin (MMB-Medium + 0,1 % (w/v) *L*-Phenylalanin, vgl. Abschnitt 2.1.4.1) benötigt der Stamm E eine lag-Phase von 3 Wochen, um sich an das Substrat zu adaptieren. Nach dieser lag-Phase zeigt der Stamm E auch in Flüssigmedium mit *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle Wachstum. Um die Sauerstoffmessungen nach der Anzucht mit *L*-Phenylalanin statt Phenazon als Kohlenstoffquelle zu wiederholen, wurde der Stamm E erneut wie im vorherigen Abschnitt beschrieben nur mit veränderter Kohlenstoffquelle angezogen (vgl. 2.2.1). Der Stamm E besitzt mit *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle eine Generationszeit

von 8,5 h (Generationszeit mit Phenazon: 7 h). Anschließend wurden die Zellen lyophilisiert (2.2.3). Die Messung der Sauerstoffkonzentration erfolgte wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben. Das Ergebnis der Sauerstoffmessung mit *L*-Phenylalanin als Substrat ist in Abbildung 3-6 gezeigt. Die Sauerstoffmessungen wurde mit den Substraten Phenazon und Pyrazon nach Wachstum der Zellen mit *L*-Phenylalanin wiederholt. Ein Vergleich der kinetischen Parameter ist in Tabelle 3-4 gezeigt.

Tabelle 3-4: Vergleich der kinetischen Parameter nach Wachstum mit Phenazon und *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle.

Substrat	**Wachstum mit Phenazon**		**Wachstum mit *L*-Phenylanin**	
	K_m [µM]	v_{max} [mU/mg]	K_m [µM]	v_{max} [mU/mg]
L-Phenylalanin	/	/	25,0	3,0
Phenazon	13,0	6,3	39,8	2,5
Pyrazon	12,5	4,8	17,0	2,9

Ein Wechsel der Kohlenstoffquelle von Phenazon zu *L*-Phenylalanin führt für die beiden Substrate Phenazon und Pyrazon zu einer Steigung des K_m-Wertes und Erniedrigung des v_{max}-Wertes. Beispielhaft ist diese Verschiebung in der Michaelis-Menten-Auftragung für das Substrat Pyrazon nach Wachstum mit Phenazon und Wachstum mit *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle gezeigt.

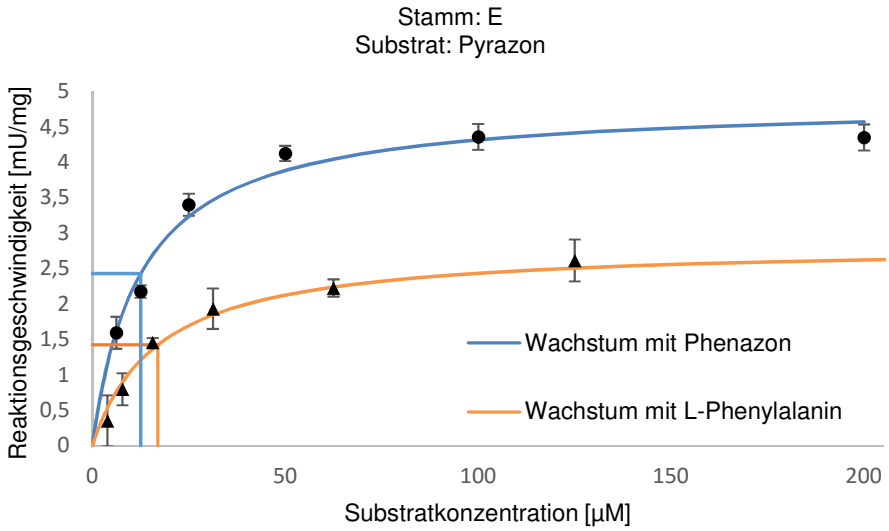

Abbildung 3-7: Vergleich der kinetischen Paramter nach Anzucht mit zwei verschiedenen Kohlenstoffquellen. Sauerstoffmessung wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben. Blau: Phenazon als Kohlenstoffquelle. Orange: *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle.

Um diese Veränderung näher verstehen zu können, wurde das Proteom des Stammes E nach Wachstum auf Phenazon, Pyrazon und *L*-Phenylalanin analysiert.

3.3 Proteomanalysen

Im Genom von *P. immobile* E sind 17 potentiell funktionsfähige α-Untereinheiten von ROs kodiert (vgl. 3.1). Die folgenden Proteomanalysen konnten zeigen, dass Anzahl und Verhältnis der exprimierten ROs abhängig von der verstoffwechselten Kohlenstoffquelle und den Wachstumsbedingungen sind. Die α-Untereinheit ist Teil einer Oxygenasekomponente mit $\alpha_3\beta_3$-Oligomerstruktur, welche nach Zellaufschluss im Lysat zu finden ist (3.3.1).

3.3.1 Oligomerstruktur

Allgemein liegen die α-Untereinheiten der terminalen Oxygenasekomponente von bakteriellen ROs in Zellen als Trimere (α_3) vor. Einige Oxygenasen bilden Heterooligomere. In diesen wird der Trimer durch β-Untereinheiten stabilisiert ($\alpha_3\beta_3$).[14] Für die Phatalat-Dioxygenase aus *Burkholderia cepacia* wird ein Hexamer (α_6) als Oligomerstruktur angenommen.[15] Es sind also drei Oligomerstrukturen (α_3, α_6, $\alpha_3\beta_3$) für ROs bekannt. In welcher Oligomerstruktur die α-Untereinheiten, welche im Genom von *P. immobile* kodiert sind, in den Zellen vorliegen war nicht bekannt. Das durchschnittliche Molekulargewicht einer α-Untereinheit aus *P. immobile* E beträgt 51 kDa (die Ausnahmen sind 43 kDa und 41 kDa für DO6 und DO11). Die rechnerisch erwarteten Molekulargrößen für wahrscheinliche Homooligomere (α_3, α_6) betragen also 153 und 306 kDa. Im Genom ist eine potentielle β-Untereinheiten kodiert, welche ein Molekulargewicht von 21,5 kDa besitzt. Das

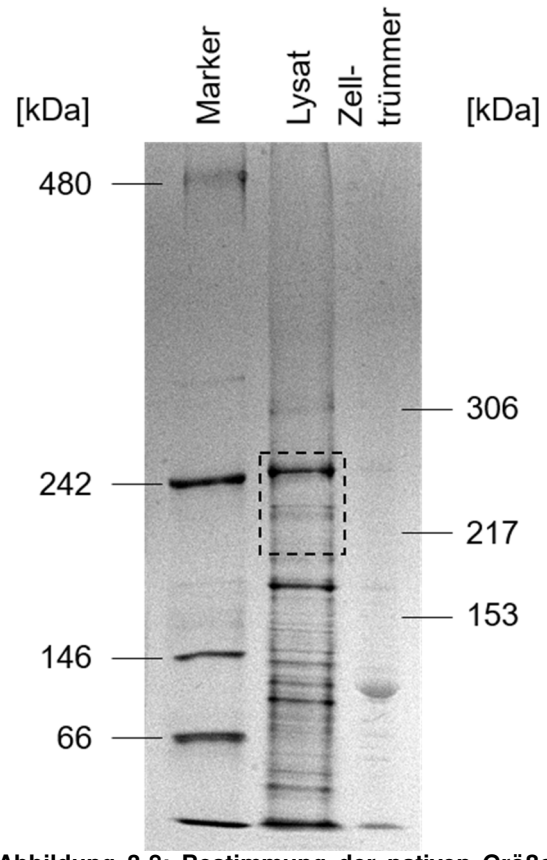

Abbildung 3-8: Bestimmung der nativen Größe. Eine *P. immobile* E-Kultur wurde wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben angezogen und aufgeschlossen. Lysat und Zelltrümmer wurden durch eine Native-PAGE aufgetrennt (2.4.3). Der Kasten zeigt den Bereich, in dem Peptide der Oxygenasekomponente in der Proteomanalyse 2.4.4 gefunden wurden.

rechnerische Molekulargewicht für ein $\alpha_3\beta_3$-Heteromer beträgt 217,5 kDa (oder mindestens 187,5 kDa für die α-Untereinheit DO6).

Für die in den zwei folgenden Abschnitten betrachteten Proteomanalysen sind die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen worden (vgl. 2.4.4). Danach wurden Zelllysat und Zelltrümmern getrennt voneinander auf eine Native-PAGE (2.4.3) aufgetragen. Eine Native-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe im elektrischen Feld ohne Denaturierung der Oligomerstruktur. In der Proteomanalyse wurden die Peptide der α-Untereinheiten in einem Größenbereich um 217 kDa gefunden. Die Peptide fanden sich im Zelllysat und nicht in den Zelltrümmern. Es fanden sich in diesem Größenbereich auch die Peptide der β-Untereinheit. Daraus wird geschlossen: 1.) Die Oxygenasekomponente der ROs in *P. immobile* E ist ein $\alpha_3\beta_3$-Oligomer, und 2.) Die Oxygenasekomponente liegt in den Zellen gelöst vor.

3.3.2 Kohlenstoffquellen

Im Genom von *P. immobile* E sind 19 verschiedene α-Untereinheiten von ROs kodiert. Es ist bekannt, dass *P. immobile* E Phenazon, Pyrazon[11] und *L*-Phenylalanin[92] als alleinige Kohlenstoffquelle nutzen kann. Im ersten Schritt des Abbauweges wird hierbei der Phenylring der Substrate von einer RO dihydroxyliert (vgl. Abbildung 1-7). Um herauszufinden, welche der 19 ROs nach Wachstum auf den drei Kohlenstoffquellen exprimiert werden, wurde das Proteom des Stammes untersucht. Die Proteomanalyse und die Anzucht der Zellen wurde wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben durchgeführt. Alle Messungen wurden im biologischen Triplikat durchgeführt.

In Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10 ist angegeben, welche α-Untereinheiten im Proteom abhängig von der Kohlenstoffquelle gefunden wurden. Das Expressionslevel wurde über die prozentuale Peptidverteilung quantifiziert. Diese gibt an, welcher Prozentsatz von der Gesamtheit aller Peptide, die in der Probe α-Untereinheiten zugeordnet werden konnten, auf eine α-Untereinheit entfällt. Der Abbildung 3-9 ist außerdem zu entnehmen, wo im Genom (bzw. auf dem Plasmid) die α-Untereinheit kodiert ist. Die prozentuale Peptidverteilung und die Anzahl der exprimierten α-Untereinheiten ist nach dem Wachstum auf Phenazon und Pyrazon

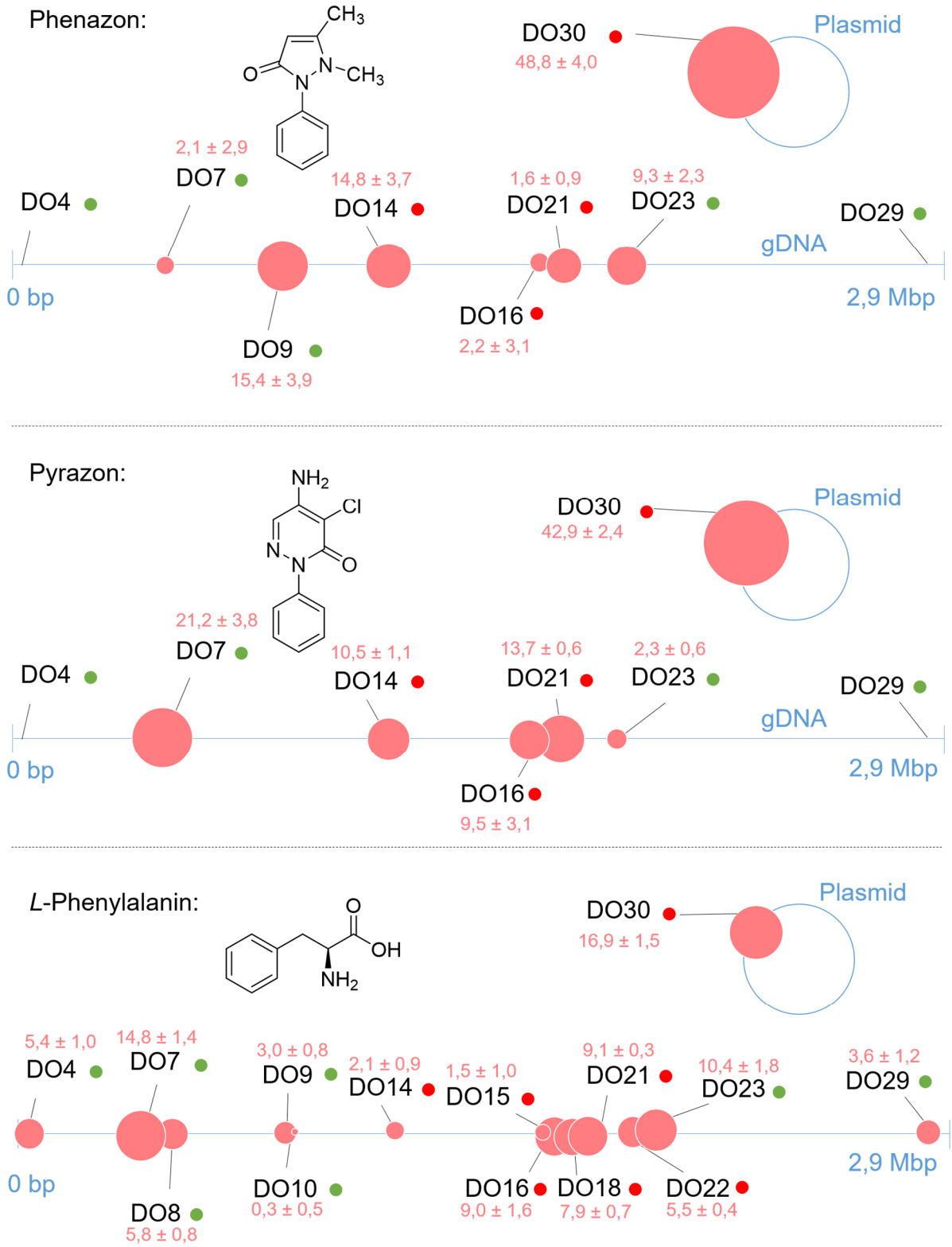

Abbildung 3-9: Prozentuale Peptidverteilung in Abhängigkeit zur Kohlenstoffquelle. *P. immobile* E-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben angezogen und aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch eine Native-PAGE (2.4.3) aufgetrennt und der in Abbildung 3-8 markierte Bereich durch eine Proteomanalyse (2.4.4) untersucht. Diese Abbildung zeigt die Genloci der detektierten α-Untereinheiten (DO4-DO30) auf der genomischen DNA (gDNA) oder dem Plasmid des Stammes (beide blau). Der prozentuale Peptidanteil einer α-Untereinheiten an der Gesamtheit aller detektierten Peptide ist in rot dargestellt. Der rote oder grüne Punkt neben der Nummer der α-Untereinheiten gibt die Zugehörigkeit zu Sequenzgruppe 1 oder 2 an (vgl. Abbildung 3-2).

sehr ähnlich. In der Proteomanalyse wurden sieben und sechs α-Untereinheiten nach dem Wachstum auf Phenazon respektive Pyrazon detektiert. Bei beiden Kohlenstoffquellen entfällt etwa die Hälfte (48,7 ± 4,0 % und 42,9 ± 2,4 %) aller exprimierter α-Untereinheiten auf die DO30, die auf dem Plasmid von *P. immobile* E kodiert liegt. Die α-Untereinheiten DO14, DO16, DO21 und DO23 sind bei beiden Kohlenstoffquellen vergleichbar schwach exprimiert. Die α-Untereinheit DO9 (15,5 ± 3,9 %) ist nur bei Wachstum mit der Kohlenstoffquelle Phenazon und nicht mit Pyrazon exprimiert. Bei der α-Untereinheit DO7 gibt es einen Wechsel in der Expressionsstärke. Diese ist bei Wachstum mit Pyrazon (21,2 ± 3,8 %) relativ stark exprimiert und nur sehr gering bei Wachstum mit Phenazon (2,1 ± 2,9 %).

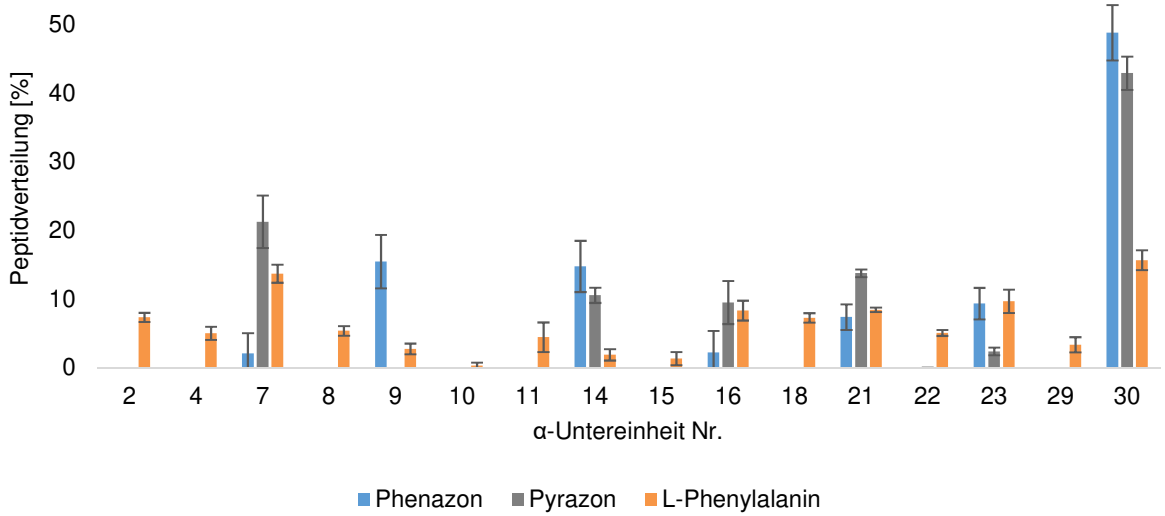

Abbildung 3-10: Prozentuale Peptidverteilung in Abhängigkeit zur Kohlenstoffquelle. *P. immobile* E-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben angezogen und aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch eine Native-PAGE (2.4.3) aufgetrennt und der in Abbildung 3-8 markierte Bereich durch eine Proteomanalyse (2.4.4) untersucht. Diese Abbildung zeigt die Peptidverteilung der α-Untereinheiten nach Wachstum auf Phenazon (blau), Pyrazon (grau) und *L*-Phenylalanin (orange).

Die Peptidverteilung ist bei der Kohlenstoffquelle *L*-Phenylalanin deutlich breiter. Nur 15,6 ± 1,5 % entfallen auf die α-Untereinheit DO30. Insgesamt wurden 16 der insgesamt 19 kodierten α-Untereinheiten wiedergefunden. Es fehlen die α-Untereinheiten DO31 (eine inaktive Deletionsvariante von DO30 ohne Rieske-Motiv), DO17 und DO6. DO2 findet sich zu 7,3 ± 0,7 % exprimiert, obwohl dieser α-Untereinheit das Rieske-Motiv fehlt und sie deshalb vermutlich inaktiv ist. Die α-Untereinheiten DO4, DO9, DO10, DO11, DO15 und DO29 sind mit 0,2 – 4,5 % nur schwach im Proteom vorhanden. Das Expressionslevel der restlichen α-Untereinheiten ist zwischen 5,0 – 13,4% verteilt.

3.3.3 Wachstumsbedingungen

Für die Proteomanalysen in 3.3.2 wurden die Zellen in einer 40 mL Kultur (MMB + 1 % (w/v) Phenazon) in einem 200 mL Kolben (30 °C, 180 rpm) herangezogen. Die Zellen, welche für die Sauerstoffmessung verwendet wurden, wurden durch eine Fermentation im 30 L-Maßstab (ebenfalls: MMB + 1 % (w/v) Phenazon) erhalten. Nach beiden Anzuchten wurde das Proteom untersucht. Das Ergebnis der Proteomanalysen bei gleicher Kohlenstoffquelle (Phenazon) und unterschiedlichen Anzuchtsbedingungen ist in Abbildung 3-11 dargestellt.

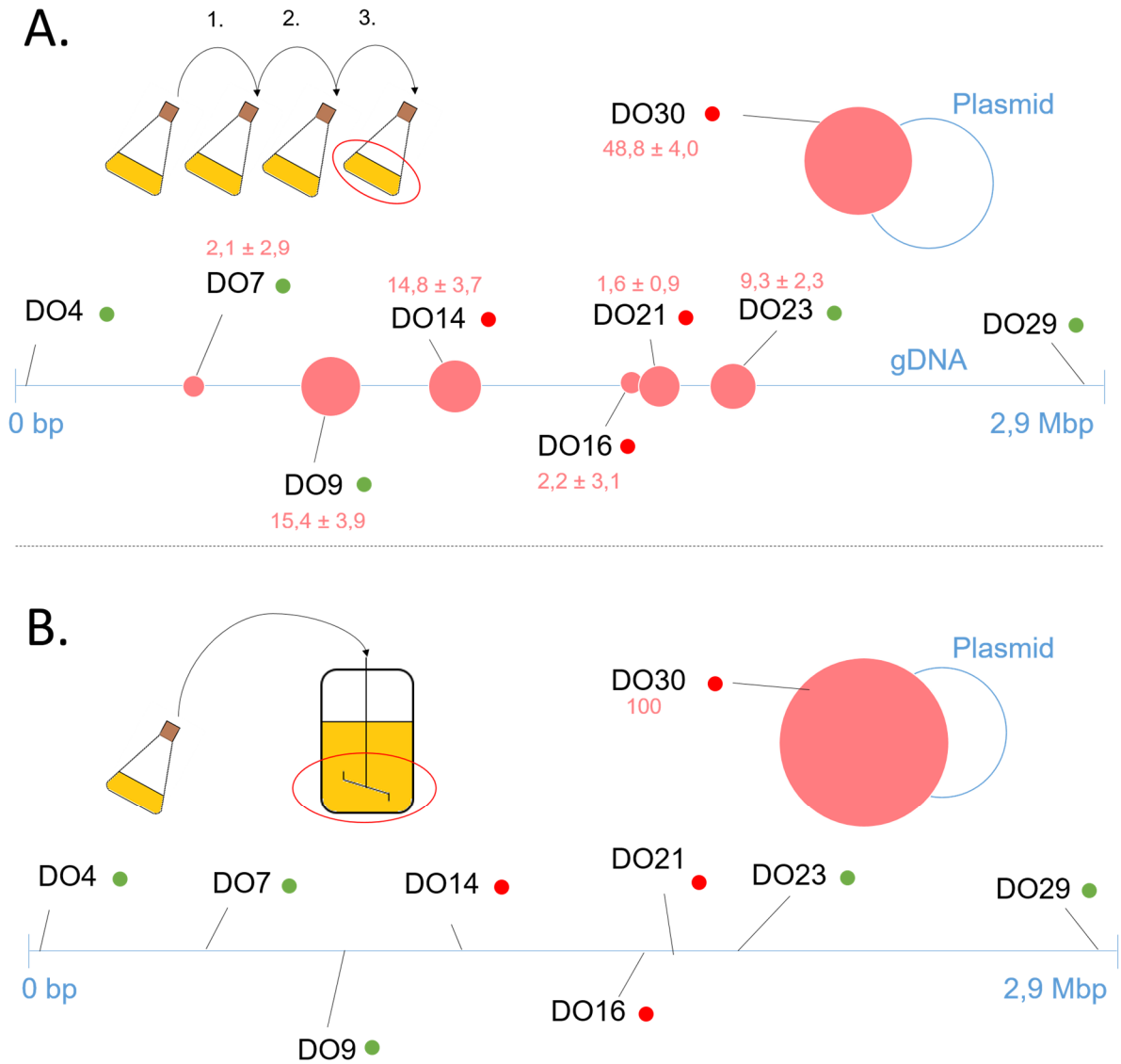

Abbildung 3-11: Prozentuale Peptidverteilung in Abhängigkeit zur Wachstumsbedingung bei gleicher Kohlenstoffquelle. *P. immobile* E-Zellen wurden wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch eine Native-PAGE (2.4.3) aufgetrennt und der in Abbildung 3-8 markierte Bereich durch eine Proteomanalyse (2.4.4) untersucht. A: Anzucht wie in 2.4.4 beschrieben (Schüttelkolben). B: Anzucht wie in 2.2.1 beschrieben (Fermenter). Diese Abbildung zeigt die Genloci der detektierten α-Untereinheiten (DO4-DO30) auf der genomischen DNA oder dem Plasmid des Stammes (beide blau). Der prozentuale Peptidanteil einer α-Untereinheiten an der Gesamtheit aller detektierten Peptide ist in rot dargestellt. Der rote oder grüne Punkt neben der Nummer der α-Untereinheiten gibt die Zugehörigkeit zu Sequenzgruppe 1 oder 2 an (vgl. Abbildung 3-2).

Die in Abschnitt 3.3.2 beschriebene Peptidverteilung verschiebt sich nach der Anzucht im Fermenter vollständig hin zu der auf dem Plasmid kodierten DO30.

3.4 Redoxpartner

Im Genom des Stammes E wurden zwei Ferredoxin-Reduktasen (Ferredoxin-Reduktase 1 und Ferredoxin-Reduktase 2) und zwei Ferredoxine annotiert (Ferredoxin 3 und Ferredoxin 4).[12] Aus der Literatur war bekannt, dass es sich bei der/den RO(s) aus *P. immobile* um ein dreikomponentiges System bestehend aus Ferredoxin, Ferredoxin-Reduktase und Oxygenase handelt.[94] Um für die Rekonstitution der Aktivität in *E. coli* geeignete Redoxpartner zu finden, wurden in diesem Abschnitt Elektronentransportproteine aus dem Genom von Stamm E kloniert, in *E. coli* exprimiert und mit den aus *P. immobile*-Zellen aufgereinigten Oxygenasekomponenten auf Aktivität getestet.

3.4.1 Klonierung und Expression der Redoxpartner in *E. coli*

Die Gene des Ferredoxins 2 (*Fxd2*), Ferredoxins 3 (*Fxd3*), der Ferredoxin-Reduktase 1 (*FerRed1*) und Ferredoxin-Reduktase 2 (*FerRed2*) wurden aus dem Genom mit den in Abschnitt 2.1.8 genannten Oligonukleotiden amplifiziert (2.3.1). Die Sequenzen der Gene sind im Anhang 6.1 gelistet. Als Expressionsvektor wurde der Vektor pQE-31 (2.1.7) gewählt. Das Plasmidrückgrat von pQE31 wurde ebenfalls mit einer PCR (2.3.1) unter Verwendung der in Abschnitt 2.1.8 genannten Oligonukleotiden amplifiziert. Die zur PCR verwendeten Primer wurden so gewählt, dass die erhaltenen linearen DNA-Fragmente homologe Enden besaßen, welche eine Klonierung der Fragmente durch einen Zusammenbau nach Gibson (2.3.3) ermöglichten. Eine nachfolgende Sequenzierung (2.3.6) bestätigte die erfolgreiche Klonierung der Vektoren pQE-31_Fxd3, pQE-31_Fxd4, pQE-31_FerRed1 und pQE-31_FerRed2 (vgl. Abschnitt 2.1.7).

Die Redoxkomponenten wurden im Stamm *Escherichia coli* M15 (pREP4) exprimiert (2.2.4.1) und anschließend aufgereinigt (2.4.5). Die Qualität der Aufreinigung wurde mittels einer SDS-PAGE (2.4.3) überprüft. Die Gele sind in Abbildung 3-12 dargestellt.

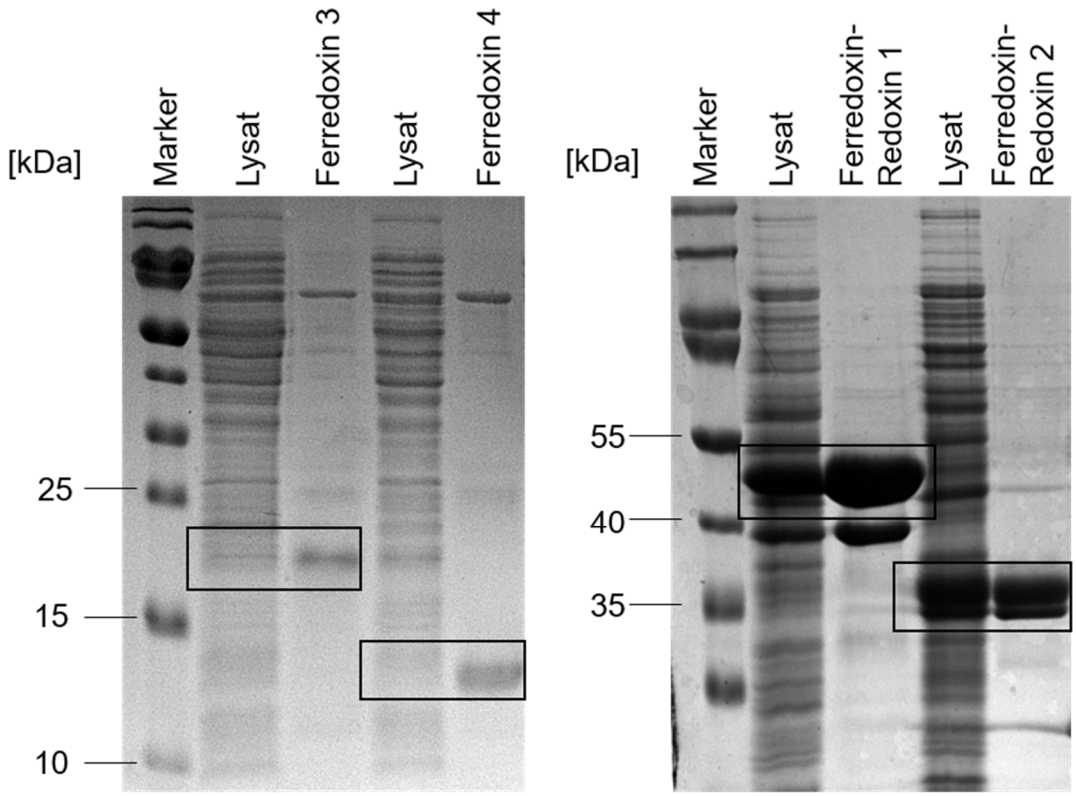

Abbildung 3-12: Überprüfung der Redoxpartneraufreinigung. Das Lysat der aufgeschlossenen Zellen nach der Expression (2.2.4.1), sowie die aufgereinigten Redoxpartner (2.4.5) wurden mit einer 12%-igen SDS-PAGE (2.4.2) analysiert. Die Redoxkomponenten sind in Lysat und nach Aufreinigung durch ein schwarzes Quadrat auf den Gelen gekennzeichnet.

3.4.2 *In vitro* Biotransformationen

Die in Abschnitt 3.4.1 in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten Redoxpartner wurden mit der aus dem *P. immobile* Stamm E aufgereinigten Oxygenasekomponente auf Aktivität gestestet. Die *in vitro* Biotransformationen wurden im Rahmen der betreuten Masterarbeit von Elsa Potoudis durchgeführt.[108] Der Stamm E wurde mit Phenazon als Kohlenstoffquelle fermentiert, um genug Zellmasse als Ausgangsmaterial zu haben (2.2.1). Die Proteomanalyse zeigte, dass nach der Fermentation mit Phenazon als Kohlenstoffquelle nur noch die α-Untereinheit DO30 im Proteom zu finden war (s. Abbildung 3-9 (B)). Die Zellen wurden mit Triton X-100 behandelt (2.4.6) und die solubilisierte Oxygenase durch Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt (2.4.7).

