

Mikrobiologischer Abbau verzweigter kurzkettiger Aliphaten am Beispiel Methylpropen

Von der Fakultät Bau- und Umweltingenieurwissenschaften der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)
genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Steffen Helbich
aus Sindelfingen

Hauptberichter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Karl-Heinrich Engesser

Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Hauer

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2023

Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft
der Universität Stuttgart
Abteilung Biologische Abluftreinigung

2023

It's obviously a thing to ask about, but I have a feeling that "obviousness" is only in hindsight.

What else do we know that isn't so?

- Martin Bonner

Eigenständigkeitserklärung

Die im Rahmen dieser Dissertation mit dem Titel „Mikrobiologischer Abbau verzweigter kurzkettiger Aliphaten am Beispiel Methylpropen“ durchgeführten Arbeiten fanden am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Abteilung biologische Abluftreinigung, der Universität Stuttgart statt.

Die Genomsequenzierung inklusive Assemblierung sowie die dafür notwendige DNA-Isolierung wurden am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dietmar Pieper, von Israel Barrantes und Luiz Borges durchgeführt.

Die Genexpressionsanalyse sowie die dafür notwendige RNA-Isolierung wurden am Fraunhofer IGB, Stuttgart, Arbeitsgruppe Dr. Kai Sohn, von Christian Grumaz, Yevhen Vainshtein und Karoline Glanz durchgeführt.

Das Peptidmassen Fingerprint wurde an der Core Facility Hohenheim, Arbeitsgruppe Dr. Jens Pfannstiel, von Berit Würtz durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle sinngemäß oder wörtlich übernommenen Textstellen aus Fremdquellen sind entsprechend kenntlich gemacht.

Teile dieser Arbeit wurden vorab publiziert:

Helbich, S., Engesser, K.-H., Pieper, D.H., Sohn, K. (10.03.2020) The degradation pathway of 2-methylpropene is elucidated on the genetic level in *M. gordonae* IBE200. Oral presentation at the Annual Meeting of the Association for General and Applied Microbiology, Leipzig, Germany.

Helbich, S., Barrantes, I., Dos Anjos Borges, L.G., Pieper, D.H., Vainshtein, Y., Sohn, K., and Engesser, K.-H. (2023) The 2-methylpropene degradation pathway in *Mycobacteriaceae* family strains. *Environ Microbiol*, doi: 10.1111/1462-2920.16449.

Steffen Helbich

Stuttgart, 2023

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
Zusammenfassung	9
Abstract	11
1 Einleitung	13
2 Grundlagen	15
2.1 Methylpropen, chemische und physikalische Eigenschaften	15
2.2 Vorkommen	16
2.3 Produktion und Verwendung	16
2.4 Stand der Forschung zum Abbau ungesättigter und verzweigter Aliphaten	17
3 Ergebnisse	45
3.1 Isolierung von Reinstämmen und deren Taxonomie	45
3.2 Mikrobielle Charakterisierung	46
3.3 Katabolische Charakterisierung	48
3.4 Genomanalyse der Isolate	58
3.5 Differenzielle SDS-PAGE und Peptidanalyse in Stamm IBE100	68
3.6 Transkriptomanalyse in Stamm IBE200	70
3.7 Postulierung des Abbauweges von Methylpropen	73
3.8 Primärstrukturanalysen und Homologiemodelle der Schlüsselenzyme	74
3.9 Heterologe Expression von <i>Mplbe</i> ABCDEF+ <i>Mp</i> EPH	84
4 Diskussion	89
4.1 Methylpropen-abbauende Mycobacterien und metabolische Vielfalt in der Familie	89
4.2 Wachstum auf Methylpropen	90
4.3 Keine Hinweise auf den Abbauweg mangels Metabolitenausscheidung	91
4.4 Vollständige und partielle Substratverwertung	92
4.5 Genom, Transkriptom und Proteom offenbaren den Abbauweg von Methylpropen	93
4.6 Die Isobuten-Monooxygenase	103
4.7 Ausblick	107