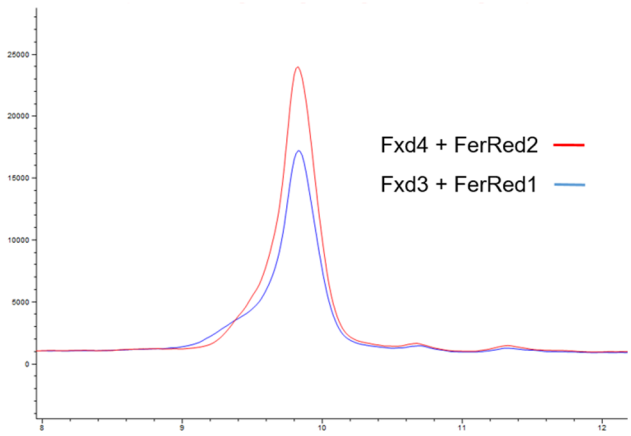

Abbildung 3-13: LC-MS Analyse der *in vitro* Biotransformationen mit Phenazon. MS Chromatogramme im SIM-Modus (*m/z*: 223) und mit positiver Ionisierung aufgenommen (vgl. 2.6.1.1). Durchführung der *in vitro* Biotransformation wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben. Rot: Produktbildung mit Ferredoxin 4 (Fxd4) und Ferredoxin-Reduktase 2 (FerRed2). Blau: Produktbildung mit Ferredoxin 3 (Fxd3) und Ferredoxin-Reduktase 1 (FerRed1).

Die *in vitro* Biotransformationen wurden wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben durchgeführt. Als Substrat wurde Phenazon verwendet, da es als Kohlenstoffquelle bei der Anzucht diente. Alle Redoxpartnerkombinationen zeigten Produktbildung mit der Oxygenase. Die meiste Produktbildung wurde mit der Zugabe von Ferredoxin 4 und Ferredoxin-Reduktase 2 (vgl. Abbildung 3-13) erreicht, weshalb diese zusammen mit den Oxygenasenkomponenten in Abschnitt 3.5 kloniert und exprimiert wurden.

3.5 Rekonstitution der Aktivität

Ziel war es die Aktivität der ROs aus dem *P. immobile* Stamm E in *E. coli* zu rekonstituieren.

Die in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Sauerstoffmessungen ermöglichten einen ersten Einblick in das Substratspektrum der ROs. Im vorangegangenen Abschnitt 3.4 wurden mit den Redoxpartner Ferredoxin 4 und Ferredoxin-Reduktase 2 aus dem Genom des Stammes E geeignete Elektronentransportproteine für die Rekonstitution der Aktivität gefunden. Die Oligomerstruktur der Oxygenasekomponente wurde in Abschnitt 3.3.1 als $\alpha_3\beta_3$ bestimmt. Im Genom ist eine β-Untereinheit kodiert und 19 α-Untereinheiten, von denen 16 in den Proteomanalysen wiedergefunden wurden (3.3.2).

Im folgenden Abschnitt 3.5.1 wurde eine Plasmidbibliothek mit den α-Untereinheiten, der β-Untereinheit und den gewählten Elektronentranportproteinen erstellt. Diese wurde heterolog in *E. coli* exprimiert und in Abschnitt 3.5.2 in Biotransformationen auf Produktformation mit den in Sauerstoffmessungen bestimmten Substraten getestet.

Die Klonierungen und Expressionen, sowie der nachfolgenden Biotranformationen, der α-Untereinheiten (DO6, DO7, DO9, DO10, DO11, DO15, DO16, DO17, DO21 und DO30) wurden im Rahmen der betreuten Masterarbeit von Elsa Potoudis durchgeführt.[108] Die Klonierungen und Expressionen, sowie der nachfolgenden Biotranformationen, der α-Untereinheiten (DO4, DO8, DO14, DO18, DO22, DO23 und DO29) wurden im Rahmen des Forschungspraktikums von Daniela Resende durchgeführt.

3.5.1 Klonierung und Expression

Zur Expression wurde das Vektor-System pBAD18/33 verwendet, welches bereits zur erfolgreichen *in vivo* Biotransformation mit einem Mehrkomponentensystem am Institut verwendet wurde.[109] Der Vektor pBAD18 diente der Co-Expression von Ferredoxin und Reduktase. Der Vektor pBAD33 diente der Co-Expression von α- und β-Untereinheit der Oxygenasekomponente.

Die Gene der Redoxpartner Ferredoxin 4 und Ferredoxin-Reduktase 2 wurden von den in dieser Arbeit konstruierten Vektoren pQE-31_Fxd4 und pQE-31_FerRed2 amplifiziert (2.3.1). Als Grundgerüst diente der Vektor pITB1776, welcher zwei arabinoseinduzierbare pBAD-Promotoren trägt. Die DNA-Fragmente wurden durch einen Zusammenbau nach Gibson zum Vektor pBAD_Fxd4_FerRed2 (pITB5506) kloniert (2.3.3).

Die α-Untereinheit DO16 und die β-Untereinheit DO3 wurden zusammen von dem Plasmid pITB1095 amplifiziert.[107] Als Rückgrat diente der Leervektor pBAD33. Durch einen Zusammenbau nach Gibson wurde der Vektor pBAD33_DO16 kloniert. Da die β-Untereinheit auf allen in dieser Arbeit konstruierten pBAD33-Vektoren vorhanden ist, wurde für die restlichen pBAD33-Vektoren nur die α-Untereinheit im Vektor pBAD33_DO16 ausgetauscht. Die α-Untereinheiten wurden aus dem Genom von *P. immobile* E amplifiziert (2.3.1). Die Gene der Deletionsvarianten DO2 und DO31 wurden nicht kloniert, da diese als katalytisch inaktiv vermutet wurden.

Alle verwendeten und konstruierten Plasmide, sowie alle verwendeten Primer, sind in den Abschnitten 2.1.7 und 2.1.8 aufgelistet.

3.5.2 *In vivo* Biotransformationen

Kompetente *E. coli* JW5510-Zellen wurden zuerst mit dem Plasmid pITB5506, auf welchem die Redoxpartner kloniert sind, und danach mit einem der Plasmide pITB5507-55023, welche die Gene für die α- und β-Untereinheiten tragen, transformiert (2.3.5). Die RO-Komponenten wurden in *E. coli* JW5510 exprimiert wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Keine der exprimierten Komponenten (außer der β-Untereinheit) konnte auf einer SDS-PAGE (2.4.2) identifiziert werden (vgl. Anhang 6.3). Diese Beobachtung wurde bereits für andere ROs gemacht[110,111], weshalb die Biotransformationen (vgl. 2.5.2) dennoch mit den Zellen durchgeführt wurden. Als Substrate wurden Phenazon[102], Pyrazon[11], *L*-Phenylanin[92] und Phenylessigsäure[92] gewählt (vgl. Sauerstoffmessungen 3.2.2). Zusätzlich wurden die Substrate 3-Phenylpropionsäure und Zimtsäure getestet, da bei der Suche nach homologen Sequenzen zu den α-Untereinheiten in *P. immobile* E in der UniProt-Datenbank (2.7.1) vermehrt 3-Phenylpropionsäure-/Zimtsäure-Dioxygenasen gefunden wurden (EC 1.14.12.19). Die verwendeten flüssig- und gaschromatographischen Methoden sind in Abschnitt 2.6 gelistet. Die Reaktionsbedingungen der Biotransformation sind in Abschnitt 2.5.2 angegeben.

Mit den gewählten Expressions-, Reaktionsbedingungen und analytischen Methoden wurde mit den 17 exprimierten ROs und sechs getesteten Substraten nur in einem Fall Produktbildung detektiert. Die RO mit der α-Untereinheit DO16 konnte Pyrazon dihydroxylieren. Das in der LC-MS Analyse der Biotransformation erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 3-14 gezeigt. Da für das Dihydrodiol kein Produktstandard kommerziell erhältlich ist, wurde das Fragmentierungsmuster des Metaboliten durch eine Biotransformation von Pyrazon mit dem Bakterium *P. immobile* Stamm E erhalten (vgl. Abbildung 3-4). Die *P. immobile*-Zellen wurden dafür mit dem Substrat inkubiert. Wenn der Metabolit die gewünschte Akkumulation erreicht hatte, wurde die Biotransformation durch eine Zentrifugation beendet (vgl. 2.5.3). Die Analyse der Umsetzung wurde als Positivkontrolle verwendet (Abbildung 3-14).

Um zu bestätigen, dass die Oxygenasekomponente ein Heteromer bildet (vgl. 3.3.1), wurde die α-Untereinheit DO16 (pITB5524) und die β-Untereinheit (pITB5525) getrennt exprimiert. Es konnte bei den Biotransformationen mit Pyrazon keine

Produktbildung detektiert werden. Erst die gemeinsame Expression von α-Untereinheit DO16 und β-Untereinheit (pITB5516) führte zur Produktbildung.

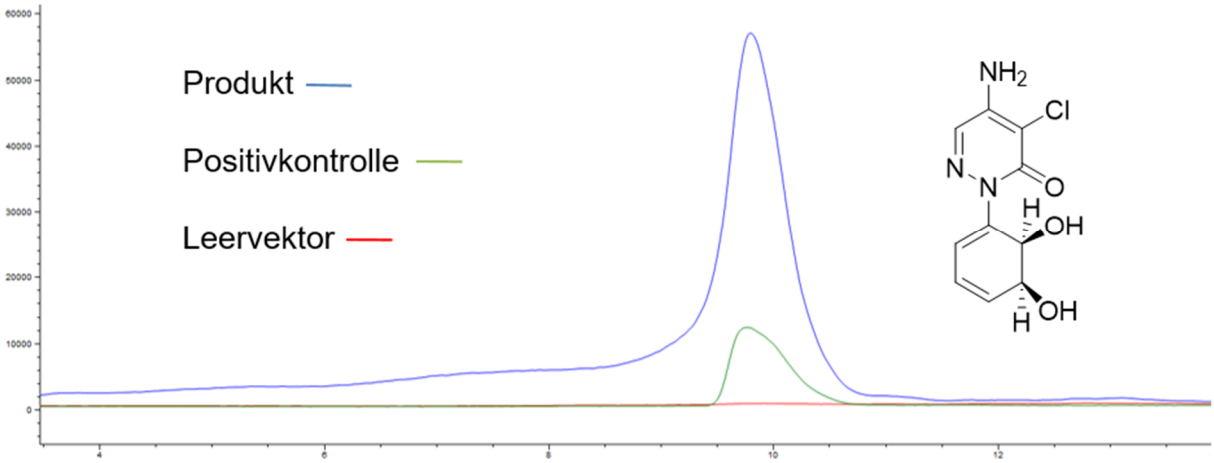

Abbildung 3-14: LC-MS Analyse der Pyrazon Biotransformation (vgl. 2.6.1.1). MS Chromatogramme im SIM - Modus (*m/z*: 254) und mit negativer Ionisierung aufgenommen. Die zur Biotransformation verwendeten *E. coli* JW5510(pITB5506)-Zellen wurden mit dem Plasmid pBAD33_DO16 transformiert. Durchführung der Biotransformation wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben. Blau: Produktbildung nach Biotransformation. Rot: Zellen mit Leervektor transformiert. Grün: Posivitivkontrolle (vgl.2.5.3).

Die Produktbildung konnte aus Mangel eines isolierten Standards nicht quantifiziert werden. Die Substratabnahme war aufgrund der geringen Produktbildung nicht messbar. Um die Produktbildung zu steigern, sollten im Folgenden die Expressions- und Reaktionsbedingungen optimiert werden.

3.5.3 Optimierung der Expressions- und Reaktionsbedingungen

Die Ausgangsbedingungen der Co-Expression der RO-Komponenten in *E. coli* JW5510 sind in Abschnitt 2.2.4 geschildert. Die Expression wurde bei einer OD von 1,2 mit 0,1 % (w/v) Arabinose induziert. Die Expressionstemperatur betrug 25 °C. Für die Optimierung wurde der Induktionszeitpunkt zwischen einer OD von 0,7 und 1,2 variiert. Es wurden drei Expressionstemperaturen getestet: 15 °C, 20°C und 25 °C. Die Ausgangsbedingungen für die Biotransformation sind in Abschnitt 2.5.2 angegeben. Die Biotransformation wurde in 20 mL Headspace Vials, welche liegend in Inkubationschüttlern für 24 h bei 30 °C inkubiert wurden, durchgeführt. Für die Optimierung wurden Biotransformationstemperaturen von 20 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C getestet. Die Wahl der Temperaturen richtete sich nach der Temperatur der verfügbaren Inkubationsschüttler. Das Ergebnis der Optimierung ist in Abbildung 3-15 dargestelt. Alle Umsetzungen wurden im biologischen Triplikat durchgeführt.

Die Auswirkung des Induktionszeitpunktes auf die Produktbildung war nur gering. Bei einer Expressionstemperatur von 20 °C wurde geringfügig mehr Produktbildung als bei einer Induktion zu einem späteren Zeitpunkt (OD 1,2) detektiert (etwa 0,4-fach mehr). Eine Expressionstemperatur von 15 °C brachte in keinem Fall eine Steigerung der Produktbildung. Die Produktbildung war bei einer Expressionstemperatur von 20 °C am höchsten. Je niedriger die Temperatur der Biotransformation war, desto höher war die detektierte Produktbildung.

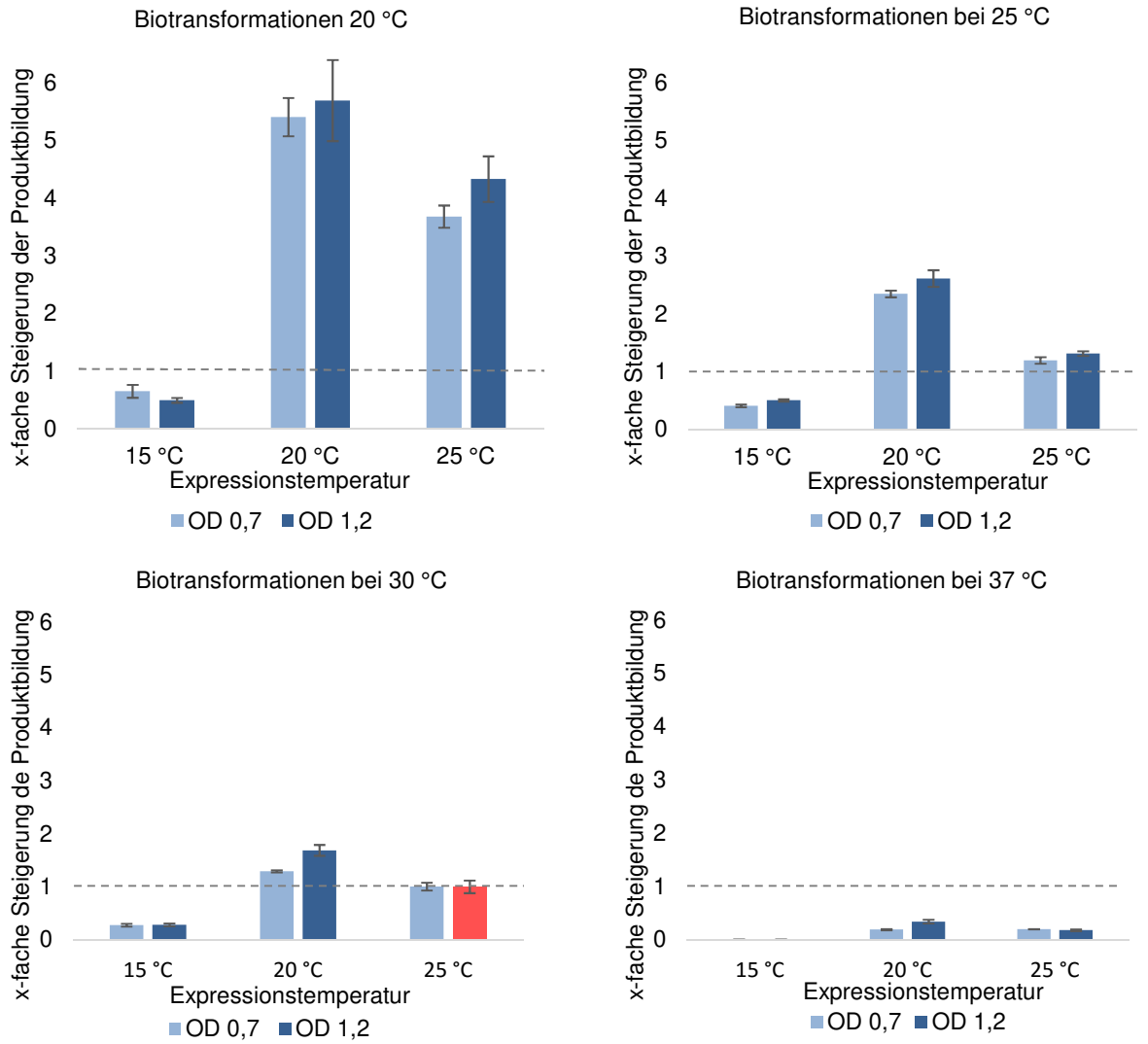

Abbildung 3-15: Steigerung der Produktbildung. Die Parameter Induktionszeitpunkt, Expressionstemperatur und Biotransformationstemperatur wurden variiert. Die Ausgangsbedingungen der Expression (Induktionszeitpunkt: OD 1,2; Expressionstemperatur: 25 °C) sind in Abschnitt 2.2.4 angegeben. Die Ausgangsbedingungen der Biotransformation (Temperatur: 30 °C) sind in Abschnitt 2.5.2 angegeben. Die Produktbildung bei Ausgangsbedingungen ist in rot gezeigt. Alle Umsetzungen im biologischen Triplikat.

Wird die Produktbildung bei einem Induktionszeitpunkt von OD 1,2 und einer Expressionstemperatur von 20 °C betrachtet, ist die Steigerung der Produktbildung verglichen mit den Ausgangsbedingungen bei einer Biotransformationstemperatur von

30 °C 1,5-fach. Wird die Biotransformationstemperatur auf 25 °C erniedrigt, ist die Steigerung der Produktbildung 2,6-fach. Bei einer Biotransformationstemperatur von 20 °C wird eine Steigerung der Produktbildung um das 5,6-fache erreicht.

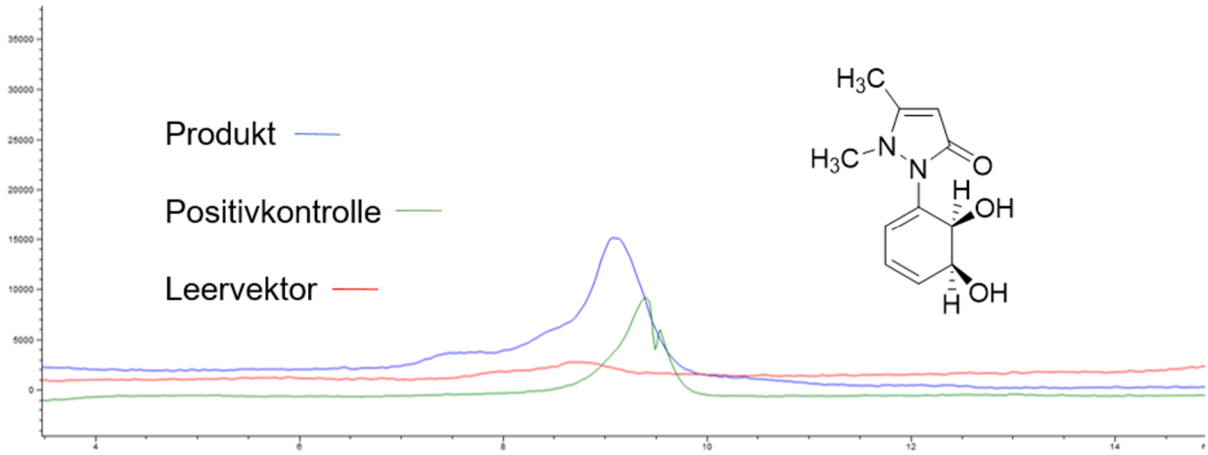

Abbildung 3-16: LC-MS Analyse der Phenazon Biotransformation (vgl. 2.6.1.1). MS Chromatogramme im SIM -Modus (*m/z*: 223) und mit positiver Ionisierung aufgenommen. Die zur Biotransformation verwendeten *E. coli* JW5510(pITB5506)-Zellen wurden mit dem Plasmid pBAD33_DO16 transformiert. Durchführung der Biotransformation wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben. Blau: Produktbildung nach Biotransformation. Rot: Zellen mit Leervektor transformiert. Grün: Posivitivkontrolle (vgl. 2.5.3).

Die Umsetzung der gewählten Substrate (Phenazon[102], Pyrazon[11], *L*-Phenylanin[92] , Phenylessigsäure[92], 3-Phenylpropionsäure[92] und Zimtsäure) mit allen klonierten 17 ROs wurde nochmals unter optimierten Bedingungen wiederholt (vgl. 3.5.2). Diesmal konnte mit den *E. coli*-JW5510-Zellen, welche mit dem Plasmid pBAD33_DO16 transformiert wurden, nicht nur für Pyrazon, sondern auch für Phenazon Produktbildung detektiert werden (vgl. Abbildung 3-16). Da für Dihydroxy-Phenazon kein Produktstandard kommerziell erhältlich ist, wurde die Retentionszeit und das Fragmentierungsmuster des Metaboliten durch eine Biotransformation von Phenazon mit dem Bakterium *P. immobile* Stamm E erhalten. Die *P. immobile*-Zellen wurden dafür mit dem Substrat inkubiert. Wenn der Metabolit die gewünschte Akkumulation erreicht hatte, wurde die Biotransformation durch eine Extraktion beendet (vgl. 2.5.3). Die Analyse der Umsetzung wurden als Positivkontrolle verwendet (Abbildung 3-16).

4 Diskussion

Um die Substratspezifität der α-Untereinheiten aus dem Genom von *P. immobile* Stamm E zu untersuchen, sollte ihre Aktivität in *E. coli* rekonstitutiert werden. Dabei wurden 17 α-Untereinheiten zusammen mit Elektronentransportproteinen und einer β-Untereinheit in *E. coli* JW5510 exprimiert und gegen ein Substratpanel aus sechs aromatischen Substraten getestet. Bei der α-Untereinheit DO16 konnte nach der Biotransformation mit Phenazon und Pyrazon Produktbildung detektiert werden. Das Substratspektrum der ROs des Bakteriums *P. immobile* wird in Abschnitt 4.1 diskutiert. Herausforderungen die Aktivität der ROs in *E. coli* zu rekonstituieren sind dadurch entstanden, dass die Komponenten der ROs nicht in einem Gen-Cluster im Genom des Bakteriums angeordnet waren, wie es sonst von bakteriellen ROs bekannt ist. In Abschnitt 4.2 wird der Versuch unternommen die neuen ROs aus *P. immobile* in bekannte Klassifizierungssysteme für ROs einzuordnen. Im Rahmen dieser Einordnung werden ihre Charakteristika wie das Fehlen eines Gen-Clusters, mögliche Elektronentransportproteine, und die Quartärstruktur diskutiert. Die Untersuchungen der ROs aus *P. immobile* Stamm E sollen dazu dienen ein besseres Verständnis der Substratspezifität von ROs zu gewinnen. Welche Erkenntnisse bereits aus bioinformatischen Untersuchungen und Proteomanalysen zu gewinnen sind, wird in Abschnitt 4.3 diskutiert.

4.1 Substratspektrum

Der Abbau von Herbiziden, Fungiziden, Agrochemikalien und ähnlichen Stoffen, welche in großen Mengen in die Umwelt eingetragen werden, durch Bakterien spielt eine wichtige Rolle in der Bioremediaton.[112,113] Dies macht Bakterien, welche am Abbau synthetischer organischer Stoffe beteiligt sind, zu einem wichtigen und interessanten Forschungsgegenstand im Allgemeinen.[114–116] Was das Bakterium *Phenylobacterium immobile* aber im Besonderen so faszinierend macht, ist die Tatsache, dass es Kohlenstoffquellen, welche von anderen an der Bioremediation beteiligten Bakterien ebenfalls verstoffwechselt werden, nicht als Energiequelle nutzen kann. Es zeigt kein Wachstum auf Zuckern (z.B.: Fructose, Galaktose, Arabinose, Saccarose usw.), auf Alkoholen (z.B.: Methanol, Ethanol, Ethanolamin usw.), auf

Fettsäuren (z.B. Tween 80), auf Carbonsäuren (Acetat, Propionat, Lactat) und Aminosäuren (außer: *L*-Phenylalanin und *L*-Glutaminsäure). Auch Aromaten, welche von anderen Bakterien durch oxidative Dissimilation abgebaut werden, wie Toluol[117], Biphenyl[118] und Benzol[119] werden nicht verstoffwechselt. *Phenylobacterium immobile* konnte mit Xenobiotika wie dem Herbizid Pyrazon (Chloridazon) und dem Arzneimittel Phenazon (Antipyrin) aus Bodenproben isoliert werden. Die Isolation der Stämme erfolgte dabei durch die Anreicherung des Bakteriums in Minimalmedium mit Pyrazon (oder Phenazon und Pyramidon) als einziger Kohlenstoffquelle. Es konnte in Bodenproben aus allen Weltteilen isoliert werden, obwohl diese Böden nie vorher mit den Substanzen in Kontakt kamen und die Stämme somit keine vorherige Möglichkeit der Adaption besaßen.[11] Dies stellt die Frage nach der natürlichen Kohlenstoffquelle des obligat aeroben Bakteriums im Boden. Da der Abbau der Xenobiotika die initiale Oxidation durch eine Rieske Nicht-Hämeisen Oxygenasen vorraussetzt, ist die Frage der natürlichen Kohlenstoffquelle des Bakteriums gleich der Frage nach dem oder den natürlichen Substrat(en) seiner ROs.

Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm E wurde mit Pyrazon als Kohlenstoffquelle in einer Bodenproben aus **E**cuador isoliert. Der Stamm zeigt in Flüssigmedium das schnellste Wachstum mit den Kohlenstoffquellen Phenazon und Pyrazon (Generationszeiten: 7 h mit Phenazon; 7,5 h mit Pyrazon) (vgl. 3.2.1). Nach einer lag-Phase von etwa 3 Wochen kann der Stamm ebenfalls *L*-Phenylalanin als Kohlenstoffquelle nutzen (Generationszeit: 8,5 h). Er besitzt ein deutlich schwächeres Wachstum auf Phenylcarbonsäuren wie Phenylessigsäure und 3-Phenylpropionsäure. Während dieser Arbeit ist es nicht gelungen das Bakterium in Flüssigmedium mit diesen beiden Kohlenstoffquellen anzuziehen, da es durch das sehr langsame Wachstum immer wieder zu Kontaminationen kam. Die Sauerstoffmessungen, welche in Abschnitt 3.2.2 gezeigt sind, zeigen bei der Umsetzung von Phenazon für O_2 einen K_m-Wert von 13,0 µM und v_{max}-Wert von 6,3 mU/mg. Bei der Umsetzung von Phenylessigsäure sind Affinität und Reaktiongsgeschwindigkeit um ein Drittel gesenkt (K_m: 36,6 µM, v_{max}: 1,7 mU/mg). Phenylcarbonsäuren sind für den Stamm also eine deutlich schlechtere Kohlenstoffquelle respektive Substrat als die Xenobiotika Phenazon und Pyrazon. Dennoch sind Bakterien, welche Phenylessigsäure und 3-Phenylpropionsäure durch oxidative Dissimilation als Kohlenstoffquelle nutzen können, im Gegensatz zu anderen Pyrazon-abbauenden Bakterienspezien bekannt.

Sie zu betrachten kann Aufschluss geben über die „natürliche(n)“ Kohlenstoffquelle(n) und die Umwelt dieses Bakteriums.

In Tabelle 3-2 sind Einträge aus der UniProt-Datenbank gelistet, welche eine hohe Sequenzidentität zu den α-Untereinheiten aus *P. immobile* Stamm E besitzen. Es zeigte sich, dass sie eine hohe Sequenzidentität zu den α-Untereinheiten von 3-Phenylpropionat-Dioxygenasen (EC 1.14.12.19) aus anderen Organismen besitzen. Die Fähigkeit 3-Phenylpropionsäure als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen ist aus verschiedenen Bakterien wie zum Beispiel *Achromobacter* sp.[120], *Acinetobacter calcoaceticus*-Stämmen[121] und *E. coli* K12[122] bekannt. 3-Phenylpropionat-Dioxygenasen katalysieren hierbei die Oxidation des Aromaten von 3-Phenylpropionat zum *cis*-2,3-Dihydrodiol. Das Oxidationsprodukt wird im weiteren Abbauweg von einer Dehydrogenase oxidiert, der Aromat von einer Extradiol-Dioxygenase gespalten und das Spaltungsprodukt zu Acetaldehyd und Pyruvat abgebaut (vgl. Abbildung 1-7).[120,122–124] Der aerobe Abbauweg von 3-Phenylpropionsäure ist in diesen Bakterien analog zum Abbauweg von Phenazon und Pyrazon in *P. immobile* Stamm E.[11,102] Sie können neben 3-Phenylpropionsäure teilweise auch Phenylessigsäure[122,125], Zimtsäure[121], *L*-Phenylalanin[121], sowie hydroxylierte Derivate[121,122,125] dieser als einzige Kohlenstoffquelle nutzen. In der Umwelt finden sich Phenylessigsäure, 3-Phenylpropionsäure und ihre hydroxylierte Derivate, da diese vom intestinalen Mikrobiom aus sekundären Pflanzenstoffen gebildet und über Urin und Faeces ausgeschieden werden.[126–129] Einem Teil des intestinalen Mikrobioms wie zum Beispiel *E. coli* K12 dienen die Substanzen bereits im Darm selbst als Kohlenstoffquelle.[121,122] Es ist möglich, dass die Ausscheidungen der Abbauprodukte des intestinalen Mikrobioms dem Bodenbakterium (zum Teil) als Kohlenstoffquelle dienen.

Die sekundären Pflanzenstoffe aus denen diese Abbauprodukte gebildet werden sind die sogenannten Phenylpropanoide. Die Grundstruktur besteht aus einem Aromaten und drei Kohlenstoffatomen (C6-C3).[130] Der erste Schritt bei der Bildung von Phenylpropanoiden ist die Desaminierung der Aminosäure *L*-Phenylalanin zur *trans*-Zimtsäure durch das Enzym Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL).[131] Durch die Hydroxylierung des Aromaten werden in den Pflanzen Stoffe wie Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) oder Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure) gebildet. Durch eine Abspaltung eines C2-Fragmentes der aliphatischen Seitenkette können

sekundäre Pflanzenstoffe wie die Salicylsäure (2-Hydroxybenzencarbonsäure) oder die Vanillinsäure (4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure) gebildeten werden.[132] *P. immobile* E kann *L*-Phenylalanin nach einer lag-Phase von drei Wochen als Kohlenstoffquelle nutzen. Manche *P. immobile* Stämme zeigen schwaches Wachstum mit Zimtsäure als Kohlenstoffquelle. Kein Wachstum wurde auf Phenylpropanoid-Derivaten mit verkürzter aliphatischer Seitenkette wie Salicylsäure oder Benzoesäure festgellt.[11] Es findet sich keine Anmerkung in der Literatur, ob *P. immobile*-Wachstum auf Zimtsäure-Derivaten mit substituierten Aromaten wie Kaffeesäure und Ferulasäure zeigt.

Drei Produkte des Phenylpropanoid-Metabolismus (*p*-Cumarylalkohol, Coniferylalkohol und Sinapylalkohol) dienen den Pflanzenzellen als Monomer für das Polymer Lignin.[133] Lignin ist nach Cellulose das zweithäufigste Biopolymer auf der Erde und bindet etwa 30 % des organisches Kohlenstoffes in der Biosphäre.[134] An dem Abbau von Lignin in der Umwelt beteiligen sich Bakterien unter aeroben und anaeroben Bedingungen und besonders Pilze.[135] So können der Schlamm von anaeroben Vergärungsanlagen[136] und anaerobe Anreicherungskulturen[137] Lignin zu Phenylessigsäure und 3-Phenylpropionsäure abbauen. Der bakterielle Abbau von Lignin unter anaeroben Bedingungen findet vermutlich nur in Konsortien statt.[138,139] Als obligat aerobes Bakterium ist die Beteiligung von *P. immobile* an diesen Konsortien aber unwahrscheinlich. Unter aeroben Bedingungen sind Bakterien verschiedener Gattungen wie zum Beispiel *Streptomyces*[140], *Arthobacter*[141] und *Pseudomonas*[142] bekannt, welche Lignin als Kohlenstoffquelle nutzen können. In Bakterien ermöglichen die sogenannten *dye-decolorizing peroxidases* (DyPs, EC 1.11.1.19) die Spaltung und Verwertung des Lignins.[143] Gefunden wurde diese Enzymklasse zum Beispiel in den Genomen von *E. coli* K12, *Pseudomonas* sp. YS-1p und *Streptomyces coelicolor* A3 (2).[144] Weitere Enzyme, welche in der Natur den bakteriellen Abbau von Lignin unter aeroben Bedingungen unterstützen können, sind β-Esterasen[145], Häm-enthaltende Katalase-Peroxidasen[146] und Lignostilben-Dioxygenasen[147] (EC 1.13.11.43). Bei den annotierten Genen des Genomes von *P. immobile* finden sich keine Hinweise, dass das Bakterium in der Natur enzymatisch am initialen Ligninabbau beteiligt ist. Allerdings kann *P. immobile* kein Cobalamin (Coenzym B_{12}) selbst synthetisieren. Zur Anzucht und auch bei der Isolierung aus Bodenproben muss dem Medium dieser Kofaktor zugesetzt werden.[11] Cobalamin wird in der Natur nur von bestimmten Bakterien und Archaeen gebildet. Pilze und Pflanzen können selbst kein Cobalamin

bilden.[148] So leben viele Algen wie zum Beispiel *Porphyra yezoensis* in Symbiose mit Bakterien, welche Cobalamin synthetisieren.[149] Die Cobalamin-Auxotrophie von *P. immobile* legt nahe, dass dieses Bakterium in Symbiose mit anderen Bakterien lebt. Zum Beispiel wurde der Biosyntheseweg von Cobalamin am Stamm *Streptomyces coelicolor* A3 (2) untersucht[150], welcher ebenfalls Lignin abbauen kann.[151] Auch das Bakterium *Bacillus megaterium* kann Lignin verstoffwechseln[152] und wurde als eines der ersten Bakterien zur biotechnologischen Cobalamin-Produktion verwendet.[153,154]

Abschließend lässt sich sagen, dass das Substratspektrum (3.2.2) von *P. immobile*, als auch die phylogenetische Einordnung der ROs (Tabelle 3-2), es nahelegen, dass das Bakterium *P. immobile* im Boden am Abbau sekundärer Pflanzenstoffe beteiligt ist. Die Cobalamin-Auxotrophie macht es wahrscheinlich, dass es in einem Konsortium oder in Symbiose mit einem oder mehreren anderen Prokaryoten lebt. Das Kuriosum, dass *P. immobile* die Xenobiotika Phenazon und Pyrazon besser als Kohlenstoffquelle nutzen kann, als alle anderen bis jetzt als Kohlenstoffquelle getesteten Substanzen, kann dadurch aber nicht erklärt werden. Die Vielfalt der in seinem Genom kodierten α-Untereinheiten legt aber nahe, dass *P. immobile* sich in seinem natürlichen Habitat an verschiedene Kohlenstoffquellen zu adaptieren hat (vgl. Abschnitt 4.3).

4.2 Klassifizierung der kodierten ROs

Die in *P. immobile* Stamm E gefundenen ROs lassen sich in keines der bekannten Klassifizierungssysteme für ROs problemlos einordnen. Die Probleme einer Klassifizierung der in dieser Arbeit untersuchten Enzyme werden in diesem Abschnitt unter folgenden Aspekten diskutiert: 1.) Fehlen eines Gen-Clusters (4.2.1), 2.) mögliche Redoxpartner (4.2.2), und 3.) phylogenetischen Einordnung der annotierten α-Untereinheiten (4.2.3).

Als Grundlage für die Diskussion wurden diese Klassifizierungsansätze gewählt: a.) Batie und Kollegen publizierten 1991 ein Klassifizierungssystem für ROs, welches sich auf die Anzahl der Redoxpartner und die Art ihres Redoxzenters fokussierte.[22] b,c.) Werlen und Kollegen (1996), als auch Nam und Kollegen (2001) schlugen ein Klassifizierungssystem vor, welches sich auf eine phylogenetische Einordnung der Oxygenasekomponente bezog.[155,156] d.) Die beiden Ansätze wurden 2008 von Kweon

und Kollegen zu einem neuen Klassifizierungssystem bestehend aus fünf Klassen zusammengefügt. Jenes berücksichtigte sowohl die phylogenetische Einordnung der Oxygenasekomponente als auch die Art und Anzahl der Redoxpartner.[23] e.) Das Klassifizierungsmodel wurde 2012 von Chakraborty und Kollegen um neue Klassen ergänzt.[24] Eine detailliertere Beschreibung und Erklärung der möglichen Klassifizierungssysteme findet sich in Abschnitt 1.1.2.

4.2.1 Fehlen eines Gen-Clusters

Im Genom von *P. immobile* Stamm E sind 19 α-Untereinheiten von ROs kodiert. 15 dieser α-Untereinheiten weisen eine hohe Homologie (Sequenzidentität: 63,7 – 89,0 %) zu einander auf (Tabelle 3-1). In den in Abbildung 3-9 gezeigten Proteomanalysen nach Wachstum des Bakteriums auf Phenazon, Pyrazon und *L*-Phenylalanin konnten 16 dieser α-Untereinheiten wiedergefunden werden. Die Proteomanalysen wurden durchgeführt, nachdem das Lysat auf eine Native-PAGE aufgetragen wurde und nur der in Abbildung 3-8 gezeigte Größenbereich wurde untersucht. Dies bedeutete wie in Abschnitt 3.3.1 dargelegt, dass diese homologen Oxygenasen in den Zellen in der Oligomerstruktur $\alpha_3\beta_3$ vorliegen. Für die α-Untereinheit DO16 konnte in *E. coli* Aktivität gezeigt werden. Diese Aktivität konnte nur nachgewiesen werden, wenn die die α-Untereinheit gemeinsam mit der β-Untereinheit exprimiert wurde. Das Genom von *P. immobile* ist 3,3 Mbp ist groß.[12] 15 der homologen α-Untereinheiten liegen im größten Scaffold (Scaffold 1: 2,88 Mbp) kodiert (vgl. Abbildung 3-2). Die α-Untereinheit DO30, welche nach Wachstum im Fermenter als einzige detektiert wird (vgl. Abbildung 3-11), liegt auf dem Plasmid des Bakteriums kodiert. Das Gen der β-Untereinheit DO3 liegt im Scaffold 2. Zwischen der DO16, welche heterolog exprimiert mit den Substraten Phenazon und Pyrazon Aktivität zeigte, und der β-Untereinheit DO3 liegen im Genom von *P. immobile* Stamm E mindestens 1,75 Mbp. Dies widerspricht aktuellen Vorstellungen von den Gen-Clustern, in welchen ROs kodiert sind.

Die ersten Klassifizierungsansätzen von Batie und Kollegen[22] (1991), Werlen und Kollegen[13] (1996) , und Nam und Kollegen[79] (2001) hatten die gleiche Grundannahme, dass die Komponenten der ROs in Gen-Clustern organisiert sind, was eine sofortige Zuordnung der Elektronentransportproteine ermöglicht, wie sie etwa im

Klassifizierungssystem nach Batie und Kollegen[22] nötig ist. Insbesondere bei Werlen und Kollegen findet sich die Reihenfolge der RO-Komponenten in den Gen-Clustern im Rahmen ihres Klassifizierungssystems diskutiert.[155] Einige ROs finden sich bereits in einem Gen-Cluster mit den anderen Enzymen des *upper pathway* (Dihydrodiol-Dehydrogenase und ringspaltende Dioxygenase).[157,158] In der Natur gibt es verschiedene Beispiele für Genduplikationen der Oxygenasekomponente (α- und β-Untereinheit) in einem Genom. Das Gen der Oxygenasekomponente kann hierbei in zwei verschiedenen Operonen im Genom zu finden sein (wie dem *ant* und *xyl* Operon in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1) oder das Gen im Operon selbst dupliziert sein (wie die Gene *akb*A1a und *akb*A1b im Genom von *Rhodococcus* sp. DK17[159]).[24] In all diesen Fällen bleibt aber das Operon als Organisationseinheit erhalten.

2008 stellten Kweon und Kollegen ein neues Klassifizierungssystem mit fünf Klassen vor.[23] Sie führten hierzu die Klassifizierungsansätze, welche sich auf die phylogenetische Einordnung der Oxygenasekomponente konzentrierten, mit Klassifizierungsansätzen, welche die Art und Anzahl der Redoxpartner betrachteten, zusammen. Anlass waren die vorangegangen Untersuchungen an den ROs NidAB, NidA3B3[160] und PhtAaAb[161] aus *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Bei diesen ROs waren die Gene der Redoxpartner im Genom nicht in der Nähe der Oxygenasegene von α- und β-Untereinheit kodiert (*genetic discreteness*) und eine begrenzte Anzahl von Redoxkomponenten wurde von mehreren Oxygenasen genutzt (*numberical imbalance*).[23] Chakraborty und Kollegen (2012) erweiterten das Klassifizierungssystem um ROs, die Ferredoxine mit *plant-type* [2Fe-2S] Cluster oder ein Rubredoxin zur Elektronenübertragung nutzen. So besitzt die Dioxin-Dioxygenase aus *Sphingomonas* sp. Stamm RW1 (DxnA1) ein Ferredoxin mit *plant-type* [2Fe-2S] Cluster und eine Glutathionreduktase als Redoxpartner. Beide sind getrennt voneinander im Genom kodiert. Allerdings war eine wahrscheinliche Zuordnung als Redoxpartner erst möglich als die Diphenylamin-Dioxygenase (DpaA) aus *Burkholderia* sp. Stamm JS667 mit ähnlichen Redoxpartnern, welche in einem Cluster angeordnet waren, sequenziert wurde.[24]

Es sind somit ROs bekannt, in denen (wahrscheinlich) Reduktase und Ferredoxin getrennt im Genom kodiert sind. Dennoch wird bei Chakroborty und Kollegen darauf hingewiesen, dass das Gen der β-Untereinheit immer neben dem Gen der α-Untereinheit liegt. Dies wird damit erklärt, dass die β-Untereinheit vermutlich doch

einen Einfluss auf die Substratspezifität hat.[24] Das Bakterium *Sphingnobium* sp. Stamm PNB besitzt sieben Oxygenasenkomponenten und ein Gen-Cluster für die Elektronentransportproteine. Bei jeder der sieben Oxygenasen befinden sich die Gene der α-Untereinheit und β-Untereinheit neben einander im Genom.[162] Im Genom von *P. immobile* Stamm E finden sich 19 α-Untereinheiten und getrennt eine β-Untereinheit kodiert.

4.2.2 Redoxpartner

Das Fehlen eines Gen-Clusters erschwerte das Aufklären der Quartärstruktur der Oxygenase, da ein Zuordnen der β-Untereinheit zur α-Untereinheit nicht möglich war. Die Quartärstruktur wurde durch eine Native-PAGE und anschließender Proteomanalyse aufgeklärt (3.3.1). Auch die direkte Zuordnung der Elektronentransportproteine zur Oxygenasekomponente war nicht möglich. Die nachfolgende Tabelle 4-1 gibt eine Übersicht über die zwei Ferredoxine und zwei Ferredoxin-Reduktasen, welche im Genom von *P. immobile* E annotiert und im Rahmen dieser Arbeit kloniert und exprimiert wurden.

Tabelle 4-1: Klonierte und exprimierte Elektronentransportproteine aus *P. immobile* Stamm E.

Name	Größe [kDa]	Proteinfamilie	Beschreibung
Ferredoxin 3	11,5	pfam00111	$[2Fe\text{-}2S]_{PT}$
Ferredoxin 4	12,7	pfam12838	2x [4Fe-4S] Cluster
Ferredoxin-Reduktase 1	48,4	pfam07992	Glutathionreduktase (FAD-Flavoprotein)
Ferredoxin-Reduktase 2	33,7	pfam00175	-FAD-Bindetasche -NAD-Bindetasche

Die Gene des Ferredoxins 3 und der Ferredoxin-Reduktase 1 liegen in einem Abstand von elf Basenpaaren neben einander auf dem Genom kodiert. Das Gen-Cluster macht es wahrscheinlich, dass diese beiden Elektronentransportproteine in der Zelle eine gemeinsame Funktion erfüllen. Reznicek hat in seiner Dissertation bereits die α-Untereinheiten DO16, DO30 und die β-Untereinheit DO3 mit diesem Gen-Cluster in *E. coli* exprimiert und konnte keine Aktivität detektieren. Deswegen wurde in dieser Arbeit ein anderer Ansatz gewählt: Die Oxygenasekomponente wurde aus dem Rohextrakt des Bakteriums aufgereinigt[106], während die Elektronentransportproteine

in *E. coli* exprimiert und aus dem Rohextrakt von *E. coli* aufgereinigt wurden. Die Oxygenase(n) wurde(n) nach der Fermentation mit Phenazon als Kohlenstoffquelle aufgereinigt (vgl. 2.2.1). Alle Kombinationen von Elektronentransportproteinen und Oxygenasekomponente zeigten Produktbildung mit Phenazon als Substrat. Die stärkste Produktbildung wurde mit dem Ferredoxin 4 und der Ferredoxin-Reduktase 2 detektiert, weshalb diese in den weiteren Schritten kloniert und exprimiert wurden.

Nach den in Tabelle 1-1 aufgeführten Klassifizierungen sind Ferredoxine mit [4Fe-4S] Eisen-Schwefel-Cluster, wie sie das Ferredoxin 4 trägt, bei ROs nicht bekannt. Auch die Oxidoreduktase NAD-Bindedomäne (pfam00175) wie sie die Ferredoxin-Reduktase 2 trägt, ist nicht bei Elektronentransportproteinen für ROs bekannt. Dennoch zeigten sie mit der aufgereinigten Oxygenasekomponente die meiste Produktbildung und zeigten auch mit der Oxygenasekomponente DO16 nach der heterologen Expression in *E.coli* Aktivität. Dies muss aber nicht bedeuten, dass diese auch die einzigen physiologischen Redoxpartner sind, da Elektronentransportpartner austauschbar sind.[163,164]

Die Ergebnisse von Sauber und Kollegen von 1977 legen nahe, dass die physiologischen Redoxpartner zwei andere Elektronentransportproteine sind. Sie charakterisierten das Redoxprotein als FAD-bindendes Flavoprotein von 67,0 kDa Größe und das Ferredoxin als ein Protein, welches ein [2Fe-2S] Eisen-Schwefel-Cluster trägt und eine Größe von 12 kDa besitzt. Zur Größenbestimmung wurde die Größenausschlusschromatographie verwendet.[94] Das [2Fe-2S] Eisen-Schwefel-Cluster macht es wahrscheinlich, dass damals das Ferredoxin 3 aus dem Rohextrakt aufgereinigt wurde. Die Kombination von einem Ferredoxin mit *plant-type* $[2Fe\text{-}2S]_{PT}$ Eisen-Schwefel-Cluster (pfam00111) und einer Glutathionreduktase (pfam07992) als Elektronentransportproteine, wie sie bei Ferredoxin 3 und Ferredoxin-Reduktase 2 in *P. immobile* Stamm E der Fall wäre, ist für die Carbazol-1,9a-Dioxygenase (UniProt-ID: Q84IG9_NOVK1, Q2PFA6_NOVK1) aus *Sphinomonas* sp. Stamm KA1 bekannt. Die Gene *fdxI*, *fdrI* und *fdrII* liegen auf dem 254 kb großen Plasmid pCAR3 und kodieren für das Ferredoxin FdxI (pfam00111) und die Ferredoxin-Reduktasen FdrI und FdrII ((pfam07992). Die Gene *fdxI* und *fdrI* bilden ein Cluster getrennt von dem Gen-Cluster *car-I*, welches die anderen am Carbazol-Abbau beteiligten Gene zusammenfasst.[165] Chakraborty und Kollegen klassifizierten die Carbazol-1,9a-Dioxygenasen CarAa und CarAaI aus *Sphinomonas* sp. Stamm

KA1 als VIIα[24] (Tabelle 1-1). Die Carbazol-1,9a-Dioxygenasen ist ein Homomer, wie auch durch heterologe Expression bestätigt wurde, weshalb sie als VIIα klassifiziert wurde. Sollten Ferredoxin 3 und Ferredoxin-Reduktase 1 aus *P. immobile* E die physiologischen Redoxpartner sein, wären die ROs als die neue Klasse VIIαβ einzuordnen. Um dies zu bestätigen, sollte die aktive α-Untereinheit DO16 neben den Elektronentransportpartnern Ferredoxin 4 und Ferredoxin-Reduktase 2, wie es in dieser Arbeit geschehen ist, mit den Elektronentransportpartnern Ferredoxin 3 und Ferredoxin-Reduktase 1 in *E. coli* auf Aktivität getestet werden.

4.2.3 α-Untereinheiten

Werlen und Kollegen (1996) und Nam und Kollegen (2001) klassifizierten ROs nach der phylogenetischen Abstammung der Oxygenasekomponente und ordneten den Klassen ein bestimmtes Substratspektrum zu. Die Klassen sind in Abschnitt 1.1.2 erklärt. Kweon und Kollegen griffen diesen Ansatz auf und ergänzten diesen um eine weitere Klasse von ROs deren Oxygenasekomponente eine eigene phylogenetische Gruppe bildeten (Klasse V nach [23]). In der Publikation von Kweon und Kollegen sind ein Set von 25 Standard-ROs genannt, die dem Anwender des Klassifizierungssystems eine einfache phylogenetische Einordnung der Oxygenase ermöglichen soll (vgl. Abschnitt 6.4). Chakraborty und Kollegen ergänzten dieses Klassifizierungssystem um vier Klassen. Die neuen Klassen IIα und IVα umfassten nur einen Vertreter (Klasse IIα: 2-oxo-1,2-Dihydroquinolin-8-Monooxygenase (OxoO) aus *Pseudomonas putida* Stamm 86; Klasse IVα: Carbazol-Dioxygenase aus *Nocardioides aromaticivorans* Stamm IC177). Die Klasse VIIα umfasst die Carbazol-1,9a-Dioxygenasen CarAa und CarAaI aus *Sphinomonas* sp. Stamm KA1, welche in Abschnitt 4.2.2 wegen ihrer Elektronentransportproteinen näher diskutiert sind. Die Klasse VIαβ umfasst Oxygenasen, welche ein Rubredoxin als Ferredoxin nutzen und wurde bislang nur in *Rhodococcus*-Stämmen gefunden. Um eine phylogenetische Einordnung der α-Untereinheiten zu ermöglichen, wurden die 25 Standard-ROs von Kweon und Kollegen verwendet. Diese umfassen auch die in den Klassifizierungen von Werlen und Kollegen und Nam und Kollegen diskutierten Oxygenasen. Um ein vollständiges Bild zu erhalten wurden die Vertreter mit den vorgeschlagenen, neuen Klassen von Chakraborty und Kollegen ergänzt. Der phylogenetische Baum mit den

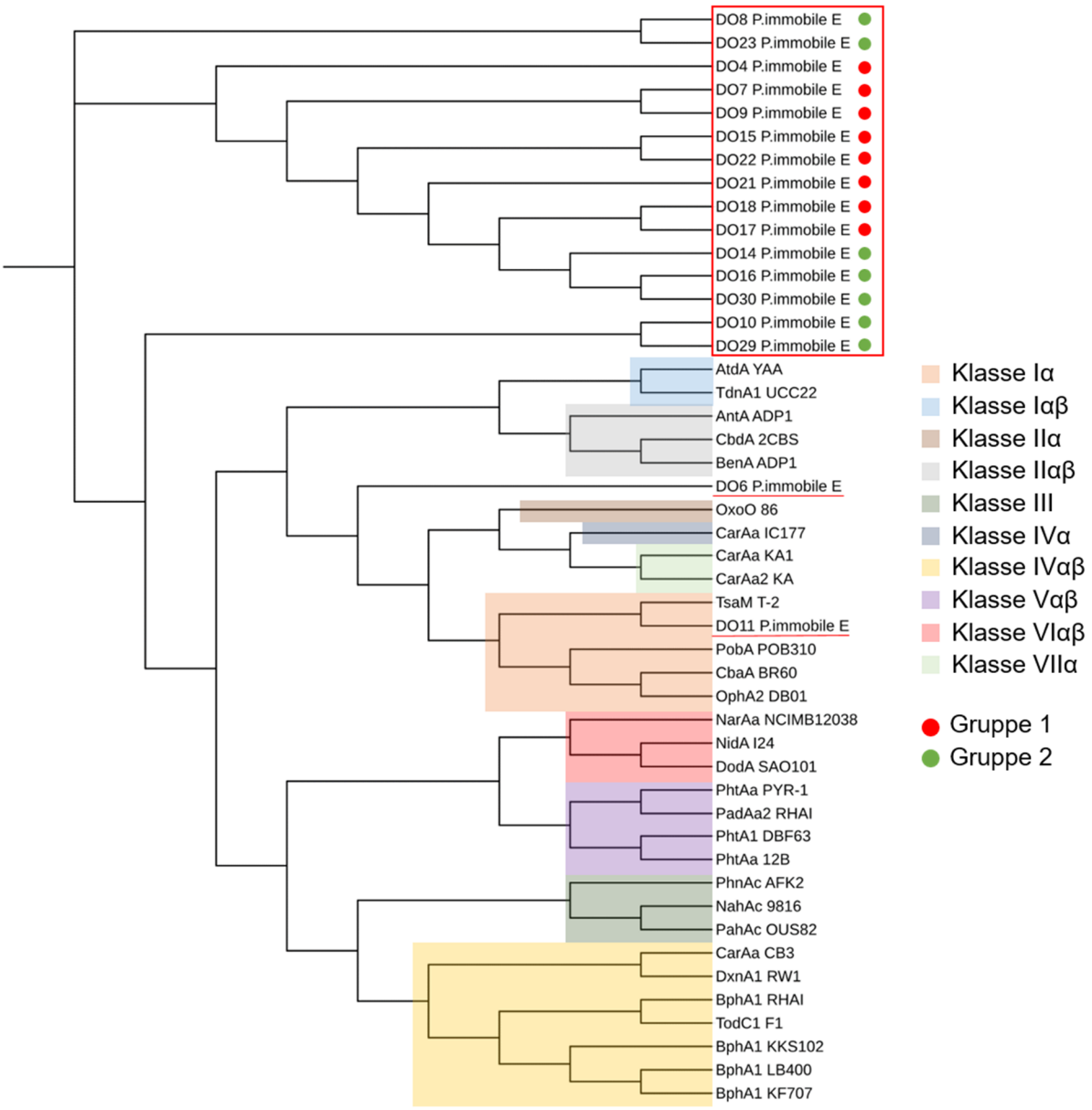

Abbildung 4-1: Phylogenetischer Baum der Oxygenasekomponenten. Das Erstellen des Baumes wurde wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben durchgeführt. Gezeigt sind Standard-ROs, welche von Kweon und Kollegen zur phylogenetischen Einordnung neuer Oxygenasesequenzen vorgeschlagen wurde, sowie Vertreter der neuen Klassen von Chakraborty und Kollegen (vgl. Abschnitt 6.4). Die farbliche Hinterlegung zeigt die Klassenzugehörigkeit an. Die Oxygenasen aus *P. immobile* Stamm E sind rot unterstrichen oder umrahmt.

Aminosäuresequenzen der α-Untereinheiten aus *P. immobile* Stamm E ist in Abbildung 4-1 gezeigt und wurde wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben erstellt. Nur die α-Untereinheit DO11 konnte von dem Klassifizierungssystem genau erfasst werden. Sie ordnet sich in die Klasse Iα ein. Ein Zweikomponentensystem mit einem Homomer als Oxygenasekomponente. Sie zeigt die größte Homologie zu der *p*-Toluensulfonat-Monooxygenase aus *Comamonas testeroni* Stamm T-2. Ein Homotri- oder Homotetramer, welches zur Aktivierung ein eisenschwefelhaltiges Flavoprotein benötigt.[166] Die α-Untereinheit DO11 wurde bei den Proteomanalysen nicht detektiert. Ein Grund dafür könnte sein, dass die α-Untereinheiten in der Zelle ein

Homomer bilden, welches nicht im untersuchten Größenbereich durch die Native-PAGE aufgetrennt wurde. Die α-Untereinheit DO6 konnte phylogenetisch nicht genau zugeordnet werden. DO6 und DO11 besitzen nur eine geringe Sequenzidentität von etwa 20 % zu einander, sowie zu den restlichen α-Untereinheiten mit hoher Sequenzhomologie (vgl. Tabelle 3-1). Die sequenzhomologen α-Untereinheiten, welche in Abbildung 4-1 durch einen grünen oder roten Punkt markiert sind, ordnen sich in diesem Kladogramm nicht bei den übrigen ROs ein. Es wird vermutet, dass die katalytisch aktive Untereinheit bei bakteriellen ROs sich aus einem gemeinsamen Vorgänger entwickelt haben.[167] Dies angenommen, haben sich die Oxygenasen aus *P. immobile* vermutlich schon zu einem früher evolutionären Zeitpunkt von der weiteren Entwicklung der meisten heute bekannten ROs entfernt.

4.3 Substratspezifität

4.3.1 Variable Sequenzregion

Die Naphthalin-1,2-Dioxygenase (NDO) aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 (UniProt-ID: P0A110) gehört zu den am besten untersuchten ROs.[168] 2017 entwickelten Escalante und Kollegen[169] ein Vorhersagemodell für Substrate der NDO mit einer Vorhersagegenauigkeit von 92 %. Ein besonderes Augenmerk ihres Vorhersagemodelles lag auf der Betrachtung der Energiebarriere für die Substrate im Eingangskanal des Enzymes. Sie konnten hierbei vier Aminosäuren identifizieren, welche den größten Beitrag zu dieser Energiebarriere lieferten: F224, L227, P234, und L235. Alle diese Aminosäuren liegen auf dem ε-Loop (E221-A238) des Enzymes.[111] Bereits Seo und Kollegen konnten 2013 zeigen, dass F224 eine Schlüsselposition für die Steuerung der Regio- und Stereospezifität bei der Hydroxylierung von Flavanonen ist. Ein Alignment der Aminosäuresequenzen, sowie ein Vergleich der Kristallstruktur der NDO mit den Homologiemodellen der ROs aus *P. immobile*, zeigte, dass der ε-Loop in der NDO der variablen Sequenzregion in den RO-Sequenzen entspricht (vgl. Abbildung 4-2). Diese Loop-Region über dem katalytisch aktiven Eisen findet sich auch in anderen α-Untereinheiten von ROs wie beispielsweise der Cumol-Dioxygenase

(CDO) aus *Pseudomonas fluorescens* IP01 (UniProt-ID: Q51743; Loop 2: L248-N264).[110]

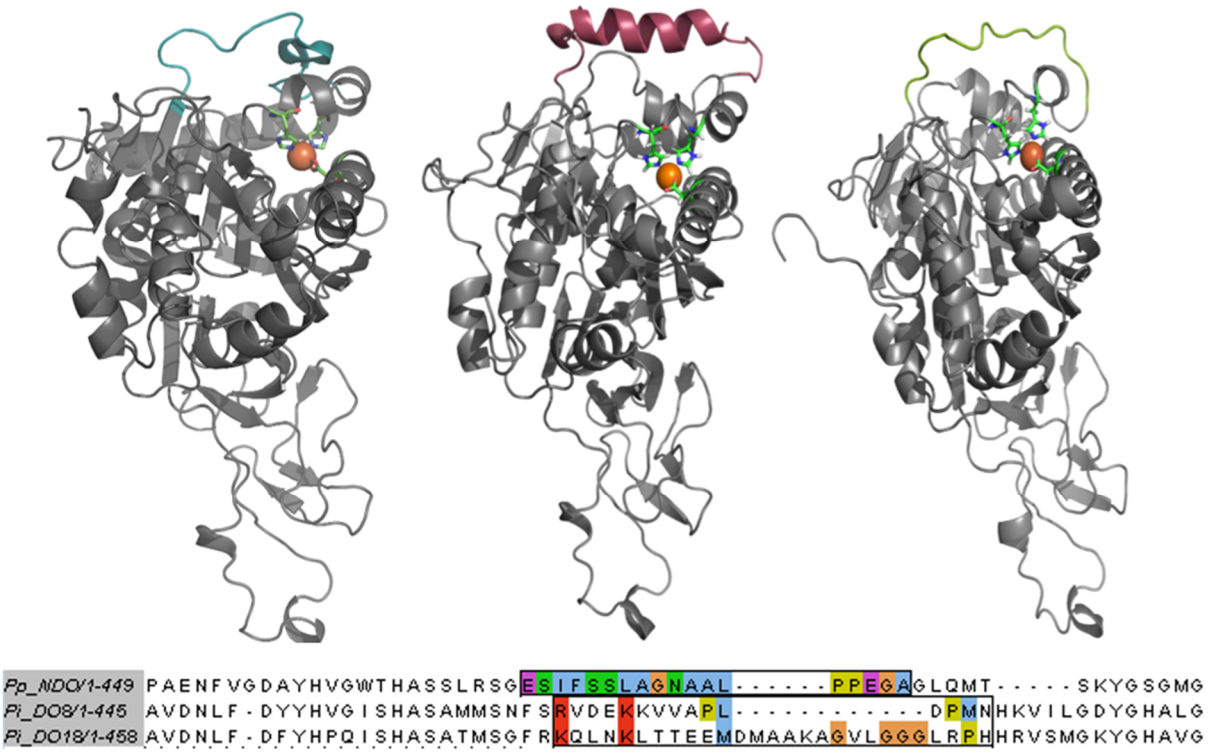

Abbildung 4-2: Alignment und Strukturvergleich der Napthalin-1,2-Dioxygenase (NDO) aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 (PDB code: 1ndo; ε-Loop in blau) mit der α-Untereinheit DO18 (ε-Loop in rot) und der DO8 (ε-Loop in grün). Katalytisch aktives Eisen: orange. His-Asp-Triade: grüne *sticks*.

Der ε-Loop bildet einen Teil des Substrateingangskanals zum katalytischen Zentrum. Die Bedeutung des Eingangskanals für die katalytische Umsetzung bei Enzymen versucht das *keyhole-lock-key* Modell zu erklären.[170] Es baut auf dem *lock-key* Modell von Emil Fischer auf.[171] Das Substrat wird in diesem Modell als *key* (Schlüssel) und das Enzym als *lock* (Schloss) beschrieben. Stimmen Größe, Form und physiochemische Eigenschaften von Substrat und Enzym respektive sein aktives Zentrum wie Schlüssel und Schloss über ein, kommt es zur chemischen Umsetzung. Das Modell erfuhr einige Modifizierungen wie beispielsweise durch das *induced-fit* Modell von David Koshland (1958), welche beschreibt, dass durch die Bindung des Substrates eine Konformationsänderung des Enzymes respektive aktiven Zentrums bewirkt wird.[172] Diese Modelle funktionieren für Enzyme deren aktives Zentrum an der Oberfläche des Enzymes liegt. In mehr als 64 % der Enzyme führen zwei oder mehr Enzymkanälen von über 15 Å Länge zum aktiven Zentrum.[173] Ihre Größe, Form, und physiochemische Eigenschaften beeinflussen den Ein- und Austritt von Substrat und Produkt und damit Substratspezifität und Stereoselektivität. Um diese Enzymkanäle in das Modell mit einzubeziehen, werden sie als *keyhole* (Schlüsselloch) betrachtet.

Diese Betrachtung macht die Proteinreste der Enzymkanäle zu interessanten Ansatzpunkten für *protein engineering*, da hier Aktivität[174], Spezifität[175], Stereoselektivität[176] und Stabiltität[177] des Enzymes beeinflusst werden können. Eine Hypothese wäre deshalb, dass durch die Variabilität des Eingangskanales die Substratspezifität der einzelnen α-Untereinheiten verschieden ist. Dabei bleibt die Sequenzidentität des Restes der α-Untereinheiten weitestgehend erhalten (vgl. Abbildung 3-1).

Die Enzymreste des Eingangskanales liegen (teilweise) auf flexiblen Loop-Strukturen. Die Bedeutung von Loop-Strukturen für die Gesamteigenschaft eines Enzyms konnten Reich und Kollegen zeigen, in dem sie durch die Variation der Länge zweier Oberflächenloops der Ene-Reduktase NCR aus *Zymomonas mobilis* die Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln und die Thermostabilität steigern konnten.[178] Es ist aber auch bekannt, dass flexible Loop-Strukturen in der Nähe des aktiven Zentrums die Substratspezifität des Enzymes ändern können.[179] So konnten Baker und Kollegen die Spezifität einer humanen Guanin-Desaminase so verändern, dass diese auch Cytosin als Substrat akzeptierte. Hierfür mutierten sie die Loop-Region um das aktive Zentrum, welche mit dem Cytosin interagierten, ohne die katalytisch aktiven Reste auszutauschen.[180] Wenige *β*-Lactamasen der Klasse D (OXA-Typ) besitzen die Fähigkeit Carbapeneme zu hydroxilieren. Ausgehend von Strukturanalysen und molekularen Modellierung wurde vermutet, dass der Loop-Bereich zwischen den Strängen *β*5 und *β*6 in der Nähe des aktiven Zentrums die Substratspezifität der *β*-Lactamasen bei Carbapenemen beeinflusst. De Luca und Kollegen fügten den *β*5-*β*6 Loop aus den Carbapenemasen OXA-23, OXA-24 und OXA-48 in die *β*-Lactamase OXA-10 ein, welche keine Carbapeneme hydroxilieren konnte. Nach dem *loop grafting* besaß OXA-10 die Fähigkeit Carbapeneme zu hydroxilieren, ohne dass die biochemischen Eigenschaften gegenüber anderen Substraten verändert wurden.[181] Mutationen im Loop zwischen dem *β*2-Strang und der αB-Helix der Rossmann-Faltung von Ketolsäure-Reduktoisomerase verursachen einen *cofactor switch* - also eine Änderung der Spezifität zwischen den Cofaktoren NADH und NADPH.[182]

Das Mutieren oder der Austausch von Loop-Regionen in der Nähe des katalytischen Zentrums sind also ein vielversprechender Ansatz die Substratspezifität eines Enzymes zu verändern. Loop-Regionen unterliegen in Proteinen konstanten evolutionären Constraints. Diese Constraints ergeben sich vorallem aus der Interaktion

mit Liganden.[183] Die dennoch starke Variation der Loop-Regionen in den ROs von *P. immobile,* sowie die Nähe der Loops zum katalytischen Zentrum, weisen darauf hin, dass mit der Veränderung der Loop-Region die Substratspezifität der ROs variiert wird.

4.3.2 Proteomanalysen

Sauber und Kollegen reinigten 1977 *die* Pyrazon-Dioxygenase aus *P. immobile* E auf und zeigten, dass es sich um ein System aus drei Komponenten handelt.[94] 2015 wurde das Genom sequenziert und es konnten 19 ORF von α-Untereinheiten annotiert werden.[107] Die Proteomanalysen sollten Antwort geben, wieviele der im Genom kodierten α-Untereinheiten sich exprimiert im Proteom wiederfinden. Als Kohlenstoffquellen wurden Pyrazon, Phenazon und *L*-Phenylalanin gewählt. Mit den Kohlenstoffquellen Pyrazon und Phenazon zeigt das Bakterium das stärkste Wachstum. Eine Anzucht mit anderen Kohlenstoffquellen wie Phenylessigsäure war in Flüssigkultur aufgrund des sehr schwachen Wachstum nicht möglich. Eine Ausnahme bildete *L*-Phenylalanin. Der Stamm E zeigte eine lag-Phase von ungefähr 3 Wochen bevor er beginnt auf dieser Kohlenstoffquelle zu wachsen. Vor der lag-Phase konnte die Zugabe von *L*-Phenylalanin als Substrat keinen Sauerstoffverbrauch beim auf Phenazon angezogenen Stamm induzieren. Nach der lag-Phase zeigt der Stamm E ein starkes Wachstumsverhalten auf *L*-Phenylalanin (Generationszeit: *L*-Phe: 8,5 h; Phenazon: 7 h) und die Zugabe von *L*-Phenylalanin konnte Sauerstoffverbrauch induzieren (*L*-Phe: v_{max} = 25,0 µM, K_m = 3,0 mU/mg; Phenazon: v_{max} = 13,0 µM, K_m = 6,3 mU/mg). Dies wies auf eine Veränderung im Proteom hin.[92] In der Proteomanalyse wurden mit Ausnahme von DO17 alle 15 Sequenzhomologen α-Untereinheiten gefunden. Die prozentuale Peptidverteilung fiel auf die einzelnen α-Untereinheiten mit 0,3 - 10,4 %. Etwas stärker waren DO7 mit 14,8 ± 1,4 % und DO30 mit 16,9 ± 1,5 % exprimiert.

Es scheint, dass beim Wechsel zu einer neuen, unbekannten Kohlenstoffquelle das Bakterium ein breites Spektrum an α-Untereinheiten exprimiert. Bei den Kohlenstoffquellen Phenazon und Pyrazon auf denen das Bakterium das beste (bekannte) Wachstum zeigt, wird das Spektrum der exprimierten α-Untereinheiten geringer und die prozentuale Peptidverteilung verschiebt sich zugunsten einzelner α-Untereinheiten. Nach dem Wachstum auf Phenazon finden sich sieben

α-Untereinheiten im Proteom. Nach dem Wachstum auf Pyrazon werden acht α-Untereinheiten detektiert. In beiden Anzuchten kann etwa die Hälfte aller detektierten α-Untereinheiten, der auf dem Plasmid kodierten α-Untereinheit DO30 zugeordnet werden (Phenazon: 48,8 ± 4,0 %; Pyrazon: 42,9 ± 2,43 %). Nach der Anzucht im Fermenter konnten nur noch Peptide der α-Untereinheit DO30 detektiert werden.

Die α-Untereinheiten DO30 und DO16 haben die höchste Sequenzidentität (89,0 %) von allen homologen α-Untereinheit im Stamm E. DO16 ist die einzige der siebzehn in dieser Arbeit klonierten α-Untereinheiten, welche heterolog exprimiert Aktivität mit den Substraten Phenazon und Pyrazon zeigte. Die α-Untereinheit DO16 liegt im Genom geclustert mit anderen α-Untereinheiten wie DO15, DO16, DO17, DO18 und DO21 (vgl. Abbildung 3-2). In diesem Cluster findet sich auch eine Tn3 Transposase, sowie eine Resolvase und Invertase. Die ORFs von Tn3 Transposase, Resolvase, Invertase finden sich ebenfalls auf dem Plasmid von Stamm E zusammen mit DO30 (vgl. auch [107]). Mobile genetische Elemente wie Transposons und katabolische Plasmide spielen eine wichtige Rolle in Prokaryoten, welche am Abbau von Xenobiotika beteiligt sind.[184] Arber benannte 2000 drei Strategien mit denen genetische Variationen in Bakterien entstehen: 1.) Kleine, lokale Veränderungen in der Nukleotidsequenz des Genomes, 2.) Intragenomisches Umstrukturieren von Segmenten der Genomsequenz, und 3.) Die Aufnahme von DNA aus anderen Organismen.[185]

Die 2. Strategie besitzt vermutlich eine besondere Bedeutung in *P. immobile*. Durch die im Genom an verschiedenen Stellen annotierten Tn3 Transposasegene[107] generiert der Stamm verschiedene genetische Varationen von α-Untereinheiten, die sich vermutlich in ihrer Substratspezifität unterscheiden (vgl. Abschnitt 4.3.1). Die so entstandene α-Untereinheit DO16 ist in der Lage die Xenobiotika Pyrazon und Phenazon zu dihydroxylieren, wie in Abschnitt 3.5 gezeigt werden konnte. In Prokaryoten können sich die am Abbauweg beteiligten Gene auf sogenannten *catabolic plasmids* kodiert befinden.[47] Diese Plasmide besitzen oft verschiedene mobile genetische Elemente wie Transposons und Insertionssequenzen. Das Plasmid aus *P. immobile* Stamm E trägt als ein *catabolic plasmid* die für den Katabolismus von Phenazon und Pyrazon notwendige DO30 (eine sequenzhomologe Variante von DO16). Ein Novum dieses Bakteriums ist, neben der hohen Anzahl an α-Untereinheiten, das Fehlen einer Operon-Struktur (vgl. Abschnitt 4.2.1). So finden sich auch auf dem *catabolic plasmid* nicht alle zum Katabolismus notwendigen

Enzyme, sondern lediglich die α-Untereinheit DO30 und eine durch Deletionen vermutlich funktionslose Variante DO31.

Eine weitere Bedeutung kommt diesen Plasmiden beim horizontalen Gentransfer bei – also der 3. Strategie zur Entstehung genetischer Variation. Dieser ermöglicht eine Verbreitung der Stoffwechselwege zwischen den Organismen.[35] Kreis und Kollegen konnten die Bedeutung der Plasmid-DNA für *P. immobile* bereits 1981 an den Stämmen K2 und K3 zeigen. Diese verloren nach wiederholten Transferen in ein Medium ohne die Kohlenstoffquelle Phenazon ein Plasmid von 21,5 MDa (Stamm K2) und 20,2 MDa (Stamm K3). Nach dem Verlust dieses Plasmides verloren die Stämme auch ihre Oxygenasekomponente.[186]

4.4 Ausblick

Das Bodenbakterium *Phenylobacterium immobile* konnte 1969 mit dem Xenobiotika Pyrazon als Kohlenstoffquelle aus Bodenproben isoliert werden. In seinem natürlichen Habitat dienen vermutlich sekundäre Pflanzenstoffe als Kohlenstoffquelle (vgl. 4.1). Die Cobalamin-Auxotrophie des Bakteriums könnte auf ein Konsortium hinweisen, in welchem es in der Natur lebt.[187] Heute können bakterielle Gemeinschaften (z.B. in Böden) durch metagenomische Analysen in Gänze erfasst werden.[188,189] Die metagenomische Untersuchung von Bodenproben, in welchen *P. immobile* gefunden werden, könnte neue Hinweise auf die Lebensgemeinschaft und die natürlichen Kohlenstoffquellen des Bakteriums geben.

Die hohe Anzahl von 19 α-Untereinheiten im Genom eines einzelnen Bakteriums und das Fehlen eines Gen-Clusters von α-Untereinheit und β-Untereinheit waren vorher nicht aus der Literatur bekannt.[24,162] Das Fehlen eines Gen-Clusters erschwerte auch die Zuordnung der Elektronentransportproteine, welche auch eine Klassifizierung vereinfacht hätte. Im Genom wurden zwei Ferredoxine (Ferredoxin 3 und Ferredoxin 4) und zwei Ferredoxin-Reduktasen (Ferredoxin-Reduktase 1 und Ferredoxin-Reduktase 2) annotiert (Nomenklatur nach [107]). Bei der heterologen Expression der α-Untereinheit DO16 mit dem Ferredoxin 4 und der Ferredoxin-Reduktase 2 in *E. coli* konnte Produktbildung bei der Umsetzung von Pyrazon und Phenazon detektiert werden. Die in Abschnitt 4.2.2 dargelegten

Überlegungen machen es wahrscheinlich, dass diese beiden Elektronentransportproteine nicht die physiologischen Redoxpartner sind. Eine Wiederholung der Biotransformationen mit den anderen beiden, vermutlich physiologischen, Redoxpartnern Ferredoxin 3 und Ferredoxin-Reduktase 1 könnte zu einer stärkeren Produktbildung führen. Der erhöhte Umsatz könnte vielleicht auch die Detektion von Produkbildung für andere Substrate der ROs ermöglichen.

Die im Genom kodierten α-Untereinheiten unterscheiden sich primär in einer variablen Sequenzregion, welche in der Tertiärstruktur vermutlich einen Loop-Bereich über dem katalytisch aktiven Eisen bilden. Dieser Loop-Bereich lässt sich auch in der gut untersuchten Napthalin-1,2-Dioxygenase (UniProt-ID: P0A110) finden. In dieser beeinflusst der Loop die Substratspezifität des Enzymes.[169] Im Proteom lassen sich abhängig von der zur Anzucht verwendeten Kohlenstoffquelle bis zu 16 verschiedene α-Untereinheiten gleichzeitig finden. Vermutlich exprimiert das Bakterium verschiedene ROs, welche sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden, um ein breites Spektrum an möglichen Kohlenstoffquellen abzudecken. Eine Motivation sich mit den ROs aus *P. immobile* zu beschäftigen war es die Substratspezifität von ROs im Allgemeinen zu verstehen. Der entdeckte Loop-Bereich kann hierfür ein Ansatzpunkt sein. Die Startaktivität der α-Untereinheit DO16 kann für ein *loop grafting* mit den Loop-Sequenzen der anderen ROs aus dem Stamm genutzt werden. Ein direkter Vergleich zwischen Loop-Sequenz und Substratspezifität wäre so möglich. Der Loop-Bereich findet sich ebenfalls in anderen, in der Biokatalyse bereits etablierten, ROs wie der Napthalin-1,2-Dioxygenase (NDO) aus *Pseudomonas* sp. NCIB 9816-4 oder der Cumol-Dioxygenase von *Pseudomonas fluorescens* IP01.[190,191] Die entdeckte Sequenzvariablität der α-Untereinheiten aus *P. immobile* soll in folgenden Arbeiten auf diese Oxygenasen übertragen werden, um ihr Substratspektrum zu erweitern.

5 Literaturverzeichnis

(1) Choudary, B. M.; Chowdari, N. S.; Madhi, S.; Kantam, M. L. A Trifunctional Catalyst for One-Pot Synthesis of Chiral Diols via Heck Coupling-N-Oxidation-Asymmetric Dihydroxylation: Application for the Synthesis of Diltiazem and Taxol Side Chain. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (5), 1736–1746.

(2) Taber, D. F.; Neubert, T. D.; Rheingold, A. L. Synthesis of (–)-Morphine. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (42), 12416–12417.

(3) R. Boyd, D.; N. Sheldrake, G. The Dioxygenase-Catalysed Formation of Vicinal Cis-Diols. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15* (3), 309–324.

(4) Hudlicky, T.; Gonzalez, D.; Gibson, D. T. Enzymatic Dihydroxylation of Aromatics in Enantioselective Synthesis: Expanding Asymmetric Methodology. Aldrichim Acta 32: 35-62. *Aldrichimica Acta* **1999**, *32*, 35–62.

(5) Sharpless, K. B. Searching for New Reactivity (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41* (12), 2024–2032.

(6) Gibson, D. T.; Parales, R. E. Aromatic Hydrocarbon Dioxygenases in Environmental Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11* (3), 236–243.

(7) Gibson, D. T.; Koch, J. R.; Kallio, R. E. Oxidative Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Microorganisms. I. Enzymatic Formation of Catechol from Benzene. *Biochemistry* **1968**, *7* (7), 2653–2662.

(8) Díaz, E. Bacterial Degradation of Aromatic Pollutants: A Paradigm of Metabolic Versatility. *Int. Microbiol.* **2004**, *7* (3), 173–180.

(9) Buckland, B. C.; Drew, S. W.; Connors, N. C.; Chartrain, M. M.; Lee, C.; Salmon, P. M.; Gbewonyo, K.; Zhou, W.; Gailliot, P.; Singhvi, R.; et al. Microbial Conversion of Indene to Indandiol: A Key Intermediate in the Synthesis of CRIXIVAN. *Metab. Eng.* **1999**, *1* (1), 63–74.

(10) Ballard, D. G. H.; Courtis, A.; Shirley, I. M.; Taylor, S. C. A Biotech Route to Polyphenylene. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, No. 17, 954.

(11) Lingens, F.; Blecher, R.; Blecher, H.; Blobel, F.; Frohner, C.; Gorisch, H.;

Gorisch, H.; Layh, A. N. D. G. Bacterium That Degrades the Herbicide Chloridazon. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **1985**, *35* (1), 26–39.

(12) Reznicek, O.; Luesken, F.; Facey, S. J.; Hauer, B. Draft Genome Sequence of Phenylobacterium Immobile Strain E (DSM 1986), Isolated from Uncontaminated Soil in Ecuador. *Genome Announc.* **2015**, *3* (3).

(13) Mason, J. R.; Cammack, R. The Electron-Transport Proteins of Hydroxylating Bacterial Dioxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **1992**, *46*, 277–305.

(14) Capyk, J. K.; Eltis, L. D. Phylogenetic Analysis Reveals the Surprising Diversity of an Oxygenase Class. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17* (3), 425–436.

(15) Tarasev, M.; Kaddis, C. S.; Yin, S.; Loo, J. A.; Burgner, J.; Ballou, D. P. Similar Enzymes, Different Structures: Phthalate Dioxygenase Is an α3α3 Stacked Hexamer, Not an α3β3 Trimer like “normal” Rieske Oxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *466* (1), 31–39.

(16) Barry, S. M.; Challis, G. L. Mechanism and Catalytic Diversity of Rieske Non-Heme Iron-Dependent Oxygenases. *ACS Catal.* **2013**, *3* (10), 2362–2370.

(17) Ferraro, D. J.; Gakhar, L.; Ramaswamy, S. Rieske Business: Structure-Function of Rieske Non-Heme Oxygenases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338* (1), 175–190.

(18) Kauppi, B.; Lee, K.; Carredano, E.; Parales, R. E.; Gibson, D. T.; Eklund, H.; Ramaswamy, S. Structure of an Aromatic-Ring-Hydroxylating Dioxygenase – Naphthalene 1,2-Dioxygenase. *Structure* **1998**, *6* (5), 571–586.

(19) Parales, R. E.; Parales, J. V; Gibson, D. T. Aspartate 205 in the Catalytic Domain of Naphthalene Dioxygenase Is Essential for Activity. *J. Bacteriol.* **1999**, *181* (6), 1831–1837.

(20) Karlsson, A.; Parales, J. V; Parales, R. E.; Gibson, D. T.; Eklund, H.; Ramaswamy, S. Crystal Structure of Naphthalene Dioxygenase: Side-on Binding of Dioxygen to Iron. *Science* **2003**, *299* (5609), 1039–1042.

(21) Rivard, B. S.; Rogers, M. S.; Marell, D. J.; Neibergall, M. B.; Chakrabarty, S.; Cramer, C. J.; Lipscomb, J. D. Rate-Determining Attack on Substrate Precedes Rieske Cluster Oxidation during Cis-Dihydroxylation by Benzoate Dioxygenase.

Biochemistry **2015**, *54* (30), 4652–4664.

(22) Batie, C. J.; Ballou, D. P.; Correll, C. C. Phthalate Dioxygenase Reductase and Related Flavin-Iron-Sulfur Containing Electron Transferases. *Chem. Biochem. Flavoenzymes* **1991**, *3*, 543–556.

(23) Kweon, O.; Kim, S.-J.; Baek, S.; Chae, J.-C.; Adjei, M. D.; Baek, D.-H.; Kim, Y.-C.; Cerniglia, C. E. A New Classification System for Bacterial Rieske Non-Heme Iron Aromatic Ring-Hydroxylating Oxygenases. *BMC Biochem.* **2008**, *9* (1).

(24) Chakraborty, J.; Ghosal, D.; Dutta, A.; Dutta, T. K. An Insight into the Origin and Functional Evolution of Bacterial Aromatic Ring-Hydroxylating Oxygenases. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2012**, *30* (4), 419–436.

(25) Chakraborty, J.; Suzuki-Minakuchi, C.; Okada, K.; Nojiri, H. Thermophilic Bacteria Are Potential Sources of Novel Rieske Non-Heme Iron Oxygenases. *AMB Express* **2017**, *7* (1).

(26) Gray, J.; Wardzala, E.; Yang, M.; Reinbothe, S.; Haller, S.; Pauli, F. A Small Family of LLS1-Related Non-Heme Oxygenases in Plants with an Origin amongst Oxygenic Photosynthesizers. *Plant Mol. Biol.* **2004**, *54* (1), 39–54.

(27) Yoshiyama-Yanagawa, T.; Enya, S.; Shimada-Niwa, Y.; Yaguchi, S.; Haramoto, Y.; Matsuya, T.; Shiomi, K.; Sasakura, Y.; Takahashi, S.; Asashima, M.; et al. The Conserved Rieske Oxygenase DAF-36/Neverland Is a Novel Cholesterol-Metabolizing Enzyme. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (29), 25756–25762.

(28) Harwood, C. S.; Parales, R. E. The Beta-Ketoadipate Pathway and the Biology of Self-Identity. *Annu. Rev. Microbiol.* **1996**, *50* (1), 553–590.

(29) Boyd, D. R.; Bugg, T. D. H. Arene Cis-Dihydrodiol Formation: From Biology to Application. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (2), 181–192.

(30) Broderick, J. B. Catechol Dioxygenases. *Essays Biochem.* **1999**, *34*, 173–189.

(31) Siegbahn, P. E. M.; Haeffner, F. Mechanism for Catechol Ring-Cleavage by Non-Heme Iron Extradiol Dioxygenases. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (29), 8919–8932.

(32) George, K. W.; Hay, A. G. Bacterial Strategies for Growth on Aromatic

Compounds. *Adv. Appl. Microbiol.* **2011**, *74*, 1–33.

(33) Eaton, R. W.; Chapman, P. J. Bacterial Metabolism of Naphthalene: Construction and Use of Recombinant Bacteria to Study Ring Cleavage of 1,2-Dihydroxynaphthalene and Subsequent Reactions. *J. Bacteriol.* **1992**, *174* (23), 7542–7554.

(34) Peng, R.-H.; Xiong, A.-S.; Xue, Y.; Fu, X.-Y.; Gao, F.; Zhao, W.; Tian, Y.-S.; Yao, Q.-H. Microbial Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32* (6), 927–955.

(35) van der Meer, J. R.; de Vos, W. M.; Harayama, S.; Zehnder, A. J. Molecular Mechanisms of Genetic Adaptation to Xenobiotic Compounds. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56* (4), 677–694.

(36) Wyndham, R. C.; Cashore, A. E.; Nakatsu, C. H.; Peel, M. C. Catabolic Transposons. *Biodegradation* **1994**, *5* (3-4), 323–342.

(37) Tsuda, M.; Tan, H. M.; Nishi, A.; Furukawa, K. Mobile Catabolic Genes in Bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *87* (4), 401–410.

(38) Fukumori, F.; Saint, C. P. Nucleotide Sequences and Regulational Analysis of Genes Involved in Conversion of Aniline to Catechol in Pseudomonas Putida UCC22(pTDN1). *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (2), 399–408.

(39) Burlage, R. S.; Hooper, S. W.; Sayler, G. S. The TOL (pWW0) Catabolic Plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55* (6), 1323–1328.

(40) Tsuda, M.; Iino, T. Identification and Characterization of Tn4653, a Transposon Covering the Toluene Transposon Tn4651 on TOL Plasmid pWW0. *MGG Mol. Gen. Genet.* **1988**, *213* (1), 72–77.

(41) Tsuda, M.; Minegishi, K.; Iino, T. Toluene Transposons Tn4651 and Tn4653 Are Class II Transposons. *J. Bacteriol.* **1989**, *171* (3), 1386–1393.

(42) Pemberton, J. M.; Schmidt, R. Catabolic Plasmids. In *Encyclopedia of Life Sciences*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2001.

(43) Smillie, C.; Garcillán-Barcia, M. P.; Francia, M. V.; Rocha, E. P. C.; de la Cruz, F. Mobility of Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74* (3), 434–452.

(44) Zatyka, M.; Thomas, C. M. Control of Genes for Conjugative Transfer of Plasmids and Other Mobile Elements. *FEMS Microbiol. Rev.* **1998**, *21* (4), 291–319.

(45) Jain, A.; Srivastava, P. Broad Host Range Plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *348* (2), 87–96.

(46) Dejonghe, W.; Goris, J.; El Fantroussi, S.; Höfte, M.; De Vos, P.; Verstraete, W.; Top, E. M. Effect of Dissemination of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) Degradation Plasmids on 2,4-D Degradation and on Bacterial Community Structure in Two Different Soil Horizons. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66* (8), 3297–3304.

(47) Williams, P. A. Catabolic Plasmids. *Trends Biochem. Sci.* **1981**, *6*, 23–26.

(48) Döbler, C.; Mehltretter, G.; Beller, M. Atom-Efficient Oxidation of Alkenes with Molecular Oxygen: Synthesis of Diols. *Angew. Chemie Int. Ed.* **1999**, *38* (20), 3026–3028.

(49) Rudloff, E. von. Synthesis of Some Hexandiols. *Can. J. Chem.* **1958**, *36* (3), 486–491.

(50) Savakis, P. E.; Angermayr, S. A.; Hellingwerf, K. J. Synthesis of 2,3-Butanediol by Synechocystis Sp. PCC6803 via Heterologous Expression of a Catabolic Pathway from Lactic Acid- and Enterobacteria. *Metab. Eng.* **2013**, *20*, 121–130.

(51) Hentges, S. G.; Sharpless, K. B. Asymmetric Induction in the Reaction of Osmium Tetroxide with Olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (12), 4263–4265.

(52) Chang, D.; Zhang, J.; Witholt, B.; Li, Z. Chemical and Enzymatic Synthetic Methods for Asymmetric Oxidation of the C–C Double Bond. *Biocatal. Biotransformation* **2004**, *22* (2), 113–131.

(53) Junttila, M. H.; Hormi, O. O. E. Methanesulfonamide: A Cosolvent and a General Acid Catalyst in Sharpless Asymmetric Dihydroxylations. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (8), 3038–3047.

(54) Griffith, W. .; Skapski, A. .; Woode, K. .; Wright, M. . Partial Coordination in Amine Adducts of Osmium Tetraoxide: X-Ray Molecular Structure of Quinuclidinetetraoxo-osmium(VIII). *Inorganica Chim. Acta* **1978**, *31* (1), 413–

414.

(55) Sharpless, K. B.; Amberg, W.; Bennani, Y. L.; Crispino, G. A.; Hartung, J.; Jeong, K. S.; Kwong, H. L.; Morikawa, K.; Wang, Z. M. The Osmium-Catalyzed Asymmetric Dihydroxylation: A New Ligand Class and a Process Improvement. *J. Org. Chem.* **1992**, *57* (10), 2768–2771.

(56) Deubel, D. V.; Frenking, G. [3+2] versus [2+2] Addition of Metal Oxides Across CC Bonds. Reconciliation of Experiment and Theory. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36* (9), 645–651.

(57) Xu, D.; Crispino, G. A.; Sharpless, K. B. Selective Asymmetric Dihydroxylation (AD) of Dienes. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (19), 7570–7571.

(58) Lee, H. M.; Nieto-Oberhuber, C.; Shair, M. D. Enantioselective Synthesis of (+)-Cortistatin A, a Potent and Selective Inhibitor of Endothelial Cell Proliferation. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (50), 16864–16866.

(59) Yamaguchi, J.; Hayashi, Y. Syntheses of Fumagillin and Ovalicin. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (13), 3884–3901.

(60) Herzon, S. B.; Lu, L.; Woo, C. M.; Gholap, S. L. 11-Step Enantioselective Synthesis of (–)-Lomaiviticin Aglycon. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (19), 7260–7263.

(61) Smaltz, D. J.; Myers, A. G. Scalable Synthesis of Enantiomerically Pure *syn* -2,3-Dihydroxybutyrate by Sharpless Asymmetric Dihydroxylation of *p* -Phenylbenzyl Crotonate. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (20), 8554–8559.

(62) Smaltz, D. J.; Švenda, J.; Myers, A. G. Diastereoselective Additions of Allylmetal Reagents to Free and Protected Syn-α,β-Dihydroxyketones Enable Efficient Synthetic Routes to Methyl Trioxacarcinoside A. *Org. Lett.* **2012**, *14* (7), 1812–1815.

(63) Hartwig, A. *DFG - Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe - Toxikologisch-Arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten Und Einstufungen*; Wiley-VCH, 2018.

(64) Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. Catalytic Asymmetric Dihydroxylation. *Chem. Rev.* **1994**, *94* (8), 2483–2547.

(65) Skvortsov, T.; Hoering, P.; Arkhipova, K.; Whitehead, R. C.; Boyd, D. R.; Allen, C. C. R. Draft Genome Sequences of Pseudomonas Putida UV4 and UV4/95, Toluene Dioxygenase-Expressing Producers of Cis-1,2-Dihydrodiols. *Genome Announc.* **2018**, *6* (1).

(66) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Llamas, N. M.; Malone, J. F.; O'Dowd, C. R.; Allen, C. C. R. Chemoenzymatic Synthesis of Carbasugars from Iodobenzene. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3* (10), 1953.

(67) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Byrne, B.; Hand, M. V.; Malone, J. F.; Sheldrake, G. N.; Blacker, J.; Dalton, H. Enzymatic and Chemoenzymatic Synthesis and Stereochemical Assignment of Cis-Dihydrodiol Derivatives of Monosubstituted Benzenes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, No. 12, 1935–1944.

(68) Ballard, D. G. H.; Courtis, A.; Shirley, I. M.; Taylor, S. C. Synthesis of Polyphenylene from a Cis-Dihydrocatechol Biologically Produced Monomer. *Macromolecules* **1988**, *21* (2), 294–304.

(69) Ley, S. V; Sternfeld, F.; Taylor, S. Microbial Oxidation in Synthesis: A Six Step Perparation of (+)-Pinitol from Benzene. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28* (2), 225–226.

(70) Ley, S. V.; Sternfeld, F. Microbial Oxidation in Synthesis: Preparation of (+)- and (–)-Pinitol from Benzene. *Tetrahedron* **1989**, *45* (11), 3463–3476.

(71) Kang, M.-J.; Kim, J.-I.; Yoon, S.-Y.; Kim, J. C.; Cha, I.-J. Pinitol from Soybeans Reduces Postprandial Blood Glucose in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Med. Food* **2006**, *9* (2), 182–186.

(72) Lee, E.; Lim, Y.; Kwon, S. W.; Kwon, O. Pinitol Consumption Improves Liver Health Status by Reducing Oxidative Stress and Fatty Acid Accumulation in Subjects with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J. Nutr. Biochem.* **2019**, *68*, 33–41.

(73) Dreyer, D. L.; Binder, R. G.; Chan, B. G.; Waiss, A. C.; Hartwig, E. E.; Beland, G. L. Pinitol, a Larval Growth Inhibitor forHeliothis Zea in Soybeans. *Experientia* **1979**, *35* (9), 1182–1183.

(74) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Kaik, M.; McIntyre, P. B. A.; Stevenson, P. J.; Allen,

C. C. R. Chemoenzymatic Formal Synthesis of (–)- and (+)-Epibatidine. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (14), 2774.

(75) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Bowers, N. I.; Coen, G. B.; Malone, J. F.; O'Dowd, C. R.; Stevenson, P. J.; Allen, C. C. R. Chemoenzymatic Synthesis of the Carbasugars Carba-β-L-Galactopyranose, Carba-β-L-Talopyranose and Carba-α-L-Talopyranose from Methyl Benzoate. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (6), 1415.

(76) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Acaru, C. A.; Malone, J. F.; O'Dowd, C. R.; Allen, C. C. R.; Stevenson, P. J. Chemoenzymatic Synthesis of Carbasugars (+)-Pericosines A–C from Diverse Aromatic *cis* -Dihydrodiol Precursors. *Org. Lett.* **2010**, *12* (10), 2206–2209.

(77) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Sbircea, L.; Murphy, D.; Belhocine, T.; Malone, J. F.; James, S. L.; Allen, C. C. R.; Hamilton, J. T. G. Azaarene Cis-Dihydrodiol-Derived 2,2′-Bipyridine Ligands for Asymmetric Allylic Oxidation and Cyclopropanation. *Chem. Commun.* **2008**, No. 43, 5535–5537.

(78) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Sbircea, L.; Murphy, D.; Malone, J. F.; James, S. L.; Allen, C. C. R.; Hamilton, J. T. G. Chemoenzymatic Synthesis of Chiral 2,2′-Bipyridine Ligands and Their N-Oxide Derivatives: Applications in the Asymmetric Aminolysis of Epoxides and Asymmetric Allylation of Aldehydes. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (5), 1081–1090.

(79) Sbircea, L.; Sharma, N. D.; Clegg, W.; Harrington, R. W.; Horton, P. N.; Hursthouse, M. B.; Apperley, D. C.; Boyd, D. R.; James, S. L. Chemoenzymatic Synthesis of Chiral 4,4′-Bipyridyls and Their Metal–organic Frameworks. *Chem. Commun.* **2008**, No. 43, 5538–5540.

(80) Omori, A.; Finn, K.; Leisch, H.; Carroll, R.; Hudlicky, T. Chemoenzymatic Total Synthesis of (+)-Codeine by Sequential Intramolecular Heck Cyclizations via C-B-D Ring Construction. *Synlett* **2007**, *2007* (18), 2859–2862.

(81) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Kaik, M.; McIntyre, P. B. A.; Stevenson, P. J.; Allen, C. C. R. Chemoenzymatic Formal Synthesis of (–)- and (+)-Epibatidine. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (14), 2774–2779.

(82) Chartrain, M.; Jackey, B. A.; Heimbuch, B.; Taylor, C. S. Conversion of Indene

to (1S)-Amino-(2R)-Indanol Free of Any Steroisomer by Combination of Fermentation of Rhodococcus Sp. ATCC 55805 and Chemical Steps. Patent 5871981, August 12, 1997.

(83) Jo, J. H.; Choi, G.-M.; Lee, S.-Y.; Im, W.-T. Phenylobacterium Aquaticum Sp. Nov., Isolated from the Reservoir of a Water Purifier. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66* (9), 3519–3523.

(84) Khan, I. U.; Hussain, F.; Habib, N.; Wadaan, M. A. M.; Ahmed, I.; Im, W.-T.; Hozzein, W. N.; Zhi, X.-Y.; Li, W.-J. Phenylobacterium Deserti Sp. Nov., Isolated from Desert Soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2017**, *67* (11), 4722–4727.

(85) Abraham, W.-R.; Macedo, A. J.; Lünsdorf, H.; Fischer, R.; Pawelczyk, S.; Smit, J.; Vancanneyt, M. Phylogeny by a Polyphasic Approach of the Order Caulobacterales, Proposal of Caulobacter Mirabilis Sp. Nov., Phenylobacterium Haematophilum Sp. Nov. and Phenylobacterium Conjunctum Sp. Nov., and Emendation of the Genus Phenylobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58* (8), 1939–1949.

(86) Tiago, I.; Mendes, V.; Pires, C.; Morais, P. V.; Veríssimo, A. Phenylobacterium Falsum Sp. Nov., an Alphaproteobacterium Isolated from a Nonsaline Alkaline Groundwater, and Emended Description of the Genus Phenylobacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* **2005**, *28*, 295–302.

(87) Drescher, N.; Otto, S. Über Den Abbau von 1-Pheny1-4-Amino-5-Chlor-Pyridazon-6 (Pyrazon) Im Boden. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **1969**, *76*, 27–33.

(88) Frank, R.; Switzer, C. M. Behavior of Pyrazon in Soil. *Weed Sci.* **1969**, *17* (3), 323–326.

(89) Engvild, K. C.; Jensen, H. L. Microbiological Decomposition of the Herbicide Pyrazon. *Soil Biol. Biochem.* **1969**, *1* (4), 295–300.

(90) Fröhner, C.; Oltmanns, O.; Lingens, F. Isolierung Und Charakterisierung Pyrazon-Abbauender Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **1970**, *74* (1), 82–89.

(91) Kaiser, A.; Classen, H. G.; Eberspächer, J.; Lingens, F. Acute Toxicity Testing of Some Herbicides-, Alkaloids-, and Antibiotics-Metabolizing Soil Bacteria in the

Rat. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. B.* **1981**, *173* (3-4), 173–179.

(92) Wegst, W. Über Den Abbau von Phenylcarbonsäuren in Chloridazonabbauenden Bakterien, Universität Hohenheim, 1981.

(93) Dworkin, M.; Falkow, S. *The Prokaryotes : A Handbook on the Biology of Bacteria*; Springer, 2006.

(94) Sauber, K.; Fröhner, C.; Rosenberg, G.; Eberspächer, J.; Lingens, F. Purification and Properties of Pyrazon Dioxygenase from Pyrazon-Degrading Bacteria. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *74* (1), 89–97.

(95) Eberspächer, J.; Lingens, F. Reinigung Und Eigenschaften von Zwei Chloridazondihydrodiol-Dehydrogenasen Aus Chloridazon-Abbauenden Bakterien. *Hoppe-Seyler´s Zeitschrift für Physiol. Chemie* **1978**, *359* (2), 1323–1334.

(96) KELLER, E.; EBERSPÄCHER, J.; LINGENS, F. Darstellung Eines Chloridazon-Metaboliten Mit Hilfe Immobilisierter Chloridazondihydrodiol-Dehydrogenase. Einige Eigenschaften Des Immobilisierten Enzyms. *Hoppe-Seyler´s Zeitschrift für Physiol. Chemie* **1979**, *360* (1), 19–26.

(97) Müller, R.; Haug, S.; Eberspächer, J.; Lingens, F. Catechol-2,3-Dioxygenase Aus Pyrazon-Abbauenden Bakterien. *Hoppe-Seyler´s Zeitschrift für Physiol. Chemie* **1977**, *358* (2), 797–806.

(98) Müller, R.; Schmitt, S.; Lingens, F. A Novel Non-Heme Iron-Containing Dioxygenase. Chloridazon-Catechol Dioxygenase from Phenylobacterium Immobilis DSM 1986. *Eur. J. Biochem.* **1982**, *125* (3), 579–584.

(99) Schmitt, S.; Müller, R.; Wegst, W.; Lingens, F. Chloridazon-Catechol Dioxygenases, a Distinct Group of Meta-Cleaving Enzymes. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **1984**, *365* (2), 143–150.

(100) Schmitt, S.; Müller, R.; Lingens, F. One-Step Purification of Chloridazon-Catechol Dioxygenase by Immunoaffinity Chromatography on Thiol-Sepharose Bound IgG. *J. Immunol. Methods* **1984**, *68*, 263–267.

(101) Müller, R.; Lingens, F. Enzymatische Bildung Und Isolierung von 2-Hydroxymuconsäure, Ein Metabolit Im Bakteriellen Abbau Des Herbizids

Chloridazon Enzymatic Formation and Isolation of 2-Hydroxymuconic Acid, a Metabolit in the Bacterial Degradation of the Herbicide Chloridazon. *Z. Naturforsch* **1980**, *35*, 346–347.

(102) Sauber, K.; Müller, R.; Keller, E.; Eberspächer, J.; Lingens, F. Abbau von Antipyrin Durch Pyrazon-Abbauende Bakterien Degradation of Antipyrin by Pyrazon-Degrading Bacteria. *Z. Naturforsch* **1977**, *32*, 557–562.

(103) Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (5), 850–858.

(104) Olsen, J. V.; de Godoy, L. M. F.; Li, G.; Macek, B.; Mortensen, P.; Pesch, R.; Makarov, A.; Lange, O.; Horning, S.; Mann, M. Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-Trap. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4* (12), 2010–2021.

(105) Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I.; Belfrage, G. Metal Chelate Affinity Chromatography, a New Approach to Protein Fractionation. *Nature* **1975**, *258* (5536), 598–599.

(106) Rosenberg, G. Untersuchungen Zur Anreicherung Und Struktur Des Chloridazon-Dioxygenase-Systems, Universität Hohenheim, 1982.

(107) Reznicek, O. Metabolismus Nicht-Physiologischer Substrate in Mikroorganismen, Universität Stuttgart, 2015.

(108) Potoudis, E. C. S. Heterologous Expression of Dioxygenases from Phenylobacterium Immobile E, Universität Stuttgart, 2018.

(109) Klenk, J. Identifikation Und Charakterisierung Neuer Biokatalysatoren Für Die C-H-Oxyfunktionalisierung, Universität Stuttgart, 2018.

(110) Gally, C. Enzymatic Asymmetric Dihydroxylation of Alkenes, Universität Stuttgart, 2016.

(111) Halder, J. Naphthalen Dioxygenase Aus Pseudomonas Sp. NCIB 9816-4: Systematische Analyse Der Aktiven Tasche, Unversität Stuttgart, 2017.

(112) Vidali, M. Bioremediation. An Overview. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73* (7), 1163–

1172.

(113) Colleran, E. Uses of Bacteria in Bioremediation. In *Bioremediation Protocols*; Humana Press: New Jersey, 1997; pp 3–22.

(114) Urbanek, A. K.; Rymowicz, W.; Mirończuk, A. M. Degradation of Plastics and Plastic-Degrading Bacteria in Cold Marine Habitats. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102* (18), 7669–7678.

(115) Phulpoto, A. H.; Qazi, M. A.; Mangi, S.; Ahmed, S.; Kanhar, N. A. Biodegradation of Oil-Based Paint by Bacillus Species Monocultures Isolated from the Paint Warehouses. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **2016**, *13* (1), 125–134.

(116) Seo, J.-S.; Keum, Y.-S.; Li, Q. X. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2009**, *6* (1), 278–309.

(117) Jiang, H.; Parales, R. E.; Gibson, D. T. The Alpha Subunit of Toluene Dioxygenase from Pseudomonas Putida F1 Can Accept Electrons from Reduced FerredoxinTOL but Is Catalytically Inactive in the Absence of the Beta Subunit. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65* (1), 315–318.

(118) Hurtubise, Y.; Barriault, D.; Sylvestre, M. Characterization of Active Recombinant His-Tagged Oxygenase Component of Comamonas Testosteroni B-356 Biphenyl Dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (14), 8152–8156.

(119) Geary, P. J.; Mason, J. R.; Joannou, C. L. Benzene Dioxygenase from Pseudomonas Putida ML2 (NCIB 12190). *Methods Enzymol.* **1990**, *188*, 52–60.

(120) Dagley, S.; Chapman, P. J.; Gibson, D. T. The Metabolism of Beta-Phenylpropionic Acid by an Achromobacter. *Biochem. J.* **1965**, *97* (3), 643–650.

(121) Keil, H.; Tittmann, U.; Lingens, F. Degradation of Aromatic Carboxylic Acids by Acinetobacter. *Syst. Appl. Microbiol.* **1983**, *4* (3), 313–325.

(122) Burlingame, R.; Chapman, P. J. Catabolism of Phenylpropionic Acid and Its 3-Hydroxy Derivative by Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* **1983**, *155* (1), 113–121.

(123) Burlingame, R. P.; Wyman, L.; Chapman, P. J. Isolation and Characterization of Escherichia Coli Mutants Defective for Phenylpropionate Degradation. *J. Bacteriol.* **1986**, *168* (1), 55–64.

(124) Bugg, T. D. Overproduction, Purification and Properties of 2,3-Dihydroxyphenylpropionate 1,2-Dioxygenase from Escherichia Coli. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1202* (2), 258–264.

(125) Cooper, R. A.; Skinner, M. A. Catabolism of 3- and 4-Hydroxyphenylacetate by the 3,4-Dihydroxyphenylacetate Pathway in Escherichia Coli. *J. Bacteriol.* **1980**, *143* (1), 302–306.

(126) Goldin, B. R.; Peppercorn, M. A.; Goldman, P. Contributions of Host and Intestinal Microflora in the Metabolism of L-Dopa by the Rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1973**, *186* (1), 160–166.

(127) Borud, O.; Midtvedt, T.; Gjessing, L. R. Phenolic Metabolites in Urine and Faeces from Rats Given Radioactive 14C-L-DOPA. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* **2009**, *33* (4), 308–316.

(128) Peppercorn, M. A.; Goldman, P. Caffeic Acid Metabolism by Bacteria of the Human Gastrointestinal Tract. *J. Bacteriol.* **1971**, *108* (3), 996–1000.

(129) Pollitt, R. J. Phenylpropionic Acid in the Urine of Patients with Phenylketonuria and Normals. *Clin. Chim. Acta.* **1974**, *55* (3), 317–322.

(130) Martinez, K. B.; Mackert, J. D.; McIntosh, M. K. Polyphenols and Intestinal Health. In *Nutrition and Functional Foods for Healthy Aging*; Academic Press, 2017; pp 191–210.

(131) Dzhavakhiya, V. G.; Ozeretskovskaya, O. L.; Zinovyeva, S. V. Immune Response. In *Comprehensive and Molecular Phytopathology*; Elsevier, 2007; pp 265–314.

(132) Iriti, M.; Faoro, F. Bioactive Chemicals and Health Benefits of Grapevine Products. *Bioact. Foods Promot. Heal.* **2010**, 581–620.

(133) Alber, A.; Ehlting, J. Cytochrome P450s in Lignin Biosynthesis. *Adv. Bot. Res.* **2012**, *61*, 113–143.

(134) Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. L IGNIN B IOSYNTHESIS. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, *54* (1), 519–546.

(135) Hatakka, A. Lignin-Modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi:

Production and Role from in Lignin Degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **1994**, *13* (2-3), 125–135.

(136) Wagner, A. O.; Prem, E. M.; Markt, R.; Kaufmann, R.; Illmer, P. Formation of Phenylacetic Acid and Phenylpropionic Acid under Different Overload Conditions during Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Digestion. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 26.

(137) Colberg, P. J.; Young, L. Y. Aromatic and Volatile Acid Intermediates Observed during Anaerobic Metabolism of Lignin-Derived Oligomers. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *49* (2), 350–358.

(138) Li, J.; Yuan, H.; Yang, J. Bacteria and Lignin Degradation. *Front. Biol. China* **2009**, *4* (1), 29–38.

(139) Holt, D. M.; Jones, E. B. Bacterial Degradation of Lignified Wood Cell Walls in Anaerobic Aquatic Habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *46* (3), 722–727.

(140) Phelan, M. B.; Crawford, D. L.; Pometto, A. L. Isolation of Lignocellulose-Decomposing Actinomycetes and Degradation of Specifically 14C-Labeled Lignocelluloses by Six Selected Streptomyces Strains. *Can. J. Microbiol.* **1979**, *25* (11), 1270–1276.

(141) Kerr, T. J.; Kerr, R. D.; Benner, R. Isolation of a Bacterium Capable of Degrading Peanut Hull Lignin. *Appl. Environ. Microbiol.* **1983**, *46* (5), 1201–1206.

(142) Kaplan, D. L.; Hartenstein, R. Decomposition of Lignins by Microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **1980**, *12* (1), 65–75.

(143) van Bloois, E.; Torres Pazmiño, D. E.; Winter, R. T.; Fraaije, M. W. A Robust and Extracellular Heme-Containing Peroxidase from Thermobifida Fusca as Prototype of a Bacterial Peroxidase Superfamily. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86* (5), 1419–1430.

(144) de Gonzalo, G.; Colpa, D. I.; Habib, M. H. M.; Fraaije, M. W. Bacterial Enzymes Involved in Lignin Degradation. *J. Biotechnol.* **2016**, *236*, 110–119.

(145) Sato, Y.; Moriuchi, H.; Hishiyama, S.; Otsuka, Y.; Oshima, K.; Kasai, D.; Nakamura, M.; Ohara, S.; Katayama, Y.; Fukuda, M.; et al. Identification of Three Alcohol Dehydrogenase Genes Involved in the Stereospecific Catabolism of

Arylglycerol-Beta-Aryl Ether by Sphingobium Sp. Strain SYK-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75* (16), 5195–5201.

(146) Brown, M. E.; Walker, M. C.; Nakashige, T. G.; Iavarone, A. T.; Chang, M. C. Y. Discovery and Characterization of Heme Enzymes from Unsequenced Bacteria: Application to Microbial Lignin Degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (45), 18006–18009.

(147) Kamoda, S.; Saburi, Y. Structural and Enzymatical Comparison of Lignostilbene-*α,β* -Dioxygenase Isozymes, I, II, and III, from *Pseudomonas Paucimobilis* TMY1009. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57* (6), 931–934.

(148) Watanabe, F.; Bito, T. Vitamin B $_{12}$ Sources and Microbial Interaction. *Exp. Biol. Med.* **2018**, *243* (2), 148–158.

(149) Croft, M. T.; Lawrence, A. D.; Raux-Deery, E.; Warren, M. J.; Smith, A. G. Algae Acquire Vitamin B12 through a Symbiotic Relationship with Bacteria. *Nature* **2005**, *438* (7064), 90–93.

(150) Takano, H.; Hagiwara, K.; Ueda, K. Fundamental Role of Cobalamin Biosynthesis in the Developmental Growth of Streptomyces Coelicolor A3 (2). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (5), 2329–2337.

(151) Majumdar, S.; Lukk, T.; Solbiati, J. O.; Bauer, S.; Nair, S. K.; Cronan, J. E.; Gerlt, J. A. Roles of Small Laccases from *Streptomyces* in Lignin Degradation. *Biochemistry* **2014**, *53* (24), 4047–4058.

(152) Robinson, L. E.; Crawford, R. L. Degradation of ^{14} C-Labeled Lignins by *Bacillus Megaterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1978**, *4* (5), 301–302.

(153) Vary, P. S.; Biedendieck, R.; Fuerch, T.; Meinhardt, F.; Rohde, M.; Deckwer, W.-D.; Jahn, D. Bacillus Megaterium—from Simple Soil Bacterium to Industrial Protein Production Host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76* (5), 957–967.

(154) Biedendieck, R.; Malten, M.; Barg, H.; Bunk, B.; Martens, J.-H.; Deery, E.; Leech, H.; Warren, M. J.; Jahn, D. Metabolic Engineering of Cobalamin (vitamin B12) Production in Bacillus Megaterium. *Microb. Biotechnol.* **2010**, *3* (1), 24–37.

(155) Werlen, C.; Kohler, H. P.; van der Meer, J. R. The Broad Substrate Chlorobenzene Dioxygenase and Cis-Chlorobenzene Dihydrodiol

Dehydrogenase of Pseudomonas Sp. Strain P51 Are Linked Evolutionarily to the Enzymes for Benzene and Toluene Degradation. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (8), 4009–4016.

(156) Nam, J.-W.; Nojiri, H.; Yoshida, T.; Habe, H.; Yamane, H.; Omori, T. New Classification System for Oxygenase Components Involved in Ring-Hydroxylating Oxygenations. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65* (2), 254–263.

(157) Taira, K.; Hirose, J.; Hayashida, S.; Furukawa, K. Analysis of Bph Operon from the Polychlorinated Biphenyl-Degrading Strain of Pseudomonas Pseudoalcaligenes KF707. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (7), 4844–4853.

(158) Zylstra, G. J.; Gibson, D. T. Toluene Degradation by Pseudomonas Putida F1. Nucleotide Sequence of the todC1C2BADE Genes and Their Expression in Escherichia Coli. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (25), 14940–14946.

(159) Kim, D.; Chae, J.-C.; Zylstra, G. J.; Kim, Y.-S.; Kim, S.-K.; Nam, M. H.; Kim, Y. M.; Kim, E. Identification of a Novel Dioxygenase Involved in Metabolism of O-Xylene, Toluene, and Ethylbenzene by Rhodococcus Sp. Strain DK17. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70* (12), 7086–7092.

(160) Kweon, O.; Kim, S.-J.; Freeman, J. P.; Song, J.; Baek, S.; Cerniglia, C. E. Substrate Specificity and Structural Characteristics of the Novel Rieske Nonheme Iron Aromatic Ring-Hydroxylating Oxygenases NidAB and NidA3B3 from Mycobacterium Vanbaalenii PYR-1. *MBio* **2010**, *1* (2).

(161) Stingley, R. L.; Brezna, B.; Khan, A. A.; Cerniglia, C. E. Novel Organization of Genes in a Phthalate Degradation Operon of Mycobacterium Vanbaalenii PYR-1. *Microbiology* **2004**, *150* (11), 3749–3761.

(162) Khara, P.; Roy, M.; Chakraborty, J.; Ghosal, D.; Dutta, T. K. Functional Characterization of Diverse Ring-Hydroxylating Oxygenases and Induction of Complex Aromatic Catabolic Gene Clusters in Sphingobium Sp. PNB. *FEBS Open Bio* **2014**, *4*, 290–300.

(163) Armengaud, J.; Gaillard, J.; Timmis, K. N. A Second [2Fe-2S] Ferredoxin from Sphingomonas Sp. Strain RW1 Can Function as an Electron Donor for the Dioxin

Dioxygenase. *J. Bacteriol.* **2000**, *182* (8), 2238–2244.

(164) Zhou, N.-Y.; Al-Dulayymi, J.; Baird, M. S.; Williams, P. A. Salicylate 5-Hydroxylase from Ralstonia Sp. Strain U2: A Monooxygenase with Close Relationships to and Shared Electron Transport Proteins with Naphthalene Dioxygenase. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (6), 1547–1555.

(165) Urata, M.; Uchimura, H.; Noguchi, H.; Sakaguchi, T.; Takemura, T.; Eto, K.; Habe, H.; Omori, T.; Yamane, H.; Nojiri, H. Plasmid pCAR3 Contains Multiple Gene Sets Involved in the Conversion of Carbazole to Anthranilate. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (5), 3198–3205.

(166) Locher, H. H.; Leisinger, T.; Cook, A. M. 4-Toluene Sulfonate Methyl-Monooxygenase from Comamonas Testosteroni T-2: Purification and Some Properties of the Oxygenase Component. *J. Bacteriol.* **1991**, *173* (12), 3741–3748.

(167) Chakraborty, J.; Dutta, T. K. From Lipid Transport to Oxygenation of Aromatic Compounds: Evolution within the Bet v1-like Superfamily. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2011**, *29* (1), 67–78.

(168) Urlacher, V. B.; Schmid, R. D. Recent Advances in Oxygenase-Catalyzed Biotransformations. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10* (2), 156–161.

(169) Escalante, D. E.; Aukema, K. G.; Wackett, L. P.; Aksan, A. Simulation of the Bottleneck Controlling Access into a Rieske Active Site: Predicting Substrates of Naphthalene 1,2-Dioxygenase. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57* (3), 550–561.

(170) Lutz, S.; Bornscheuer, U. T. *Protein Engineering Handbook*; 2012.

(171) Fischer, E. Einfluss Der Configuration Auf Die Wirkung Der Enzyme. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1894**, *27* (3), 2985–2993.

(172) Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1958**, *44* (2), 98–104.

(173) Pravda, L.; Berka, K.; Svobodová Vařeková, R.; Sehnal, D.; Banáš, P.; Laskowski, R. A.; Koča, J.; Otyepka, M. Anatomy of Enzyme Channels. *BMC Bioinformatics* **2014**, *15* (1), 379.

(174) Dang, T.; Prestwich, G. D. Site-Directed Mutagenesis of Squalene-Hopene Cyclase: Altered Substrate Specificity and Product Distribution. *Chem. Biol.* **2000**, *7* (8), 643–649.

(175) Smith, G.; Modi, S.; Pillai, I.; Lian, L.-Y.; Sutcliffe, M. J.; Pritchard, M. P.; Friedberg, T.; Roberts, G. C. K.; Wolf C. Roland. Determinants of the Substrate Specificity of Human Cytochrome P-450 CYP2D6: Design and Construction of a Mutant with Testosterone Hydroxylase Activity. *Biochem. J.* **1998**, *331* (3), 783–792.

(176) Matsuzaki, R.; Tanizawa, K. Exploring a Channel to the Active Site of Copper/Topaquinone-Containing Phenylethylamine Oxidase by Chemical Modification and Site-Specific Mutagenesis †. *Biochemistry* **1998**, *37* (40), 13947–13957.

(177) Koudelakova, T.; Chaloupkova, R.; Brezovsky, J.; Prokop, Z.; Sebestova, E.; Hesseler, M.; Khabiri, M.; Plevaka, M.; Kulik, D.; Kuta Smatanova, I.; et al. Engineering Enzyme Stability and Resistance to an Organic Cosolvent by Modification of Residues in the Access Tunnel. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52* (7), 1959–1963.

(178) Reich, S.; Kress, N.; Nestl, B. M.; Hauer, B. Variations in the Stability of NCR Ene Reductase by Rational Enzyme Loop Modulation. *J. Struct. Biol.* **2014**, *185* (2), 228–233.

(179) Nestl, B. M.; Hauer, B. Engineering of Flexible Loops in Enzymes. *ACS Catal.* **2014**, *4* (9), 3201–3211.

(180) Murphy, P. M.; Bolduc, J. M.; Gallaher, J. L.; Stoddard, B. L.; Baker, D. Alteration of Enzyme Specificity by Computational Loop Remodeling and Design. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (23), 9215–9220.

(181) De Luca, F.; Benvenuti, M.; Carboni, F.; Pozzi, C.; Rossolini, G. M.; Mangani, S.; Docquier, J.-D. Evolution to Carbapenem-Hydrolyzing Activity in Noncarbapenemase Class D β-Lactamase OXA-10 by Rational Protein Design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (45), 18424–18429.

(182) Bastian, S.; Liu, X.; Meyerowitz, J. T.; Snow, C. D.; Chen, M. M. Y.; Arnold, F.

H. Engineered Ketol-Acid Reductoisomerase and Alcohol Dehydrogenase Enable Anaerobic 2-Methylpropan-1-Ol Production at Theoretical Yield in Escherichia Coli. *Metab. Eng.* **2011**, *13* (3), 345–352.

(183) Panchenko, A. R.; Madej, T. Structural Similarity of Loops in Protein Families: Toward the Understanding of Protein Evolution. *BMC Evol. Biol.* **2005**, *5* (1), 10.

(184) Nojiri, H.; Shintani, M.; Omori, T. Divergence of Mobile Genetic Elements Involved in the Distribution of Xenobiotic-Catabolic Capacity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *64* (2), 154–174.

(185) Arber, W. Genetic Variation: Molecular Mechanisms and Impact on Microbial Evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**, *24* (1), 1–7.

(186) Kreis, M.; Eberspächer, J.; Lingens, F. Detection and Characterization of Plasmids in Chloridazon and Antipyrin Degrading Bacteria. *Zentralblatt für Bakteriol. Mikrobiol. und Hyg. I. Abt. Orig. C Allg. Angew. und ökologische Mikrobiol.* **1981**, *2* (1), 45–60.

(187) Fröhner, C.; Oltmanns, O.; Lingens, F. Isolierung Und Charakterisierung Pyrazon-Abbauender Bakterien. *Arch. Mikrobiol.* **1970**, *74* (1), 82–89.

(188) Daniel, R. The Metagenomics of Soil. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (6), 470–478.

(189) Jansson, J. K.; Hofmockel, K. S. The Soil Microbiome — from Metagenomics to Metaphenomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *43*, 162–168.

(190) Halder, J. M.; Nestl, B. M.; Hauer, B. Semirational Engineering of the Naphthalene Dioxygenase from *Pseudomonas* Sp. NCIB 9816-4 towards Selective Asymmetric Dihydroxylation. *ChemCatChem* **2018**, *10* (1), 178–182.

(191) Gally, C.; Nestl, B. M.; Hauer, B. Engineering Rieske Non-Heme Iron Oxygenases for the Asymmetric Dihydroxylation of Alkenes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2015**, *54* (44), 12952–12956.

6 Anhang

Tabelle 6-1: Aminosäuren.

Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I			

Tabelle 6-2: Nukleinbasen.

Adenin	A	Cytosin	C
Guanin	G	Thymin	T

6.1 Sequenzen

Auflistung aller DNA- und Proteinsequenzen der annotierten RO-Komponenten aus *P. immobile* Stamm E (DSM 1986):

Ferredoxin 3:

Fxd3 (*Scaffold* 1:679301-679622(+))

ATGGCTAACATCACCTACGTCCAATTCGACGGGACTGAGCAAACCGTCGACGTCAAGAACGGCCTCTCCGT
GATGGAAGGCGCGATCAAGAACGACATCGAAGGCATCGACGCCGATTGCGGCGGCGCCTGCGCCTGCGCG
ACCTGCCACGTCTATGTCGACGAAGCCTGGCTGGAAAAGCTCGGCCGGCCGAACCCGATGGAGGGCTCGA
TGCTGGACTTCGCCGAGAACCGCGAAGCCAACAGCCGCCTGTCGTGCCAGATCAAGGTCAACGACGAGCTG
GACGGCCTGATCGTCCGGCTCCCGGAAAGCCAGCGCTA

Fxd3

MANITYVQFDGTEQTVDVKNGLSVMEGAIKNDIEGIDADCGGACACATCHVYVDEAWLEKLGRPNPMEGSMLDF
AENREANSRLSCQIKVNDELDGLIVRLPESQR*

Ferredoxin 4:

Fxd4 (*Scaffold* 1:2613528-2614037(+))

ATGAGCTACATCGTGATGGATCCTTGCATCAAATGTAAGTTCATGGACTGCGTTGAGGTGTGCCCCGTCGAC
TGCTTCTACGAGGGCGAAAATTTCCTGGCGATCAATCCCGACGAATGCATCGACTGCGGCGTCTGCGAGCC
GGAGTGCCCGGTGGATGCGATCAAGCCGGACATGGAAGACGACGCCGACGGCAAGTGGCTCAAGCTCAAC
GCCGACTATTCGAAGGTCTGGCCGAACATTACGGTGAAAGGCACACCGCCCGCCGACCGTGCGGAGTTTGA
AACGGAGACCGGGAAGCTTGAGAAGTACTTCAGCGAAAAGCCTGGCCGCGGCTCCTGA

Fxd4

MSYIVMDPCIKCKFMDCVEVCPVDCFYEGENFLAINPDECIDCGVCEPECPVDAIKPDMEDDADGKWLKLNADYS
KVWPNITVKGTPPADRAEFETETGKLEKYFSEKPGRGS*

Ferredoxin-Reduktase 1:

FerRed1 (*Scaffold* 2*:*180533-183956(-))

ATGGTAGAGAAGCAGATGAGCGTTTCGTCTAAGGTGGTGATCCTGGGCGCCGGCCACGCTGGCGGCACGC
TGGCGGCCCTGCTTCGCCAATATAAGCACGAAGGCGACATCGTGATGATCGGCGATGAGCCGATCGCCCCC
TATCAACGCCCGCCGCTCTCGAAGGCCTGGCTGAAGGGTGAGGCCGACGCTGAGTCGCTGGCCCTGCGCC
CAGTCCATTACTACGGCGACAACAACATCACCTTCATGCCTTCGACCAAGGCGGTTTCGCTGAATCGCGGCG
CGAAGACTGTGACGCTCGATAATGGCGAAGTCGTCTCCTATGACATCCTGGTCATCGCCACGGGCGCGCGC
GCCATGGCCCTGCCGGTGCCGGGCGCGGACCTGAAGGGCGTGTTGTCGCTGCGCACGGCAGCTGACGCC
GAAGAACTGAAGAACGCCCTGAAACCCGGCAAGCGGATGGCGATTATCGGCGGCGGCTACATCGGCCTGG
AAGCGGCGGCCTCGGCGCGTGCGCTCGGCGCCGAAGCCGTCGTGGTGGAACGCGAGCCGCGCCTCCTGG
CTCGCTCGGCCTATCACGTGTTGTCGGACTTCCTGAAAGCCTACCATGAAGCCCGTGGCGTCACCTTCGAAC
TGGCGGCCAGCGCCGCGGCCTTCGAAGGCGAGGATGGCAAGGTCACTGGCGTGAAGCTGACCGACGGGC
GCGTGATCCCCTGCGACATCGCGCTGGTGGGCATCGGTGCGGCGCCGAACGACGAATTGGCTCGGGAGTC
GGGCATCGAATGCGAACGCGGGATCGTCGTCGATCTGGACGCGCGCACCTCCGACCCTTCGGTCTTCTCAA
TCGGCGACGTGACCCATCGGCCGATGCCGCTTTACGATCGCATGTTCCGACCGGAAAGCGTGCCGAGCGC
GCTGGAGCAAGCCAAACAGGCGGCTTGCGCTATCGTTGGGCGGCCCCGCCCGCCGGGCGAAGCGCCGTG
GAACTGGTCGGATCAGTACGATCTGAAATTGCAGATCGCAGGCGTACCGTTCGAGGTCGACAGCGTGCTGG
TGCGCGGCGAGCCCTCGTCGGGCGCCTTCGCGGTCTTTCACCTGAAGGGCGACCTCATCCAGGCGGTGGA
GGCGATCAACGCGCCGGCCGAATTCCTGATGGGCCGCAACCTGATCCTGAGCCGCAAGCCGGTCGATCCG
GCCAAGCTTGCGGATTTGTCCGTTTCGATGAAAGAAGTCGCCGCCTGA

FerRed1

MVEKQMSVSSKVVILGAGHAGGTLAALLRQYKHEGDIVMIGDEPIAPYQRPPLSKAWLKGEADAESLALRPVHYY
GDNNITFMPSTKAVSLNRGAKTVTLDNGEVVSYDILVIATGARAMALPVPGADLKGVLSLRTAADAEELKNALKPG
KRMAIIGGGYIGLEAAASARALGAEAVVVEREPRLLARSAYHVLSDFLKAYHEARGVTFELAASAAAFEGEDGKVT
GVKLTDGRVIPCDIALVGIGAAPNDELARESGIECERGIVVDLDARTSDPSVFSIGDVTHRPMPLYDRMFRPESVPS
ALEQAKQAACAIVGRPRPPGEAPWNWSDQYDLKLQIAGVPFEVDSVLVRGEPSSGAFAVFHLKGDLIQAVEAINA
PAEFLMGRNLILSRKPVDPAKLADLSVSMKEVAA*

Ferredoxin-Reduktase 2:

FerRed2 (*Scaffold* 1:677147-677930(+))

ATGACCGAAGCTTCCATCGCGCCCGCCCCCTTGAAGGCCAGCGGGGCCTTCTACGTCGAGACCGTGACCTG
GGTTCAGCATTGGACCGACAGCCTGTTCTCGTTCCGCACGACCCGCGACCCGGGCCTGCGCTTCTCGTCCG
GCCAGTTCGTCATGGTCGGCCTGATGAAAGAGGACGGAAAGCCGCTGGTCCGCGCCTATTCGATCGCCAGC
CCGGCTTGGCACGAGGAATTGGAGTTCTATTCGATCAAGGTGCCGGACGGCCCCCTAACCTCGCGCCTGCA
GAAGATTCAGGTCGGTGACCAGGTGCTGATCGGTCGCAAGCCCACCGGCACCCTCGTGCTCGACGGCCTG
AAGCCCGGTAAGCGGCTCTACATGCTGGGCACGGGCACGGGCCTGGCGCCCTGGCTGTCGCTGGCCCGC
GACCCGGAAGTCTATGAGCGCTTCGACGAGGTCATAGTCACCCACACGGTGCGCGAGATCGCCGACCTCAA
CTATCGCGAGCTGCTTGGCCACGAGCTCAACAACGACGAGATCCTGGGCGAATTGATCGACGGCAAGCTGC
GCTACTATCCCAGCGTCACCCGCGAGGAATTCGTCAACAAGGGGCGGATCACCGACCTGATCACTTCAGGA
AAGCTGTTCGCCGACCTGGGCGTGCCGGAGCCGGACCCCGCGGTCGATCGTTTCATGATGTGCGGCGGCC
CCTCGGTGCTCGCCGATCTGAAGCAGATCCTGCTGGATCGCGGCTACGAAGAAGGCTCGCTCGCCAGCCCT
GGCGACTTCGTCCTCGAGAAGGCTTTCGTCGAGACCTGA

FerRed2

MTEASIAPAPLKASGAFYVETVTWVQHWTDSLFSFRTTRDPGLRFSSGQFVMVGLMKEDGKPLVRAYSIASPAW
HEELEFYSIKVPDGPLTSRLQKIQVGDQVLIGRKPTGTLVLDGLKPGKRLYMLGTGTGLAPWLSLARDPEVYERFD
EVIVTHTVREIADLNYRELLGHELNNDEILGELIDGKLRYYPSVTREEFVNKGRITDLITSGKLFADLGVPEPDPAVD
RFMMCGGPSVLADLKQILLDRGYEEGSLASPGDFVLEKAFVET*

β-Untereinheit:

DO3 (*Scaffold* 2: 207087-207633(-))

ATGGTTGACGTGATTGAAAAGCCGGCCGTGAAGCTGGACCTCGACGCCCTGCTGCTGCAGCACGAAATCGA
GCAATATTATTACGTGGAAGCTGGCCTCCTCGACAACCGCGACTACGCGGAATGGCTGAAGCTGTTCACCGA
GGACTGCCACTATTTCATGCCGGTTCGTCGCACGAAGACCAGCAACGAGCTGGACCGCGAATTCACGCGTC

CAGGTGAAATCGCCTTCTTCGACGACGACCACGCCATGCTGGTCGCCCGCATCAAGAAGCTCGACACCGGC
TACGCCTGGGCTGAAGATCCGCCCTCGCGCCAGCGCCACCTGGTCAACAACGTCCGTATTCTTGAGAATGA
CGGCGAGAAGCTGAAGGTCACCTCGAACTTCCACTTCTATCGCACGCGTCTGAACTCGGAAGAGGACAACT
GGATCGGCCATCGCGTTGACGAGCTGGTCCGTGTCGACGGCGAACTGAAGATCAAGACCCGCAACATCTAT
CTGGAGCAGACCGTTCTGCTCTCCCGCAACCTGAGCAACTTCTTCTAA

DO3

MVDVIEKPAVKLDLDALLLQHEIEQYYYVEAGLLDNRDYAEWLKLFTEDCHYFMPVRRTKTSNELDREFTRPGEIA
FFDDDHAMLVARIKKLDTGYAWAEDPPSRQRHLVNNVRILENDGEKLKVTSNFHFYRTRLNSEEDNWIGHRVDEL
VRVDGELKIKTRNIYLEQTVLLSRNLSNFF*

α-Untereinheit 2:

DO2 (*Scaffold 2*: 204405-205587(-))

ATGGCGTACTACGACACCGTAGCCGCCGAACTCAGTCCTGAAGTCTACTCCGATCCCGGCCTGCTCGGCCG
GGAGCTCGACGGACCGTTCGCACGCTCTTGGCTGTTCGGCGGTCCGGCGAGTTGGGTTGAACAGCCCGGC
GCATTCTACGTCACGCGCGTCGGCCGAAAGGCCGTCGTGTTGTGGCGGGATTCGGCCGGGGTGCTCGGCG
CCTACGAGAACCGCTGCGCGCGCTCGGAAGAGTCGATTGTCGCCGAGCCGCGAGGCTCCGCAGAAGAGCT
GATCTGCGGCTGCCACGGGTGGGCCTACACCCGCGACGGCGCCAAGGGCAGCGTGCCACTGAAAAGCATG
GGCGCTGCGGTGGTTGACCGCGGCTTCGTCTTTGTGGGCCGCGGCTCACGGACCTTCCGCGAGCAGCTGG
GCGAGTTCGCCTGGTACTTCGACCTGATCGCCGACAGTTTCGCCGGCGGCGTCGTCTTTCACGGCGAACTG
CCGTTGAAGACCAGGCTCACCTGCAACTGGAAGCTTGGTGTCGAGACCTACTGCGGCGACCAGTACCGCCG
CCTGACCGTCACCAAGGCCACGACGGACGCCCTAGACAAGGGCGAACCCAACTTGACCGAGGGCTTCCAG
GCCGCGGCTGGCGGCGGCGTGGTGATGTTGAGCGCCGAATATGCCGAGACGGAGGTGAAGGCGCTCAGC
GCAACGATCTTCCCGAACCTGTCGTTCGATGGAGACATCGGCGTCCTGCACGTCTGGCATCCGGTCAGCGC
GAATGAGACGGAGGTTCATACCTACTGTCTTGTCGCCGCCAATGATCCGCAGTCGGTGAGGGACGCCAAGC
GTCGCCGTTGCAGTCTGCATTTTGGGCCTACCGGCATGGAGACCCAGGACCACGAGGCGGTCTGGTCGCAA
ATCACGAAGATCAGCCGCGGACGCCGCCGCCGCCGCGCAGGGCTCAACCTGCAGATGGGCCTCGGCCATG
AGCGCCGATCCAACTACCCCGGCCAGATCTCTGATCTCGTCAGCGAGATGGGGCAGCGCAGCTTCTACGCC
TGGTGGCAGGCGGAGATCGACGCGCCTGTCGATCCGGCCGTCCACGAGGACAAGCTTCAACTGATGATTCG
CAAGCCCTCCGCAGAAGAGGGCGCGCCGCTTTCCAGTCAACAAAACCAAAATTAG

DO2

MAYYDTVAAELSPEVYSDPGLLGRELDGPFARSWLFGGPASWVEQPGAFYVTRVGRKAVVLWRDSAGVLGAYE
NRCARSEESIVAEPRGSAEELICGCHGWAYTRDGAKGSVPLKSMGAAVVDRGFVFVGRGSRTFREQLGEFAWY
FDLIADSFAGGVVFHGELPLKTRLTCNWKLGVETYCGDQYRRLTVTKATTDALDKGEPNLTEGFQAAAGGGVVM
LSAEYAETEVKALSATIFPNLSFDGDIGVLHVWHPVSANETEVHTYCLVAANDPQSVRDAKRRRCSLHFGPTGME
TQDHEAVWSQITKISRGRRRRRAGLNLQMGLGHERRSNYPGQISDLVSEMGQRSFYAWWQAEIDAPVDPAVHE
DKLQLMIRKPSAEEGAPLSSQQNQN*

α-Untereinheit 4:

DO4 (*Scaffold1*: 3614-5012(-))

ATGCGTGATCTGGTCCGGCTGCTCCGGCGCGTCGCCCGACTAGGCTATCGGGTCTTTGAAAATTCCGCGGC
GTGCGGAACAAGGTCCGAGCCGTTTGGGTTTAGAAGGCATCGCAGCCTCACGGCGGCGATCCTTCCAAGGC
TTTCCCCGGCATCGGTTGGGGCGAGCCGAGGTCGCACGGGGCTCCCGCTCTCCACTGGAGGCGGGGGCC
TTTTGCGTTTGGGGCCGCCGTCTCATCTGCCATCTTGGGCCAAGACTTGCGGGCTTGGGCCAAGGCCGTTG
ACGGCGGGCGCTTTCAGGCACGCCATCGTCCCAATCTTGGGAGTGATCGCGATGCTTAGAGGCGCTGACAA
GCCGTTTCATGACTATGTCGATGTGGCGCGCCACACCGTCGACCGCATCATCTTCTCCGACCAGGCGGTCT
ATGAGATGGAGCTGGAGCGGATCTTCGCCCGCGCGTGGAACTTCATGTGCCACGAGAGCCAGATCCCGAAG
GCGGGCGATTTCTTCCTGAGCTTCATCGGCGAAGAATCGGTGATCGCGACTCGCGACAAGAAGGGCGAGCT
TCAGGTCCTGCTGAACAGCTGCCGCCACCGTGGCAATGCGGTCTGTCGCGCGGAAGCCGGCAATGCGCGA
TCGTTCCTGTGCACCTACCACGGCTGGACCTATGGCCTGGACGGCCAGTTGATCGGCGTCCCCGGCTACAA
GGACTTCTACCACGAGCAGCTGGACAAGTCGCAGTGGGGCCTGGTGAAGGCTGGCAAGGTGGCCAGCTAC
AAGGGTTTCGTCTTCGCCACCATGGACCCGGAAGCCCCGGACCTGGAAGAGTTCCTGGGCCCGGTCGGTC
GGCTCAGCATCGACCTCCTGGCGGAACGTGGCGATCTGATGATCGTCGAGGGCGTTCAGAAGAACCAGATC
ACCTGCAACTGGAAGCTGGCCGTCGATAACCTGTTCGATTTCTACCACGCCTCCATCAGTCACGCCTCGGCC
TACATGTCGGGCTTCCGGGCCATTCGGAACCCCAACTCGCCGCAGACGCCCGACTATGTGCGCTCGATCTT
CCGCGTGGTGATGGGCGAATACGGTCACGCCATCGGCGGCCCGAAGGTCACATCCGAGGCGCTCGACAAG
CTGGAGAATGAGCCCGACACCAATCCGCGCAAGCGCGACCTGTGGCGCCGTCGCAAGCCCGGCGCGCGC

GAGATTCTGGGCGAAGTCGGCATGGAGGCCGGCGGCCACCCCAACATCTTCCCGAACATGTGGCTGACCG
GCAACCAGGTCTGCCTGCGCCTGCCGAAGGGGCCCGAGATCACTGAAATTTGGTGGTTCACCCTGGTCGAT
AAGTCTGTCTCGGACGAGCAGCAGGAAGAGGTCGTCCACAACGCCAACCACAACTTTGGGCCGGCCGGCTT
TCTGGAGCAGGACGATGGCGAGAACTGGGATCAGTCGACGCGGGCCACGCGCGGCTCAATCGCCCGTCGC
TACCCCCTCAACTACGAGATGGGCGCAGGCTTCGCCGCTGTGAAGCGCGCCGAAGGGATCACCTACGTCGA
CGAGCTGATCAACGAGCACGCCCAGTTCTGGACCTACCGCGCCTGGGCCGACTGGATGGACGCCGAGAAC
TGGCCGGCCTTGAAGACCGCGCGCACCATCCCCCTGACCGAAGGCGTGCTCTAG

DO4

MRDLVRLLRRVARLGYRVFENSAACGTRSEPFGFRRHRSLTAAILPRLSPASVGASRGRTGLPLSTGGGGLLRLG
PPSHLPSWAKTCGLGPRPLTAGAFRHAIVPILGVIAMLRGADKPFHDYVDVARHTVDRIIFSDQAVYEMELERIFAR
AWNFMCHESQIPKAGDFFLSFIGEESVIATRDKKGELQVLLNSCRHRGNAVCRAEAGNARSFLCTYHGWTYGLD
GQLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAGKVASYKGFVFATMDPEAPDLEEFLGPVGRLSIDLLAERGDLMIVEGV
QKNQITCNWKLAVDNLFDFYHASISHASAYMSGFRAIRNPNSPQTPDYVRSIFRVVMGEYGHAIGGPKVTSEALD
KLENEPDTNPRKRDLWRRRKPGAREILGEVGMEAGGHPNIFPNMWLTGNQVCLRLPKGPEITEIWWFTLVDKSV
SDEQQEEVVHNANHNFGPAGFLEQDDGENWDQSTRATRGSIARRYPLNYEMGAGFAAVKRAEGITYVDELINEH
AQFWTYRAWADWMDAENWPALKTARTIPLTEGVL*

α-Untereinheit 6:

DO6 (*Scaffold1*: 82414-83542(-))

ATGGCTCGCGGTTGCGACGCTATTCGCGGCATGGACATCTGGACGCGCACCTTGGTCGAGGAGGGCGCCT
TCGTCGACGAGCAGGCGAAGCTCGCCGGAGTCTGGACGTTTCTCGGCCTCACCAGCGATCTGAAGGAAGAC
GACGCCTGGATCACCGGCCAGATTGGCGGCCGCGCCGTTTTCGTCCAACGGTTCGGCGGGACCCTCCGAG
GCTTCGAGAACGTCTGCGCCCACCGGGGCTTCCCGCTGAGGCTCGGCGGCAAGGGGCGCGGCGCCGTCA
TCTGCGGCTTTCATCTTTGGCGCTATAACGCTGATGGCCGGGTCGTGGGCGTGCCGATCGCGCAAGAGGCC
TTCGGATGCTCGGCGGAAGAGCTCCACGCCGGCCTCGCCGAACTCGAGGTGGCCTGCTGCGGGGGCCTCG
TTTTCGGACGCTTCGCGCACCAGGCGCCGGCGGGGCCGCTGAGCGGCGGCTTGGAAGCCTTTCTCGGCGA
CGCCTTTCCAATGCTGGAGACGATCTGTCAGTTCTCGGACGCCCCCGCCGTCCGCACCTATGGCCGGATCG
TCGAGGCGAACTGGAAGCTGATGATCAACATCACCCTCGACGACTCTCACTTGCCCGCCATTCACGGCCGC
AAGCGGTTCAGTCGTCGCGACGAGTTCGACTATTGGCGGTTCGGCGCGCACAGCGCCCATACCGAAGGGC
AGCAGGAAACGCAGGCCGCGATGTTGGCGGACTGCGTCGCGGGCGTCTATCAACCCGTCCGCTACAAGCT
CTTCAATCTCTTTCCCAACGTGGCCATCGGGCTTCTTCGGCTGGGCCCCTACTGGTACGTCCTGCTTCAGCA
CTTCGAGCCAGTCGGTCCCGCCGAGACCAAATGGCGCGCCCACTATTTTCGGACGCCCTGGCGCGCCGGC
GCCGAACCCCTGCTGGCGCCGCAGTCTCCTCGTACGACAGACCGTATCGTCGCCTGGCTGTTCGAGCGTGT
GGCGCGCCGGGTCAACGAGGAAGACCACATCGCCTGCGAGCGCCAGCAGACCAACGCGCGCAACATCCCG
CCGCCGATCGCCCTGCTCTCGGCGCATGAAGAGCGTATCGGTTGGTTCTACGAGACCTGGCGGATGTCGCA
GCCTGGCGAAGACGGGTCGCCTCGCTTGTAG

DO6

MARGCDAIRGMDIWTRTLVEEGAFVDEQAKLAGVWTFLGLTSDLKEDDAWITGQIGGRAVFVQRFGGTLRGFEN
VCAHRGFPLRLGGKGRGAVICGFHLWRYNADGRVVGVPIAQEAFGCSAEELHAGLAELEVACCGGLVFGRFAHQ
APAGPLSGGLEAFLGDAFPMLETICQFSDAPAVRTYGRIVEANWKLMINITLDDSHLPAIHGRKRFSRRDEFDYWR
FGAHSAHTEGQQETQAAMLADCVAGVYQPVRYKLFNLFPNVAIGLLRLGPYWYVLLQHFEPVGPAETKWRAHYF
RTPWRAGAEPLLAPQSPRTTDRIVAWLFERVARRVNEEDHIACERQQTNARNIPPPIALLSAHEERIGWFYETWR
MSQPGEDGSPRL*

α-Untereinheit 7:

DO7 (*Scaffold1*: 485708-487022(+))

ATGAACAGTCAGGCCGAACAGAGCCCCAAAAGCGGTTGGAGGAGCGCAGCTATGCTTCACGAAATCACGAC
GCCGTTTCGATCGATGGTCGACGCCGAGGCGGGCACGGTCGATCGCCAGATCTTCACGGACGAAGCCATCT
ACCAGCTGGAGCTGGAGCGCATATTCGCCCGCGCGTGGAACTTCATGTGCCATGAGACGCAGATTCCGAAG
GCCGGCGACTTCTTCCTGTCGTTCATCGGTGAAGAGAGCGTCATCGCCACCCGCGACAAGAAGGGCCAGCT
TCAGGTCCTGCTGAACTCCTGCCGCCACCGCGGCAACGCGGTGTGTCGAGCGGAGGAGGGCAATGCGCGC
TCGTTCCTGTGCACCTACCACGGCTGGACCTACGGCCTGGACGGATCGCTGATCGGCGTTCCCGGCTACAA
GGATTTCTACCACGAACAGTTGGACAAGAGCCAATGGGGCCTGGTGAAGGCCGGCAAGGTCGCCAGCTACA
AGGGCTTCGTCTTCGCGACCATGGATCCGGAAGCGCCCGACCTGGAAGACTACCTGGGTCCGGTCGGTCG
TCTGGCGCTCGATCTGACGGCGGGTCGCGGCACGATCCGGATCGTCCAGGGCGTCCAGAAGAACCAGATC

GGCTGCAACTGGAAGCTCGCGAACGACAACCTGTTTGACTACTACCACCCCGACATCAGCCACGCCTCGGC
GGTCATGAACAACTTCATCGACCGCAGCGCCGGCGACCACAAGAAGCGGCAGATGGAGCACCGCAACCTGT
TCGGCGAATACGGCCACGGGATCGGTGGTCCGCGCCTGACGGAAGAAACCTGGGCGGTGGTCGACAAGAA
GGCCGCCGAGGGCGCGGTCGATCCGCTGCAGATCGAGCAATGGCGCCGCACGCCGGAAAACGCCGAGAT
GCTCGGCGACCAGATCGACACCAAGGGCCACCGGCTGATCTTCCCCAATCTGTGGGTGCCCTCCAGCACGA
GCCAGATTTGCCTGCGCCTGCCGAAAGGGCCGGACGTCTGCGAGATCTGGTGGTTCACCATCGAGCCGGA
AGAATTCACCGAGGCGCAGAGCGAAGCGGTGCGGATGCGCGCCATCCACCACTTCGGCGCGGCCGGCCTC
CTCGAGCAGGAAGACGGCGAGAACTGGGACCAGTCGACGCGCGCCATGAAGGGCGTCGTCGCCCGGCGC
TACCCGCTGAACTTCAGCATGAACCTGGGCCTGGGCGAGGTGCAGGGCTCCGACCTGGGTCTGACCTACGT
CGACACCCACGTCAGCGAGCACAATCAGCTGTGGACCTACCGCGCCTGGGCCGACTGGATGGACGCCGAA
AGCTGGGCGGCGCTCAAGGCCGACCACGCCATGCCGCCCGAAGCCGGCGGCCGGATCTAG

DO7

MNSQAEQSPKSGWRSAAMLHEITTPFRSMVDAEAGTVDRQIFTDEAIYQLELERIFARAWNFMCHETQIPKAGDF
FLSFIGEESVIATRDKKGQLQVLLNSCRHRGNAVCRAEEGNARSFLCTYHGWTYGLDGSLIGVPGYKDFYHEQLD
KSQWGLVKAGKVASYKGFVFATMDPEAPDLEDYLGPVGRLALDLTAGRGTIRIVQGVQKNQIGCNWKLANDNLF
DYYHPDISHASAVMNNFIDRSAGDHKKRQMEHRNLFGEYGHGIGGPRLTEETWAVVDKKAAEGAVDPLQIEQWR
RTPENAEMLGDQIDTKGHRLIFPNLWVPSSTSQICLRLPKGPDVCEIWWFTIEPEEFTEAQSEAVRMRAIHHFGAA
GLLEQEDGENWDQSTRAMKGVVARRYPLNFSMNLGLGEVQGSDLGLTYVDTHVSEHNQLWTYRAWADWMDA
ESWAALKADHAMPPEAGGRI*

α-Untereinheit 8:

DO8 (*Scaffold1*: 497066-498403(+))

ATGAAAGTCGCCCATAACTTCGACTTCAAGGGTTATGTCGACGTCGACAACGGCGTCGTCGACCGCACCATC
TTTTCCGATCAGTCCATCTACGAGACGGAACTGGAGCGTATCTTCGCGCGGTCGTGGAATTTCATGTGCCAC
GAGAGCCAGATCCCGAAGCCGGGAGACTTCTTCCTATCGTTCATCGGCGAAGAGAGCGTCATCGCCACGCG
GGACAAGAAGGGCCAATTGCAGGTCCTGCTGAACAGCTGCCGGCACCGCGGCAACGCGGTCTGCCGGGCT
GAGCAGGGCAACGCCCGCTCGTTCCTCTGCACCTACCACGGCTGGACCTACGGCCTGGACGGATCGCTGA
TCGGCGTCCCCGGCTACAAGGATTTCTACCACGAGCAGCTCGACAAGAGCCAATGGGGCCTGGTGAAGGCC
GGCAAGGTCGCCAGCTACAAGGGCTTCGTCTTCGCCACCATGGATCCGGAAGCCCCGGACCTGGAAGAATT
CCTCGGGCCGGTCGGCCGGATGGGCATGGATATTCTGACGACACGCGGCGACATCATGATCGTCGAGGGC
GTTCAGAAGAACCTCATCCACTGCAATTGGAAACTGGCGGTGGATAACCTGTTCGACTACTACCACGTGGGC
ATCAGCCACGCCTCGGCGATGATGTCGAACTTCAGTCGCGTCGATGAAAAGAAGGTCGTGGCGCCGCTGGA
TCCGATGAACCACAAGGTGATCCTGGGCGACTACGGCCATGCCCTGGGCGGCCACCGCCTGCGGCCGGAC
CAACTGGCCCTGATGCAGCCCGACCCCAATATCGAAGCCTCGATGCACGACCACAGCTGGCGCAACCGCCC
GGGCGTCGCAGAAGCCTTGGGGCCGGTGGCCATCGAATTCCGCGGCCATCCGAACGTCTTCCCAAATCTGT
GGATCAGCGGCGGCCAGCTGTGCCTGCGCCTGCCCCGCGGACCGTTCTCGACCGAGATCTGGTGGTTCAC
CTTCATGGACACCAGCCTGTCGGACGAGGGCCGCGCCAAGCGCGTCCAGTCGGCCAACCACGTCTTCGGC
CCGGCCGGCATGCTCGAGCAGGAAGACGGCGAGAATTGGGACCAGTCGACGCGGGCCATGCGCGGCCCG
ATCGCCCGGCGCTATCCGCTGAACTTCCAGATGGGCCTGGGCCACGGCGAGATCAAACGCGCCGGCGACG
TCTCCTACATCGACACGCCGATCAATGAACACGCCCAGCTCTGGCTCTATCGCGCCTGGGCCGACTGGATG
TCCGCCGCCAGTTGGGCCGACCTGAAGCGCGACGCGACGCGGCCGCCTGTGGACGGCGTGGTCTGA

DO8

MKVAHNFDFKGYVDVDNGVVDRTIFSDQSIYETELERIFARSWNFMCHESQIPKPGDFFLSFIGEESVIATRDKKG
QLQVLLNSCRHRGNAVCRAEQGNARSFLCTYHGWTYGLDGSLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAGKVASYK
GFVFATMDPEAPDLEEFLGPVGRMGMDILTTRGDIMIVEGVQKNLIHCNWKLAVDNLFDYYHVGISHASAMMSNF
SRVDEKKVVAPLDPMNHKVILGDYGHALGGHRLRPDQLALMQPDPNIEASMHDHSWRNRPGVAEALGPVAIEFR
GHPNVFPNLWISGGQLCLRLPRGPFSTEIWWFTFMDTSLSDEGRAKRVQSANHVFGPAGMLEQEDGENWDQST
RAMRGPIARRYPLNFQMGLGHGEIKRAGDVSYIDTPINEHAQLWLYRAWADWMSAASWADLKRDATRPPVDGV
V*

α-Untereinheit 9:

DO9 (*Scaffold1*: 831257-832595(-))

ATGCTCTACGAGAACGGCAAGCCGTTTCACGACTATGTCGACGCAGACAAGGGTCTCGTCGACCGGGTGAT
TTTCTCAGACCAGGCGATCTACGAGCTGGAGCTGGAGCGCATCTTCGCCCGTGCCTGGAACTTCATGTGCC
ACGAAAGTCAGATCCCGAAGGCCGGCGACTTCTTCCTCAGCTTCATCGGCGAAGAGTCGGTCATCGCGACC

CGCGACAAGAAGGGCGAGCTTCAGGTCCTGCTGAACAGCTGCCGCCACCGCGGCAACGCCGTCTGCCGGG
CGGAGGAGGGTAATGCGCGCTCGTTCCTCTGCACCTACCACGGCTGGACCTACGGCCTTGACGGCCAGCT
GATCGGCGTGCCGGGCTACAAGGACTTTTACCACGAGCAGCTCGACAAGAGCCAATGGGGACTCGTGAAGG
CCAAGGTCGCTTCCTATAAGGGCTTCGTCTTCGCGACGATGGACCCCGAAGCCGTCGACCTGGACGAATAT
CTCGGTCCCGTTGGGCGGATGAGCATCGACCTCCTGGCGGCGCAGGGCCCACTGAAAATGGTGGCCGGCG
TCCAGAAGAATATCATCGGCTGCAACTGGAAGTTGGCCGTCGATAATCTGTTTGACTACTATCACGTGGGCA
TCAGCCACGCCTCGGCCTTCATGTCGAATTTCCGGGCGCGGGATCCGGAAGCGCCGCCAGCGCCGCCCCG
CTTCTCTTTCGGAAAGCACCGCGTCTGGCTGGGCGACTATGGCCACGCCATCGGCGGCCCGCGCATTCCAA
CGGACGAGATGGCCAACATCATCGCACACGACAATCCGAACCTGGACGAGACCTGGCGCCACCGCGACGA
CGCCCGCGCGATCCTGGGCGACCAGGCCATTGAGAGCGTTGGGCACCCCAATATCTTCCCGAACCTGTGG
GTCACCGAGGCCAACCAGATCTCGCTTCGCCTCCCGAAAGGTCCAACGGGTTGCGAAATCTGGTGGTTCAC
CCTGGTCCCGGAAGGCCTGGATGAGAAGCAGCACGAGGAAGCTATTCGCGGCGCCAACCACCAGTTCGGC
CCCTCCGGCTTCCTTGAGCAGGACGACGGCGAGAACTGGGACCAATCGACGCGGCAGACCATGGGCGTCG
TCGCCCGGCGCTATCCGCTGAACTTCTCGATGAATCTAAAGCACGGCGAAGTCATCACGCCGGCGGATGGC
GGCGCGCCCTACGTCGACACGGCGATCAACGAGCACGCCCAGCTGTGGACCTACCGCGCCTGGGCCGACT
GGATGGACGCCGAAAGCTGGGCGGCTCTGAAGGCGTCGCGAACGCCGGTGCCATCCGATCGGCTCTAA

DO9

MLYENGKPFHDYVDADKGLVDRVIFSDQAIYELELERIFARAWNFMCHESQIPKAGDFFLSFIGEESVIATRDKKGE
LQVLLNSCRHRGNAVCRAEEGNARSFLCTYHGWTYGLDGQLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAKVASYKGF
VFATMDPEAVDLDEYLGPVGRMSIDLLAAQGPLKMVAGVQKNIIGCNWKLAVDNLFDYYHVGISHASAFMSNFRA
RDPEAPPAPPRFSFGKHRVVWLGDYGHAIGGPRIPTDEMANIIAHDNPNLDETWRHRDDARAILGDQAIESVGHPNI
FPNLWVTEANQISLRLPKGPTGCEIWWFTLVPEGLDEKQHEEAIRGANHQFGPSGFLEQDDGENWDQSTRQTM
GVVARRYPLNFSMNLKHGEVITPADGGAPYVDTAINEHAQLWTYRAWADWMDAESWAALKASRTPVPSDRL

α-Untereinheit 10:

DO10 (*Scaffold1*: 83505-836427(+))

ATGGAGCTACGGATGCTGCAGGGCGCAAATAAACCCTTTCACGATTACGTCCACGTCAGTGACGGGACCGT
CGACCGGGTCATTTTTTCGGACCAGGCCGTCTACGACATGGAGATGGAGCGCATCTTCGCGCGCGCCTGGA
ACTTCATGTGCCACGAGAGCCAGATTCCGAAGGTGGGGGATTTCTTCCTCACGTTCATCGGCGAGGAATCG
GTCATCGCGACCCGCGACAAGAAGGGTGAGTTGCAGGTCCTCCTGAACTCGTGTCGCCATCGCGGCAATGC
GGTCTGCCGAGCGGAGAGCGGCAACGCGCGCTCGTTCCTGTGCACCTACCACGGCTGGACGTTTGGCCTG
GACGGCAAGCTTATCGGCGTGCCCGGATACAAAGACTTCTATCATGAGCAGTTGAACAAGGAGGAGTGGGG
CCTCATTCCGGCCGGAAAGGTCCAAAGCTATAAGGGCTTCGTCTTCGCGACGATGGATCCGGAGGCGCCCG
ATCTCGAGGACTACCTGGGGCCGGTCGGCCGCCTGGGCCTGGACCTGGTCGCCGAGCGCGGTGACGAGG
TCGTCGTCGAGGGAATCCAGAAGAGCCAGATCGGCTGCAACTGGAAGCTCGCTGTTGATAATCTCTTCGACT
GGTATCACGTGGGCATCAGCCACGCCTCGGCGATGATGACCGGCTTCGGCCGCGGACGGAATCTGCCGCC
GACGATCGCAGAACGCACTGGGCCAGGGACTTCAGATCCGCATGCGCACCGCGTTCTGCTGGGCGACTAT
GGTCACGCCATCGGCGGACCCCGCATCACCCCGGAACTGCGAGCGATGATGGCGGCGGCGGGTGATGAC
CCTGACGTAACCCTCGATGAACGCTGGCGCGATAAGCCTGCCGCCAAGGCTGCGCTTGGCGCCGCGGGCG
CTGACGTTCGCGGCCATCCGAACATATTCCCGAACCTGTGGATCGCCTCGAACGGCACCCAGCTGTCCCTT
CGCCTGCCCAAGGGGCCGACCACCACCGAAATCTGGTGGTTCACCATCGTCGACAAGAACCTGACCGAGGA
GCAACGGCGCGCCCGCGTCTTCCGGGCCAACCACACCTTCGGGCCGGCGGGCATGCTGGAGCAAGACGAT
GGCGAGAACTGGGACCAGAGCACGCGCCAGACCCACGGCGTCGTGGCGCGTCGCTTCCCTCTGCATTTCG
GCATGAACCTGGGACATGGAGCGCCTCAGTCAATCGACGGCGGGCCAACCTTCATCGACGCCGCGATTAAC
GAGCATGGCCAGTTCTGGACCTATCGCGCCTGGGCCGACTGGATGGACGCCGAGAACTGGGCGGCCCTGA
AGCGCGACCACGTCCGCACGCCGCTTACGCCAGCCTAG

DO10

MELRMLQGANKPFHDYVHVSDGTVDRVIFSDQAVYDMEMERIFARAWNFMCHESQIPKVGDFFLTFIGEESVIAT
RDKKGELQVLLNSCRHRGNAVCRAESGNARSFLCTYHGWTFGLDGKLIGVPGYKDFYHEQLNKEEWGLIPAGKV
QSYKGFVFATMDPEAPDLEDYLGPVGRLGLDLVAERGDEVVVEGIQKSQIGCNWKLAVDNLFDWYHVGISHASA
MMTGFGRGRNLPPTIAERTGPGTSDPHAHRVLLGDYGHAIGGPRITPELRAMMAAAGDDPDVTLDERWRDKPAA
KAALGAAGADVRGHPNIFPNLWIASNGTQLSLRLPKGPTTTEIWWFTIVDKNLTEEQRRARVFRANHTFGPAGML
EQDDGENWDQSTRQTHGVVARRFPLHFGMNLGHGAPQSIDGGPTFIDAAINEHGQFWTYRAWADWMDAENWA
ALKRDHVRTPLTPA*

α-Untereinheit 11:

DO11 (*Scaffold1*: 905071-905854(+))

ATGACGCAGCAGGACCAGTTCGAGAAGGCGACCACGCCCCGTTTCGGGCGCGGCTTCCTGCGTGACATCT
GGTACTTCGCAGCGCTCTCGCGGGACCTCAAGCGCGGCAAGATGGGCCGCTACGAGTTCCTGGGCGAACC
CGTCCTCTTAGGGCGTTCGCCGGACGGGGCGATCTTTGCGCTTCGAGACATCTGTCCGCACCGCGCTGCGC
CGATCTCGGCGGGCCGCTTCCGCAAGGAAGCTTCCGGCGACGAGGTCGTCGAGTGTCCCTATCATGGCTG
GCGCTTTGGTGCGGATGGTGTGTGCCGGGCGATCCCGTCTCTCGCCGACGACCAGGCGATGGATGTGAGC
CTCATCCGCGTCCGGCGTTACCCGACCTCGGAAAGCCAGGGCCTGGTGTTCATCTGGATCGGCGATGGCGA
ACCCAGCGAAGCGCCGCCGCTGTTCCCAGGGGTGGCGGCGACCTCGCCGAAGGTCATCGACCGCATGGAC
TTCCACGCCCATATCGACCACGCGGTCGTGGGCCTTATGGACCCGGCCCACGGGCCCTACGTCCACCAGCA
ATGGTGGTGGCGCTCGGCCGGCAGCCAGCACCAGAAGGCCAAGCAGTTCACGCCCAGCGAATCCGGCTTC
GCCATGACGCGGCATTCGCCGTCGAAGAACTCGCGCGCCTACAGGATTCTGGGCGGGGCGCCGGAGACCG
AAATCACCTTCCGCATCCCTGGGTTGCGCTGGGAGCATGTGACGGTCGGCAAGCGCCAGGTGCTGTCGCTG
ACTTGTCTCACGCCGATGGGCGAGCGGCGGACGCGCATCACCCAGATCATCTGGTCGGACCACCCGGCCT
TCATCTTCCTGCGCCCGGTGATCGCCGCGGCGGCCAGGGCCTTCCTGAGGCAGGACGGCCGCATGGTCGA
TCTGCAGAACGAAGGCCTGAAGTACGATCCGACGTTGCTTTGGATCGACGACGCGGACAGTCAAGCCAAAT
GGTACATGCGCTTGAAGAGCGAGTGGGAGCAAAGCCGTCGCGAGCAGCGGGCGTTCCGTAATCCGATAGA
GCCCGCCGTTCTGCGTTGGCGCAGCTAG

DO11

MTQQDQFEKATTPRFGRGFLRDIWYFAALSRDLKRGKMGRYEFLGEPVLLGRSPDGAIFALRDICPHRAAPISAG
RFRKEASGDEVVECPYHGWRFGADGVCRAIPSLADDQAMDVSLIRVRRYPTSESQGLVFIWIGDGEPSEAPPLFP
GVAATSPKVIDRMDFHAHIDHAVVGLMDPAHGPYVHQQWWWRSAGSQHQKAKQFTPSESGFAMTRHSPSKNS
RAYRILGGAPETEITFRIPGLRWEHVTVGKRQVLSLTCLTPMGERRTRITQIIWSDHPAFIFLRPVIAAAARAFLRQD
GRMVDLQNEGLKYDPTLLWIDDADSQAKWYMRLKSEWEQSRREQRAFRNPIEPAVLRWRS

α-Untereinheit 14:

DO14 (*Scaffold1*: 1173154-1174537(+))

ATGCTCTATGAAAACAGAGGTCCGTTCCGGACCATGGTCGATGTGGAAAAGGGCGTGGTCGATCGCTCGAT
CTTCGCCGACCAGGACATCTATGAGCTGGAGCTGGAGCGGATCTTCGCCCGCGCGTGGAACTTCATGTGCC
ACGAGAGCCAGATCCCGAAGGCCGGCGATTTCTTCCTGAGCTTCATCGGCGAAGAGAGCGTCATCGCGACT
CGCGACAAGAAGGGCGAGCTGCAGGTCCTGCTGAACAGCTGCCGCCACCGCGGCAACGCGGTCTGCCGG
GCCGAGAGCGGCAATGCGCGCTCGTTCCTCTGCACCTACCACGGCTGGACCTATGGCCTCGACGGCCAGC
TGATCGGCGTTCCCGGCTACAAGGATTTCTACCACGAGCAGTTGGACAAGAGCCAATGGGGCCTGGTGAAG
GCCGGCAAGGTGGCCAGCTACAAGGGTTTCGTCTTCGCCACCATGGATCCGGAAGCCCCGGACCTTGAGG
AATACCTCGGGGAAGTCGGCCGCATGGGCCTGGACCTCCTGGCCCACAAGGGCGAGGCGCTGGTCGCGGT
CGATGGAGTCCAGAAGAACCTGATCGGCTGCAACTGGAAGCTGGCCGTCGACAACCTGTTCGATTGGTATC
ACCCGCAGATCAGCCACGCCTCGGCCAACATGGCGGACTTCCGCCGCCAGCAGAGCCGGCTGACCGACGA
GGAGCGGGAACTTGCGGCCAAGGCCGGCATCGCTGGCGGCGGCGGCGCCCAGCGGCCTCACCGGGTCGT
CATGGGGGCCTATGGTCACGCCATCGGCGGGCCGCGGCTGACGCAGGAGGCGCGTGACGCGCGCCAGCA
GCTGCGCGGCAAGATCGGCGGCCTGATCAACGACGAATTCCGCGAGACGCCCGCCGCCAAGGAAGCCCTG
GGCGAGGTCGGGGCCGATACGGCCGGCCACCCGAACATCTTCCCCAACCTTTGGATGACCAATCACCAGCT
GTCGCTGCGTCTGCCCAGGGGCCCGGGCCAATGCGAGATCTGGTGGTTCACCTTCGTGCCCAAGGAAGCC
ACCGAGGAGCGCCGCGAGGAGATCATTCACGGCGCCAACCACGTGTTCGGCCCGGCTGGCATGCTGGAGC
AAGACGACGGCGAGAACTGGGACCAGTCGACGCGGGCCATGCGCGGCGTGGTCGCGCAGCGCTATCCGTT
GAACTTCGCCATGGGCCTGGGGCAACACGCGGTGCAGCAGGCGTCGGACACCAGCTACATCGACACCCTG
ATCAACGAGCACGCCCAGCTCTGGACCTATCGGGCGTGGGCGGAGTGGATGGATGCGGAGAGTTGGGCGG
CGCTGAAGGAGAACCACAGCGTGCGGCCAGCGGCCGATAGCCGACCTTAG

DO14

MLYENRGPFRTMVDVEKGVVDRSIFADQDIYELELERIFARAWNFMCHESQIPKAGDFFLSFIGEESVIATRDKKG
ELQVLLNSCRHRGNAVCRAESGNARSFLCTYHGWTYGLDGQLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAGKVASYK
GFVFATMDPEAPDLEEYLGEVGRMGLDLLAHKGEALVAVDGVQKNLIGCNWKLAVDNLFDWYHPQISHASANMA
DFRRQQSRLTDEERELAAKAGIAGGGGAQRPHRVVMGAYGHAIGGPRLTQEARDARQQLRGKIGGLINDEFRET
PAAKEALGEVGADTAGHPNIFPNLWMTNHQLSLRLPRGPGQCEIWWFTFVPKEATEERREEIIHGANHVFGPAG
MLEQDDGENWDQSTRAMRGVVAQRYPLNFAMGLGQHAVQQASDTSYIDTLINEHAQLWTYRAWAEWMDAES
WAALKENHSVRPAADSRP*

α-Untereinheit 15:

DO15 (*Scaffold1*: 1549070-1550456(+))

ATGACCATGCTTCACGACGCCAGAGGTCCGTTCAGCAGTCTCGTCGATGTAACGACGGGTCTGGTCGATCG
TTCGATCTATGCCGACCAATCCATCTATGAGCTAGAGCTGGAGCGCATCTTCGCCCGCGCGTGGAACTTCAT
GTGCCACGAGAGCCAGATCCCGAAGGCCGGCGACTTTTTCCTGAGCTTCATCGGCGAAGAATCGGTGATCG
CGACTCGCGACAAAAAGGGCGAACTCCAGGTCCTGTTGAACTCGTGCCGGCACCGCGGTAACGCGGTCTGT
CGGGCCGAGAGCGGCAATGCGCGCTCGTTCCTCTGCACCTACCACGGCTGGACCTACGGCCTGGACGGAT
CGCTGATCGGCGTCCCCGGCTACAAGGATTTCTACCACGAGCAGTTGGACAAGAGTCAATGGGGCCTAGTG
AAGGCCGGCAAGGTGGCCAGCTACAAGGGCTTCGTCTTCGCCACCATGGATCCGGAAGCCCCGGACCTTG
AGGAATACCTCGGTGAAGTCGGCCGCATGGGCATCGATCTGATCGCCGAGCGCGGCGACATGGAGATCGT
CGAGGGCATCCAGAAGAACCTGATCGGCTGCAACTGGAAGCTGGCCGTCGACAACCTGTTCGACTGGTATC
ACCCGCAGATCAGCCACGCCTCGGCCTTCATGGCCGGCGCCGTGCGCGAGCCGCAGAACCTTACTCAGCA
AGACATGATGCAACTACAAAAGGCCCAGATCGGCGGGCTCTCTCCCATGCACCAGCGTGTCATTCTCGGCG
GGTACGGTCATGCGATTGGTGGTCCTCGGATTGAGGAGGAAGCGCTGGACATCCGGTCCAAGTTCTATGAC
CGGGTCGATCCGATCTTCGACGATCGTTACCGCGAAGATCCGAAGGTTCAGGACGTGCTGGGCGGTGTCGG
CGTGACCACGGCGGGCCACCCGAACATCTTTCCGAACCTTTGGGTCGCTTTGGGCGCGCACCAGCTGTCGC
TGCGTCTGCCGCGGGGGCCGCATCAGACTGAGATCTGGTGGTTCACCTTCACGCCGAAGGACGCAACTCCA
GACCGAAAGGCTGCCATAGTCGGCATGGCCAACTCGATCTTTGGCGCCGCGGGCTTGCTCGAGCAGGACG
ATGGGGAGAACTGGGATCAGTCCACACGCGCCATGCGGGGGGTCGTCGCGCAGCGCTATCCGCTGAACTT
CGCCATGGGGACGGGGGCCACGCCAGTCGCCGTCGCTGGCGGGGTCAGCTACATCGACACGACTATCAAT
GAACATGCCCAGCTATGGACCTATCGCGCCTGGGCGGAATGGATGGACGCGGACAGTTGGGCCGCGCTCA
AACAGACCCATTCTACGGCGCCGGCGGCGGACGCGAGGCCCTAG

DO15

MTMLHDARGPFSSLVDVTTGLVDRSIYADQSIYELELERIFARAWNFMCHESQIPKAGDFFLSFIGEESVIATRDKK
GELQVLLNSCRHRGNAVCRAESGNARSFLCTYHGWTYGLDGSLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAGKVASY
KGFVFATMDPEAPDLEEYLGEVGRMGIDLIAERGDMEIVEGIQKNLIGCNWKLAVDNLFDWYHPQISHASAFMAG
AVREPQNLTQQDMMQLQKAQIGGLSPMHQRVILGGYGHAIGGPRIEEEALDIRSKFYDRVDPIFDDRYREDPKVQ
DVLGGVGVTTAGHPNIFPNLWVALGAHQLSLRLPRGPHQTEIWWFTFTPKDATPDRKAAIVGMANSIFGAAGLLE
QDDGENWDQSTRAMRGVVAQRYPLNFAMGTGATPVAVAGGVSYIDTTINEHAQLWTYRAWAEWMDADSWAAL
KQTHSTAPAADARP*

α-Untereinheit 16:

DO16 (*Scaffold1*: 1550566-1551958(+))

ATGAAGGAGGATCTGATGCTTTACGAAACCAAGGGCCCGTTCCGCACGATGGTCGACGTCGAGTCGGGCAC
GGTCGATCGCGGCATCTATGCGGACGAAGGCATCTATCAACTCGAGCTTGAGCGCATCTTCGCCCGCGCGT
GGAACTTCATGTGCCACGAGAGCCAGATCAAAAAGCCGGGCGACTTCTTCCTGAGCTTCATCGGCGAAGAAT
CGGTCATCGCCACGCGGGACAAGAAGGGCGAGCTTCAGGTTCTGCTGAACAGCTGCCGCCACCGTGGGAA
CGCCGTCTGCCGGGCAGAAGAGGGCAACGCGCGCTCGTTCCTCTGCACCTACCACGGCTGGACCTATGGC
CTCGACGGCCAGCTGATCGGCGTTCCCGGCTACAAGGATTTCTACCACGAGCAGCTCGACAAGAGCCAATG
GGGCCTGGTGAAGGCCGGCAAGGTCGCTAGCTACAAGGGCTTCGTCTTCGCCACCATGGACCCGGAAGCC
CCGGACCTTGAGGAATACCTCGGCGAGGTCGGCCGCATGGGCATGGACCTACTCGCCGAAAAGGGCGACC
TGGAGCTGGTCGGCGGCGTTCAGAAGAACCTGATCGGCTGCAATTGGAAGCTGGCCGTCGACAACCTTTTC
GACTGGTACCACCCGCAAATTTCCCACGCCTCGGCCTTCATGTCAGGCTTCCGGCCCCAGCTCGAGAAGTT
GAGCCAAGAAGATCAGGAGCTGGCCAAGATCGCTGGCATCGGCGGCGGCGGCGCCCGTCAGCTGCAGCG
CGCGGTTCTGGGCGCTTACGGCCACGCCATTGGCGGCCCGCGTCTGACCAAGATCGAACGCGACGCCCGC
GCCAAGCTCGGCGACAAGATCGAGATCCTGAACAACGATCGGTTCCGGGAACTGCCGCAAGCCCAGCAGGT
CCTGGGCGAGGTCGGCATCGACACTGCCGGCCACCCCAATATCTTCCCGAATCTCTGGATGACCGGTTTCC
AGCTGTCATTGCGCCTGCCACGCGGCCCCAGCCAGTGCGAGATTTGGTGGTTCACCTTCGTGCCGAAGGAG
GCTTCGGAAGAGCGCAAGAAGGTCATCGTCCATGGCGCGAACCACGTGTTCGGCGCGGCGGGTCTGTTGG
AGCAGGACGATGGTGAAAACTGGGACCAATCCACGCGCGCAATGCGCGGCGTGGTCGCCAGCCGTTACCC
GTTGAACTTCCAGATGGGTCTCGGCCAGACTCCGGTCAGCGTCAACGAGGGCGTGGCCTACATCGACACCA
ATATCAACGAGCATCCCCAACTGTGGACGTATCGTGCCTGGGCGGAGTGGATGGACGCCGAAAGCTGGGCT
CAGCTGAAGCAGAACCACTCGGCGGCGCCTAAGGTTGGCGACCTCATTTAA

DO16

MKEDLMLYETKGPFRTMVDVESGTVDRGIYADEGIYQLELERIFARAWNFMCHESQIKKPGDFFLSFIGEESVIAT
RDKKGELQVLLNSCRHRGNAVCRAEEGNARSFLCTYHGWTYGLDGQLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAGK
VASYKGFVFATMDPEAPDLEEYLGEVGRMGMDLLAEKGDLELVGGVQKNLIGCNWKLAVDNLFDWYHPQISHAS
AFMSGFRPQLEKLSQEDQELAKIAGIGGGGARQLQRAVLGAYGHAIGGPRLTKIERDARAKLGDKIEILNNDRFRE

LPQAQQVLGEVGIDTAGHPNIFPNLWMTGFQLSLRLPRGPSQCEIWWFTFVPKEASEERKKVIVHGANHVFGAAG
LLEQDDGENWDQSTRAMRGVVASRYPLNFQMGLGQTPVSVNEGVAYIDTNINEHPQLWTYRAWAEWMDAESW
AQLKQNHSAAPKVGDLI*

α-Untereinheit 17:

DO17 (*Scaffold1*: 1552131-1553520(+))

ATGCTCTACGAGACGAGAGGACCGTTTCGCAGCTTGGTCGACGCTAAGGCCGGCGCCGTCGACCGTTCGAT
CTATGCCGACGACGACATTTATCAGCTGGAGCTGGAGCGGATCTTCGCCCGCGCGTGGAATTTCATGTGCC
ACGAGAGCCAGATCCCGAAGGCGGGCGACTTCTTCCTGAGCTTCATCGGCGAAGAGTCGGTGATCGCGAC
GCGCGACAAGAAGGGCGAGCTTCAGGTCCTGTTGAACTCGTGCCGGCACCGCGGCAACGCGGTCTGCCGG
GCCGAGAGCGGCAACGCCCGCTCGTTCCTGTGCACCTATCACGGTTGGACCTATGGCCTCGACGGATCGCT
GATCGGCGTCCCCGGCTACAAGGATTTCTACCACGAGCAGCTGGACAAGTCGCAGTGGGGCCTGGTGAAG
GCTGGCAAGGTGGCCAGCTACAAGGGTTTCGTCTTCGCCACCATGGATCCGGAAGCCCCGGACCTCGAGG
AATACCTCGGGGAAGTCGGCCGCATGGGCATCGACCTGATCGCCGAGCGCGGCAAGGACCTCGTGGCCGT
CGAAGGCGTCCAGAAGTCGATCATCGGCTGCAACTGGAAGTTGGCCGTCGATAACCTGTTCGACTTCTACCA
TCCGCAGATCAGCCACGCTTCGGCGACGATGTCGGGCTTCCGCAAGCAGGTGGACAAGTTGAACGCAGAAG
AACGCGAACTGGCCGCCAAGGCCGGCATCGCCGGCGGCAGCGGCGTCGGTCGTCCGCACCGCGTCGTGT
TTGGCGCCTATGGCCACTGCGTCGGCGGTCCAAGACTGACCCCGGAGATCCGAGCGATCCGCACCCAATTG
GCCGACAAGATAGATAGCCTGATCGACGACGATTTCCGCGACTGGCCGCAGGCGCAGGAGGCTCTGGGCG
AGGTCGGCATCGACACTTCAGGCCACCCGAACATCTTCCCGAATCTTTGGGTCGCCTCGCAGGGCAGTCAA
CTCAGCCTGCGTCTTCCCAAGGGGCCAGGGCGGACGGAGATCTGGTGGTTCACCTTCATCGACAAGGCGG
CGACGGAGAAACGCCAGAAGGACCGGGTCGAGCGGGGTAACCATGTGTTCGGCGCCGCCGGCCTGCTTGA
GCAGGACGATGGTGAAAATTGGGATCAATCGACCCGCGCCATGCGCGGCGTCATCGCTCGTCGCTATCCTC
TGAACTTCGCCATGGGCTCGGGCCATGATGAGGTGAAGGTCGCCTCGAACACCGCCTATGTGGATGGCCCC
ATCAACGAACACGCTCAGCTATGGACTTACCGTTCCTGGGCCGACTGGATGGACGCCGACAGCTGGGCGGC
TCTTAAGCAGAACCACACGGTCCCGCCCGAGGCCGGCGCCCGACCCTAG

DO17

MLYETRGPFRSLVDAKAGAVDRSIYADDDIYQLELERIFARAWNFMCHESQIPKAGDFFLSFIGEESVIATRDKKGE
LQVLLNSCRHRGNAVCRAESGNARSFLCTYHGWTYGLDGSLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAGKVASYKG
FVFATMDPEAPDLEEYLGEVGRMGIDLIAERGKDLVAVEGVQKSIIGCNWKLAVDNLFDFYHPQISHASATMSGFR
KQVDKLNAEERELAAKAGIAGGSGVGRPHRVVFGAYGHCVGGPRLTPEIRAIRTQLADKIDSLIDDDFRDWPQAQ
EALGEVGIDTSGHPNIFPNLWVASQGSQLSLRLPKGPGRTEIWWFTFIDKAATEKRQKDRVERGNHVFGAAGLLE
QDDGENWDQSTRAMRGVIARRYPLNFAMGSGHDEVKVASNTAYVDGPINEHAQLWTYRSWADWMDADSWAA
LKQNHTVPPEAGARP*

α-Untereinheit 18:

DO18 (*Scaffold1*: 1553712-1555089(+))

ATGCTTCACGAAATCCGGGGGCCGTTCCGCAGCCTCGTCGATGTCAAGACCGGCCTGGTCGATCGTTCGAT
CTATGCTGACGAGGGCATTTACCAGCTTGAGTTGGAACGCATCTTCGCCCGAGCGTGGAACTTTATGTGCCA
CGAAAGCATGATCCCGAAGGCGGGCGACTTCTTCCTGAGCTTCATCGGCGAAGAGAGCGTGATCGCAACCC
GCGACAAGAAGGGTGAGCTTCAGGTTCTGCTGAACAGCTGCCGCCACCGCGGCAATGCGGTCTGCCGCGC
GGAAGAGGGCAACGCCCGGTCCTTCCTTTGCACCTATCACGGCTGGACCTACGGTCTCGACGGCCAGCTGA
TCGGCGTCCCCGGCTACAAGGACTTCTACCACGAGCAGCTCGACAAGAGCCAATGGGGCCTCGTCCGCGC
CGGGAAGGTCGCCTCCTACAAGGGCTTCGTCTTCGCGACCATGGACCCGGAAGCGCCGGATCTTGAAGAGT
TCCTCGGCGAAGTCGGCCGCATGGGCCTCGATCTGATCGCCGAGAAGGGCGAGGAGATGGTGGCGGTCAA
GGGCGTCCAAAAGAGCGTCATCGGCTGCAATTGGAAGCTCGCCGTCGACAACCTGTTCGACTTCTACCACC
CGCAGATCAGCCACGCCTCAGCCACCATGTCGGGCTTCCGCAAGCAGCTGAACAAGCTGACGACGGAAGA
GATGGACATGGCCGCCAAAGCCGGTGTGCTGGGCGGGGGTCTGCGTCCCCACCACCGTGTTTCCATGGGC
AAGTACGGCCACGCCGTCGGCGGCCCGCGCATCACCGAAGAGATGCTGGAGGCCCGGGCGATCCTTGGC
GACAAGCTGGATGGCCTGGTGCAGGACCAGTTCCGTGATCGCCCGCAGGCGCAGGAAGCGCTCGGCGAGG
TCGGCTTGAAGCAGGGCGGCCACCCTAACATCTTCCCGAACCTCTGGATGACCGGCTACCAGCTCTCGCTG
CGTCTGCCCAAGGGCCCGAGCGCGACGGAAATCTGGTGGTTCACCTTTGTCCCGAAGGAGGAAACCGAAGA
GCGGAAGGCCGAGATCATCGAGCGCGCCAACCATGTCTTCGGCGCGGCCGGCCTGCTCGAACAGGACGAC
GGTGAGAACTGGGACCAATCGACCCGCGCCATGAAGGGCGTGGTCGCCCAACGCTATCCGCTGAACTTCG
GCATGGGCGTGGGTCTGGCCCCCGTGCAGCGGGTGGCGGGCGTCTCCTACGTCGACACCAACGTCAACGA
ACACGCCCAACTCTGGACCTATCAAGCCTGGTCGGAGTGGATGGACGCCGAAAGCTGGGCGCAGCTGGGG
CAGATCGCGACCTCGGCGCCCCTCGACGGCGTTCGGTAA

DO18

MLHEIRGPFRSLVDVKTGLVDRSIYADEGIYQLELERIFARAWNFMCHESMIPKAGDFFLSFIGEESVIATRDKKGE
LQVLLNSCRHRGNAVCRAEEGNARSFLCTYHGWTYGLDGQLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVRAGKVASYKG
FVFATMDPEAPDLEEFLGEVGRMGLDLIAEKGEEMVAVKGVQKSVIGCNWKLAVDNLFDFYHPQISHASATMSGF
RKQLNKLTTEEMDMAAKAGVLGGGLRPHHRVSMGKYGHAVGGPRITEEMLEARAILGDKLDGLVQDQFRDRPQ
AQEALGEVGLKQGGHPNIFPNLWMTGYQLSLRLPKGPSATEIWWFTFVPKEETEERKAEIIERANHVFGAAGLLE
QDDGENWDQSTRAMKGVVAQRYPLNFGMGVGLAPVQRVAGVSYVDTNVNEHAQLWTYQAWSEWMDAESWA
QLGQIATSAPLDGVR*

α-Untereinheit 21:

DO21 (*Scaffold1*: 1561383-1562760(+))

ATGCTTTACGACACACAGGGCCCATTCCGCACCATGGTCGACGAGAACACCGGCCAGGTGGATCGGTCGAT
CTTCGCCGACCAAGCGATCTACGAGGTGGAGCTGGAGCGCATTTTCGCCCGCGCGTGGAACTTCATGTGCC
ACGAGACGCAGATCCCGAAAGCCGGCGACTTCTTCCTCTCCTTCATCGGCGAAGAGTCTGTGATCGCCACC
CGCGACAAGAAGGGCGAGCTGCAGGTCCTGCTGAACAGCTGCCGCCACCGCGGCAACGCGGTGTGCCGC
GCGGAAGAGGGCAATGCCCGCTCGTTCCTCTGCACCTACCACGGCTGGACCTATGGCCTCGACGGCCAGC
TGATCGGCGTTCCCGGCTACAAGGACTTCTACCACGAGCAGCTGGACAAGTCGCAGTGGGGCTTGGTGAAG
GCCGGCAAGGTCGCCAGCTACAAGGGCTTCGTCTTCGCCACCATGGATTCGGAGGCGCCGGACCTGGAAG
AATACCTGGGCCCGGTCGGCCGCATGAGCATCGACCTGATCGCCGAGCGCGGCGACATGGAGATCGTCGG
CGGCGTTCAGAAAAACCTGATCGGCTGCAACTGGAAGCTCGCCGTCGACAACCTGTTCGACTTCTACCACCC
GCAGATCAGCCACGCCTCGGCCTTCATGTCGGGCTTCCGCAAGCAGCTGGAAGGCGTCGACGCCGCTGAA
CAGGCGATTGTCGAAAAGGCCGAGATTAACGGCGGCATCCGCAACGCCCACCGCGTTGTCCTGGGCAAGTA
CGGCCACGCCATCGGCGGCCCGCGCCTCACCAAGGAAGTCCGTGAGGCGCGCGCCCTGCTGGGCCCGCG
CTTCGAAGTCCTGACCAACGACAACTTCCGCATGACCGACAGCGCGCAGGAAGCCCTGGGCGAGATCGGC
CTGGACGTGAACGGTCACCCGAACATCTTCCCGAACCTGTGGGTCGCCACGAACGGCCACCAGCTGTCGCT
GCGTCTGCCGAAGGGGCCGGACAAGTGCGAAATCTGGTGGTTCGCCTTCGTGCCGAAGGAAGCGCCGGAC
TGGAAGAAGGCCGAACTGATCGAGCGTTCGATCCACGTGTTCGGGGCTGCGGGCCTGCTGGAACAGGACG
ACGGCGAGAACTGGGACCAATCGACCCGCGCCATGAAGGGCGTGATCGCCAAACGCTATCCGCTGAACTTC
AGCATGGGCTTGAAGCATGGCGTGGTGAACCACGCTGAGGGCGACCTGCACTACATCGACACGACCACCAA
CGAGCACGCTCAACTGTGGACCTACCGCGGCTGGGCCGAATGGATGGACGCCGAAAGCTGGGGCCAGCTG
AAGCAGATCTCCGTCGAGCATCCCGGCGATCTGGTCTGA

DO21

MLYDTQGPFRTMVDENTGQVDRSIFADQAIYEVELERIFARAWNFMCHETQIPKAGDFFLSFIGEESVIATRDKKG
ELQVLLNSCRHRGNAVCRAEEGNARSFLCTYHGWTYGLDGQLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAGKVASYK
GFVFATMDSEAPDLEEYLGPVGRMSIDLIAERGDMEIVGGVQKNLIGCNWKLAVDNLFDFYHPQISHASAFMSGF
RKQLEGVDAAEQAIVEKAEINGGIRNAHRVVLGKYGHAIGGPRLTKEVREARALLGPRFEVLTNDNFRMTDSAQE
ALGEIGLDVNGHPNIFPNLWVATNGHQLSLRLPKGPDKCEIWWFAFVPKEAPDWKKAELIERSIHVFGAAGLLEQD
DGENWDQSTRAMKGVIAKRYPLNFSMGLKHGVVNHAEGDLHYIDTTTNEHAQLWTYRGWAEWMDAESWGQLK
QISVEHPGDLV*

α-Untereinheit 22:

DO22 (*Scaffold1*: 1851075-1852452(-))

ATGCTTTACGACACACAGGGCCCATTCCGCACCATGGTCGACGAGAACACCGGCCAGGTGGATCGGTCGAT
CTTCGCCGACCAAGCGATCTACGAGGTGGAGCTGGAGCGCATTTTCGCCCGCGCGTGGAACTTCATGTGCC
ACGAGACGCAGATCCCGAAAGCCGGCGACTTCTTCCTCTCCTTCATCGGCGAAGAGTCTGTGATCGCCACC
CGCGACAAGAAGGGCGAGCTGCAGGTCCTGCTGAACAGCTGCCGCCACCGCGGCAACGCGGTGTGCCGC
GCGGAAGAGGGCAATGCCCGCTCGTTCCTCTGCACCTACCACGGCTGGACCTATGGCCTCGACGGCCAGC
TGATCGGCGTTCCCGGCTACAAGGACTTCTACCACGAGCAGCTGGACAAGTCGCAGTGGGGCTTGGTGAAG
GCCGGCAAGGTCGCCAGCTACAAGGGCTTCGTCTTCGCCACCATGGATTCGGAGGCGCCGGACCTGGAAG
AATACCTGGGCCCGGTCGGCCGCATGAGCATCGACCTGATCGCCGAGCGCGGCGACATGGAGATCGTCGG
CGGCGTTCAGAAAAACCTGATCGGCTGCAACTGGAAGCTCGCCGTCGACAACCTGTTCGACTTCTACCACCC
GCAGATCAGCCACGCCTCGGCCTTCATGTCGGGCTTCCGCAAGCAGCTGGAAGGCGTCGACGCCGCTGAA
CAGGCGATTGTCGAAAAGGCCGAGATTAACGGCGGCATCCGCAACGCCCACCGCGTTGTCCTGGGCAAGTA
CGGCCACGCCATCGGCGGCCCGCGCCTCACCAAGGAAGTCCGTGAGGCGCGCGCCCTGCTGGGCCCGCG
CTTCGAAGTCCTGACCAACGACAACTTCCGCATGACCGACAGCGCGCAGGAAGCCCTGGGCGAGATCGGC
CTGGACGTGAACGGTCACCCGAACATCTTCCCGAACCTGTGGGTCGCCACGAACGGCCACCAGCTGTCGCT

GCGTCTGCCGAAGGGGCCGGACAAGTGCGAAATCTGGTGGTTCGCCTTCGTGCCGAAGGAAGCGCCGGAC
TGGAAGAAGGCCGAACTGATCGAGCGTTCGATCCACGTGTTCGGGGCTGCGGGCCTGCTGGAACAGGACG
ACGGCGAGAACTGGGACCAATCGACCCGCGCCATGAAGGGCGTGATCGCCAAACGCTATCCGCTGAACTTC
AGCATGGGCTTGAAGCATGGCGTGGTGAACCACGCTGAGGGCGACCTGCACTACATCGACACGACCACCAA
CGAGCACGCTCAACTGTGGACCTACCGCGGCTGGGCCGAATGGATGGACGCCGAAAGCTGGGGCCAGCTG
AAGCAGATCTCCGTCGAGCATCCCGGCGATCTGGTCTGA

DO22

MLHEMKTPFRTMVDVETGTVDRAMFADADIYQLELERIFARAWNFMCHESQIPKAGDFFLSFIGEESVIATRDKKG
ELQVLLNSCRHRGNAVCRAESGNARSFLCTYHGWTYGLDGQLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAGKVASYK
GFVFATMDPEAPDLEEYLGEVGRMSIDLIAERGDMVIVEGVQKNLIGCNWKLAVDNLFDWYHPQISHASAFMVGM
LRGGSKLTPEDHAVLEKARAVGMSRGHRVVFGAYGHAIGGPRGSQEARDARRSMADRIEPIMEDLYRDTPQGR
AALGEVGVDTSGHPNIFPNLWVSTGAYQLSLRLPRGPLNTEIWWFSFVPKDASEAKKKEIINSENHVFGAAGLLEQ
DDGENWDQSTRAMKGVIAQRYPLNFSMGLNKTPVQVIEGVAHVDTNINEHAQLWTYRIWTEWMDADSWATLKA
NHTKPPAHGDLI*

α-Untereinheit 23:

DO23 (*Scaffold1*: 1852575-1853916(-))

ATGGTCGACGCCGAAAAAGGCACCGTTGAACGCGCCATTTTCGCCGACCAATCCATCTATGAGCTGGAGCT
GGAGCGCATCTTCGCCCGCGCGTGGAACTTCATGTGCCACGAGAGCCAGATCCCGAAGGCCGGCGATTTCT
TCCTGAGCTTCATCGGCGAAGAATCGGTGATCGCGACTCGTGACAAGAAGGGCGAGCTCCAGGTCTTGCTG
AACAGCTGCCGCCACCGTGGCAATGCGGTCTGTCGCGCGGAAGCCGGCAATGCGCGATCGTTCCTGTGCA
CCTACCACGGCTGGACCTACGGCCTGGACGGCCAGTTGATCGGCGTCCCGGGCTACAAGGACTTCTACCAC
GAGCAGCTCGACAAGTCGCAGTGGGGCCTGGTGAAGGCTGGCAAGGTGGCCAGCTACAAGGGTTTCGTCT
TCGCCACCATGGATCCGGAAGCCCCGGACCTGGAAGAGTTCCTGGGCCCCGTCGCCCGTCTCGCACTCGA
TCTTCTCAGCGGCCAGGGCGAGATGATGATCGTCGAGGGTGTCCAAAAGAACATCATCGGCTGCAACTGGA
AGTTGGCTGTCGACAACCTCTTCGACTTCTATCACGTCGATATCAGCCACGCCTCGGCCACCATGTCAGGCG
CTCGCAAGCACGCCGAGACCGGCCTTTTCACTCCGTGGAACCACCGGGTGACACTGGGCGACTACGGCCAT
GCGATCGGCGGCAACAAGATCCAGCCGCGGCTATGGGAAATCGTCGAAGAAATGAAGGCTGAGGGCAAAC
CCCTCGATCAGTTCCTGAACCAGGAATGGCGCAAAAGGCCCGAAGTCGCCGAGGCCTTGGGCGACATGGC
CGACACATCGGGCCACCCGAACATCTTCCCGAACATGTGGATCACCGGCAACCAGATCTGCCTGCGCCTGC
CGCGCGGACCCGGAAACACCGAGCTTTGGTGGTTCACCCTGCTCCCGCAGGGTCTGTCCGACGCCGAGCG
CAAGATTCGCATGGACCGCGCCAACCGCACCTTCGGCGCCGCCGGCATGCTTGAGCAGGACGACGGTGAG
AACTGGGACCAATCCACCCGCGCCACCCGCGGCGTGGTCGCCCAGCGCTATCCGCTGAACTTCTCCATGGC
GATTGGAACCGGGGTGACCAAGGTGGGCGAGCGTGGCCATGCCCACATAGATACCCACATCAACGAACATG
CCCAGCTGTGGACCTACCGCAACTGGGCCGACTGGATGGACGCGGAAAGCTGGGCTGTGCTGAAGGCCCA
GCACACGGCCCCGCCGAAGGCCGGCGAACTGGTCTAG

DO23

MVDAEKGTVERAIFADQSIYELELERIFARAWNFMCHESQIPKAGDFFLSFIGEESVIATRDKKGELQVLLNSCRHR
GNAVCRAEAGNARSFLCTYHGWTYGLDGQLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAGKVASYKGFVFATMDPEAP
DLEEFLGPVARLALDLLSGQGEMMIVEGVQKNIIGCNWKLAVDNLFDFYHVDISHASATMSGARKHAETGLFTPW
NHRVTLGDYGHAIGGNKIQPRLWEIVEEMKAEGKPLDQFLNQEWRKRPEVAEALGDMADTSGHPNIFPNMWITG
NQICLRLPRGPGNTELWWFTLLPQGLSDAERKIRMDRANRTFGAAGMLEQDDGENWDQSTRATRGVVAQRYPL
NFSMAIGTGVTKVGERGHAHIDTHINEHAQLWTYRNWADWMDAESWAVLKAQHTAPPKAGELV*

α-Untereinheit 29:

DO29 (*Scaffold1*: 2850081-2851449(+))

ATGCTGTATGACAGCACAAAGCCGTTCCACACCTATGTCGACGCCAAGGCCGGCACCGTGGACCGGGCGAT
CTTTGCAGACCAAGCCATCTACGAGATGGAGTTGGAGCGCATCTTCGCCCGCGCATGGAATTTCATGTGCCA
CGAGAGCCAGATCCCGAAGGCGGGCGACTTCTTCCTCAGCTTCATCGGCGAAGAATCGGTGATCGCGACTC
GCGACAAGAAGGGCGAGCTCCAGGTCCTGCTGAACTCGTGCCGCCACCGCGGCAACGCGGTATGCCGCGC
CGAAATGGGCAATGCGCGCTCGTTCCTGTGCACCTATCACGGCTGGACCTACGGCCTGGACGGTCAGCTAA
TCGGCGTGCCCGGCTACAAGGATTTCTACCACGAGCAACTGGACAAGTCGCAGTGGGGCCTGGTGAAGGCT
GGCAAGGTGGCCTCCTACAAGGGCTTCGTCTTCGCGACGATGGACCCGGAAGCGCCGGACCTCGACGAAT
ACCTCGGCCCGGTTGGCCGACTTGGCCTCGACCTGATGGCTGAGAAGGGCGACGTCGTCGCCGTCGAGGG
CGTCCAGAAGAACCTGATCGGCTGCAACTGGAAGCTGGCCGTCGACAACCTCTACGACTGGTACCACGTCC

AGATCAGCCATGCCTCGTCGACGATGTCGGGCTATTCGCGCCCGCTCGTGCCGGCAGTGGTCGACGAAGG
CGCACCGAAGCCGCCGCAACAGAACCAGCAAATGCTGCACCGCGTCCTGCTGGGCGACTACGGCCACGGC
ATCAGCGGCCCGCGCCGTTCGCCAGAGATGCGCGAGTATCAGCAGCTGGTCGGCGACAAGATCGAACCAC
TGAACGACGATCGTTGGCGCGACGAACCCGCGGCGAAGGCGGCCCTGGGCGAAGCCGGCGCCGACACCC
GCGGCCACCCGAACATCTTCCCGAACCTGTGGGTCGCCTCCGGCGGCACCCAGCTGTCTCTGCGTCTGCC
GCGCGGACCGGGCCAGTGCGAGATCTGGTGGTTCACACTGGTGCCGCGCGACATGCCTAAGGAAACCCGC
GACCTGCGGATCATGCGCGCCAACCACACCTTCGGCCCGGCCGGCATGCTGGAGCAGGACGACGGCGAGA
ACTGGGACCAGTCAACGCGGGCCACCCGCGGCCCAATCGCCCAGCGCTATCCGCTGAACTTCGCCATGAA
CCTTGGCCTGGGCGAACCGACTGTCACCGCCGACGGCGTTCGCTACATCGACACCCACATCAACGAGCACG
CCCAACTGTGGACCTACCGCGCCTGGGCCGAATGGATGGACGCCGACAATTGGGCCGATCTTAAGAAGAGC
CGGACCCCGACGCCGGTCGGCGCCGTCTGA

DO29

MLYDSTKPFHTYVDAKAGTVDRAIFADQAIYEMELERIFARAWNFMCHESQIPKAGDFFLSFIGEESVIATRDKKGE
LQVLLNSCRHRGNAVCRAEMGNARSFLCTYHGWTYGLDGQLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAGKVASYKG
FVFATMDPEAPDLDEYLGPVGRLGLDLMAEKGDVVAVEGVQKNLIGCNWKLAVDNLYDWYHVQISHASSTMSGY
SRPLVPAVVDEGAPKPPQQNQQMLHRVLLGDYGHGISGPRRSPEMREYQQLVGDKIEPLNDDRWRDEPAAKAA
LGEAGADTRGHPNIFPNLWVASGGTQLSLRLPRGPGQCEIWWFTLVPRDMPKETRDLRIMRANHTFGPAGMLEQ
DDGENWDQSTRATRGPIAQRYPLNFAMNLGLGEPTVTADGVRYIDTHINEHAQLWTYRAWAEWMDADNWADLK
KSRTPTPVGAV*

α-Untereinheit 30:

DO30 (Plasmid)

ATGCTTTACGACACACAGGGCCCATTCCGCACCATGGTCGACGAGAACACCGGCCAGGTGGATCGGTCGAT
CTTCGCCGACCAAGCGATCTACGAGGTGGAGCTGGAGCGCATTTTCGCCCGCGCGTGGAACTTCATGTGCC
ACGAGACGCAGATCCCGAAAGCCGGCGACTTCTTCCTGAGCTTCATTGGCGAAGAGAGCGTCATCGCCACG
CGTGACAAGAAGGGCGAGCTGCAGGTCCTGCTGAACAGCTGCCGCCACCGCGGCAACGCGGTGTGCCGCG
CGGAAGAGGGCAATGCCCGCTCGTTCCTCTGCACCTATCACGGCTGGACCTATGGCCTCGACGGCAGCCTG
ATCGGCGTGCCCGGCTACAAAGACTTCTACCACGAGCAACTGGACAAGTCGCAGTGGGGCTTGGTGAAGGC
CGGCAAGGTCGCCAGCTACAAGGGCTTCGTCTTTGCGACCATGGATCCCGAAGCCCCGGACCTGGAGGAAT
ACCTCGGTCCCGTCGGCCGAATGGGCATGGACCTGCTGGCTGAAAAGGGCAACCTTGAACTGGTCGGCGG
CGTCCAGAAGAACCTGATCGGCTGCAACTGGAAGCTCGCCGTTGACAACCTCTTCGATTGGTATCATTCGCA
GATCAGTCACGCCTCGGCCTTCATATCCGGCTTCCGGCCGCAGCTCGAGAAGCTGTCGCCTGAGGACCAGG
AGCTGGCCCGGATCGCCGACATCGGTGCCGGCGGCGCGCGGACACTGCAACGCGCGGTCCTGGGGGCCT
ATGGCCACGCCATTGGCGGCCCGCGTCTGACGAAGATCGAACGTGAAGCCCGCGCCAAGCTTGGCGACAA
GGTCGAGATCCTCCTCTACGACGACCGCTTCCGCGAATTGCCCAAGGCCCAGGAAGTCCTGGGTGAAGTCG
GCATCGACACCGCCGGCCACCCGAACATCTTCCCGAACCTATGGATGACGGGCTGCCAGCTGGCGCTGCG
GCTGCCCCGTGGTCCCAGCACCTGCGAAATCTGGTGGTTCACCTTCGTGCCGAAGGAAGTCTCGGAGGAGC
GCCGCAAGGTCATCATCCACGACGCGAACCATCTATTCGGCCCGGCCGGCCTGCTCGAGCAGGACGATGG
CGAGAATTGGGATCAGTCGACCCGCGCCATGCGCGGCGTGATCGCCCAGCGCTATCCGCTGAACTTCCAGA
TGGGCATGGGCCAAACCCCGGTGACGGTGAACGAGGGCGTGTCCTACATCGACACCTCGATCAACGAGCAT
CCCCAGCTGTGGACCTACCGCGCTTGGGCGGAGTGGATGGACGCCGATAGCTGGGCTCAGCTGAAGCAGA
CCCACTCCGCCCCGCCGAAAGCCGGCGACCTCATCTAG

DO30

MLYDTQGPFRTMVDENTGQVDRSIFADQAIYEVELERIFARAWNFMCHETQIPKAGDFFLSFIGEESVIATRDKKG
ELQVLLNSCRHRGNAVCRAEEGNARSFLCTYHGWTYGLDGSLIGVPGYKDFYHEQLDKSQWGLVKAGKVASYK
GFVFATMDPEAPDLEEYLGPVGRMGMDLLAEKGNLELVGGVQKNLIGCNWKLAVDNLFDWYHSQISHASAFISG
FRPQLEKLSPEDQELARIADIGAGGARTLQRAVLGAYGHAIGGPRLTKIEREARAKLGDKVEILLYDDRFRELPKAQ
EVLGEVGIDTAGHPNIFPNLWMTGCQLALRLPRGPSTCEIWWFTFVPKEVSEERRKVIIHDANHLFGPAGLLEQDD
GENWDQSTRAMRGVIAQRYPLNFQMGMGQTPVTVNEGVSYIDTSINEHPQLWTYRAWAEWMDADSWAQLKQT
HSAPPKAGDL*

α-Untereinheit 31:

DO31 (Plasmid)

ATGGATCCGGAAGCGCCGGACCTGGAAGAATACCTCGGTGAAGTCGGCCGCATGGCCATCGACATCATGGC
TGAGAAAGGCGACCTCGAGGTCGTCGGCGGCATCCAGAAAAACCTGATCGGCTGCAACTGGAAGCTGGCG

GTCGACAACCTGTTCGACTTCTATCACCCGCAGATCAGCCACGCCTCGGCGGCCATGTCCGGCTTCCGACG
GCAGATCGAGAACCTGACGCCGGAAGAACTGGAAAAGGCTCGCAAGGCCGGCGTCGTCACCGGCGTCGCC
CGTCCGCACCACCGGGTGGTCTTCGGCGCTTACGGTCACGCGATCGGCGGCCCGCGCCTGACACAGGAAA
TTCGCGACGTCCGTCGCGAACTGGACGGTAAGCTGTCCCAGCTTGAAGTTGAGAAGTTCCGCGACAAGCCG
GAAGCCGCAGCCCAGCTCGGCGAGATTGGCATCGATGTCACCGGCCACCCGAATATCTTCCCGAACATGTG
GCTGACGAACGGCAACCAGGTTTCTCTGCGTTTGCCGCGTGGCCCTAGCAGCTGCGAGATCTGGTGGTTCA
CCTTCGTCCCGAAAGAAGCGACGCCTGAAGTCCGCGCTGACCTCGTTGATCGCGCGATCCACGTTTTCGGC
GCCGCGGGCCTGCTCGAACAGGACGACGGCGAGAACTGGGATCAATCGACCCGGGCCATGAAGGGCCCG
ATCGCGCGCCGCTATCCTCTGCACTTCGGCATGAACGTTGGTGGCGGCGAGGTGAAGAATCAGGGTGGCGT
GAGCTTTGTTGACACAAACATCAACGAGCACGCGCAGCTTTGGACCTATCAAGCGTGGTCGGAATGGATGGA
CGCCGACAGCTGGGCGGCGCTTCGTAAGGACCATACGCGTCCGCCTGAAGCC GCCTCGGCGCGCTGA

DO31

MLKLALATSNAPALYRPRSAWQTVYDAWTNPEVPPPNELEGETDEVVDGYIERIKAAQKTMRDKLVAAKPDVILMI
GYDDGVAFSNVQVPQFCTFVGEDLTGSASIPELGEKPEDNRVTLKNDTDFAWELQRSLVDEEIDVNYMGVQNPM
GKPEWGTSSAFTLPAANLLAGLDIPVTPFF*

6.2 Ionenaustauschchromatogramm

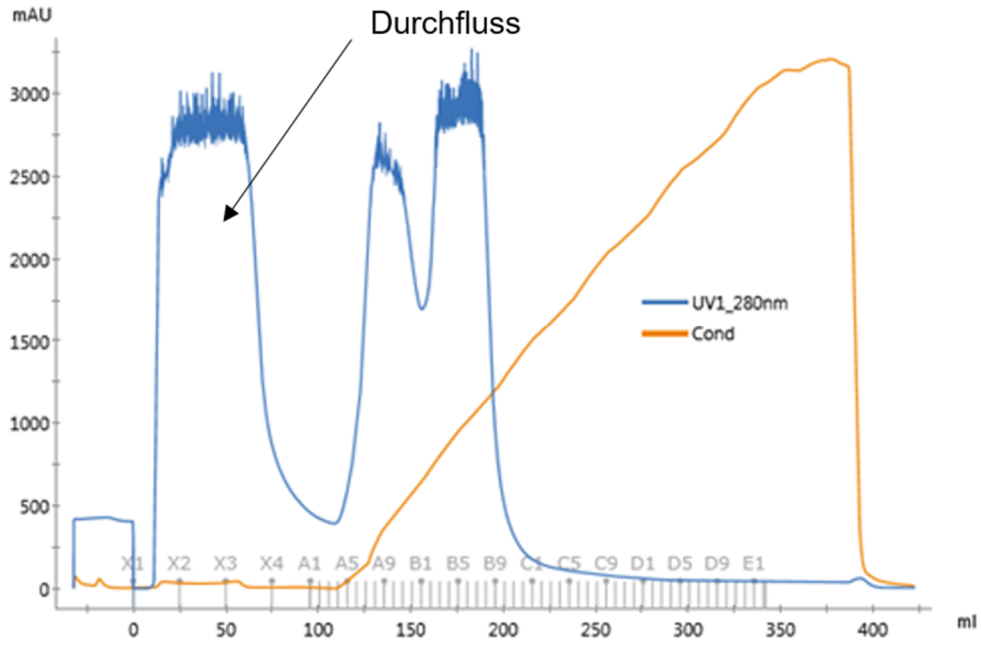

Abbildung 6-1: Beispielchromatogramm der Ionenaustauschchromatographie. Die Methode ist in Abschnitt 2.4.7 angegeben.

6.3 SDS-Gele

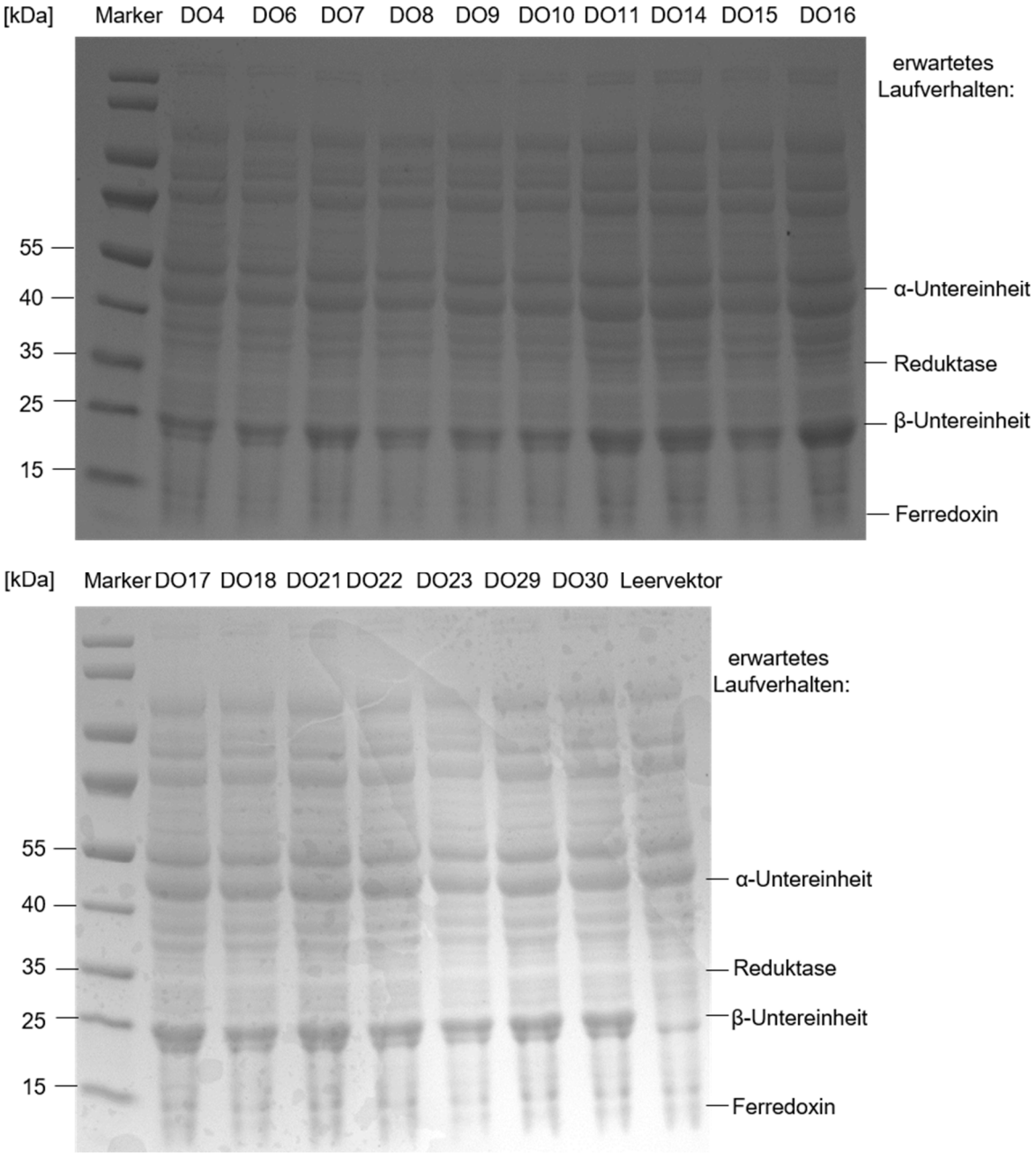

Abbildung 6-2: Überprüfung der in den *in vivo* Biotransformationen verwendeten Zellen. Lysat der aufgeschlossenen Zellen nach der Expression (2.2.4.2) wurde mit einer 12%-igen SDS-PAGE (2.4.2) analysiert.

6.4 Standard-ROs

Die in Abbildung 6-3 gezeigte Tabelle gibt die als Standard-ROs vorgeschlagenen ROs von Kweon und Kollegen an.[23] Die Bezeichnungen des Kladogramms, welches in Abbildung 4-1 gezeigt ist, setzt sich aus der Genbezeichnung und der Stammesbezeichnung zusammen (Beispiel: CarAa_CA10 für *carAa* aus *P. resinovorans* CA10). Die angegebene „Accession number" kann in der Datenbank UniProtKB gesucht werden, um die Aminosäuresequenz zu erhalten. In Tabelle 6-3 sind die Beispiele angegeben, welche als Vertreter von neuen Klassen nach Chakraborty und Kollegen[24] dem Kladogramm hinzugefügt wurden.

Table 1: Standard RHO enzymes used in this study.

	Oxygenase		Ferredoxin	Reductase		
Standard RHO enzyme system	Gene	Prosthetic group	Prosthetic group	Prosthetic group	Structure	Accession number
Carbazole 1,9a-dioxygenase (*P. resinovorans* CA10) [44]	*carAa*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[2Fe-2S]	FAD/[2Fe-2S]	FNR_N-type	D89064
Phenoxybenzoate dioxygenase (*Alcaligenes* sp. BR60) [45]	*cbaA*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	None	FMN/[2Fe-2S]	FNR_C-type	U18133
Phenoxybenzoate dioxygenase (*P. pseudoalcaligenes* POB310) [46]	*pobA*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	None	FMN/[2Fe-2S]	FNR_C-type	X78823
Phthalate dioxygenase (*B. cepacoa* DBO1) [13]	*ophA2*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	None	FMN/[2Fe-2S]	FNR_C-type	AF095748
p-Toluenesulfonate monooxygenase (*C. testosterone* T-2) [47]	*tsaM*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	None	FMN/[2Fe-2S]	FNR_C-type	U32622
Aniline dioxygenase (*Acinetobacter* sp. YAA) [48]	*atdA*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	None	FAD/[2Fe-2S]	FNR_C-type	D86080
Aniline oxygenase (*P. putida* UCC22) [49]	*tdnA1*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	None	FAD/[2Fe-2S]	FNR_C-type	D85415
2-Halobenzoate 1,2-dioxygenase (*P. cepacia* 2CBS) [50]	*cbdA*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	None	FAD/[2Fe-2S]	FNR_N-type	X79076
Benzoate 1,2-dioxygenase (*Acinetobacter*. sp. ADP1) [51]	*BenA*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	None	FAD/[2Fe-2S]	FNR_N-type	AF009224
Anthranilate dioxygenase (*Acinetobacter*. sp. ADP1) [51]	*antA*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	None	FAD/[2Fe-2S]	FNR_N-type	AF071556
Phenanthrene dioxygenase (*Nocardioides* sp. KP7) [11]	*phdA*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[3Fe-4S]	FAD	GR-type	AB017795
Phthalate dioxygenase (*Terrabacter* sp. DBF63) [22]	*phtA1*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[3Fe-4S]	FAD	GR-type	AB084235
Phthalate dioxygenase (*A. keyseri* 12B) [23]	*phtAa*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[3Fe-4S]	FAD	GR-type	AF331043
Phthalate dioxygenase (*M. vanbaalenii* PYR-1) [10]	*phtAa*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[3Fe-4S]	FAD	GR-type	AY365117
Phthalate dioxygenase (*Rhodococcus* sp. RHA1) [34]	*padAa2*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[3Fe-4S]	FAD	GR-type	AB154537
3,4-Dihydroxyphenanthrene dioxygenase (*A. faecalis* AFK2) [52]	*phnAc*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[2Fe-2S]	FAD/[2Fe-2S]	FNR_N-type	AB024945
Naphthalene dioxygenase (*Pseudomonas* sp. 9816-4) [12]	*nahAc*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[2Fe-2S]	FAD/[2Fe-2S]	FNR_N-type	U49496
PAH dioxygenase (*P. putida* OUS82) [53]	*pahAc*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[2Fe-2S]	FAD/[2Fe-2S]	FNR_N-type	AB004059
Carbazole dioxygenase (*Sphingomonas* sp. CB3) [54]	*carAa*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[2Fe-2S]	FAD	GR-type	AF060489
Dioxin dioxygenase (*Sphingomonas* sp. RW1) [14]	*dxnA1*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[2Fe-2S]	FAD	GR-type	X72850
Biphenyl dioxygenase (*Rhodococcus* sp. RHA1) [55]	*bphA1*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[2Fe-2S]	FAD	GR-type	D32142
Toluene dioxygenase (*P. putida* F1) [56]	*todC1*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[2Fe-2S]	FAD	GR-type	J04996
Biphenyl dioxygenase (*Pseudomonas* sp. KKS102) [57]	*bphA1*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[2Fe-2S]	FAD	GR-type	D17319
Biphenyl 2,3-dioxygenase (*B. xenovorans* LB400) [58]	*bphA*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[2Fe-2S]	FAD	GR-type	M86348
Biphenyl dioxygenase (*P. pseudoalcaligenes* KF707) [59]	*bphA1*	[2Fe-2S]/Fe^{2+}	[2Fe-2S]	FAD	GR-type	M83673

Abbildung 6-3: Die von Kweon und Kollegen als Standard-ROs angegebenen ROs.

Tabelle 6-3: In der Abbildung 4-1 hinzugefügte Vertreter.

Klasse	Stamm	Gen	UniProt
IIα	*Pseudomonas putida* 86	*oxoO*	O05935
IVα	*Nocardioides aromaticivorans* IC177	*carAa*	Q2HWI0
VIαβ	*Rhodococcus* sp.I24	*nidA*	Q9X593
VIαβ	*Rhodococcus opacus* SAO101	*dodA*	Q76BV8
VIαβ	*Rhodococcus* sp. NCIMB 12038	*narAa*	Q9X3R9
VIIα	*Novosphingobium* sp. KA1	*carAa*	Q84IG9
VIIα	*Novosphingobium* sp. KA1	*carAa2*	Q8RR19