5	Material und Methoden	109
5.1	Chemikalien, Medien, Lösungen und Puffer	109
5.2	NBP-Assay, Derivatisierung, GC-MS-Analyse, Bradford-Assay	111
5.3	Isolierung Methylpropen-abbauender Stämme	112
5.4	Nomenklatur	112
5.5	Verwendete Bakterienstämme und Plasmide	113
5.6	Kolonie- und Zellmorphologie	113
5.7	Oxidase-, Aminopeptidase-, KOH-, Katalase-, Indol-Test, Ziehl-Neelsen-Färbung	113
5.8	Bestimmung der optischen Dichte	114
5.9	Wachstum und Substratverwertung	114
5.10	Sauerstoffelektrode	114
5.11	Ruhezellen-Ansatz zur Metabolitendetektion	115
5.12	Protein-Isolierung	116
5.13	NAD(P)/NAD(P)H-Umsatz im Zellextrakt	116
5.14	SDS-PAGE und Färbung	116
5.15	Peptidmassen Fingerprint	117
5.16	gDNA-Isolierung, Plasmid-Isolierung, Konzentrationsbestimmung	118
5.17	PCR, Colony-PCR, DNA-Aufreinigung	119
5.18	Agarose-Gelelektrophorese	120
5.19	DNA- und Genomsequenzierung, Genomanalyse	120
5.20	Genexpressionsanalyse	121
5.21	Konstruktion Expressionsplasmid	123
5.22	Transformation: Heat shock, Elektroporation	124
5.23	Sequenzalignment	124
5.24	Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen	125
5.25	Erstellung von Homologiemodellen, Visualisierung und Berechnungen	125
5.26	Verwendete Software zur Bilderstellung und -bearbeitung	125
6	Literaturverzeichnis	127

7	Anhang	147
7.1	Accession numbers der Isolate	147
7.2	Ausgewählte Nukleotid-Sequenzen	147
7.3	Ausgewählte Aminosäuresequenzen	152
7.4	Homologiemodelle	153
7.5	Peptidmassen Fingerprint	153
7.6	Sauerstoffzehrung	153
7.7	Photometrische Daten	154

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Mögliche Abbauwege für Methylpropen	18
Abbildung 2-2 Initiale Oxygenierungsreaktionen durch lösliche di-Eisen-Monooxygenasen .	19
Abbildung 2-3 Operonstruktur ausgewählter löslicher di-Eisen-Monooxygenasen	20
Abbildung 2-4 Evolutionäre Beziehungen von α -Untereinheiten ausgewählter SDMs.....	21
Abbildung 2-5 Elektronenübergang einer Alken-Monooxygenase mit vier Komponenten	22
Abbildung 2-6 Hydroxylase-Effektorprotein-Komplex TouABED aus <i>Ps. mendocina</i> KR1	23
Abbildung 2-7 Reaktionsschema von Epoxid-Hydrolasen.....	24
Abbildung 2-8 Epoxid-Hydrolase aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AD1	25
Abbildung 2-9 Epoxidhydrolyse	26
Abbildung 2-10 Reaktionsschema der Acyl-CoA-Mutasen.....	27
Abbildung 2-11 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase HcmAB aus <i>A. tertiarycarbonis</i> L108.....	28
Abbildung 2-12 Reaktionsschema der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase	29
Abbildung 2-13 Adenosylcobalamin.....	30
Abbildung 2-14 Syntheseweg von Adenosylcobalamin.....	31
Abbildung 2-15 Aerober Abbau von <i>L</i> -Valin.....	33
Abbildung 2-16 Ethen-Monooxygenase-Operonstruktur in <i>Nocardiooides</i> sp. JS614	35
Abbildung 2-17 Aerober Abbau von kurzkettigen Alkenen	35
Abbildung 2-18 iso-Operonstruktur in <i>Rhodococcus</i> sp. AD45	37
Abbildung 2-19 Aerober Abbau von Isopren	37
Abbildung 2-20 Aerober Abbau von <i>tert</i> -Butanol.....	39
Abbildung 2-21 Aerober Abbau von Methylpropen	40
Abbildung 2-22 Aerober Abbau von 2-Methylpropan-1,2-diol / 2-HIBA	41
Abbildung 2-23 Anaerober Abbau von Aceton.....	42
Abbildung 3-1 Phylogenetische Einordnung der Stämme IBE100 und IBE200	45
Abbildung 3-2 Koloniemorphologie der Stämme IBE100 und IBE200.....	46
Abbildung 3-3 Zellmorphologie der Stämme IBE100 und IBE200.....	47
Abbildung 3-4 Wachstum in Flüssigkultur	48
Abbildung 3-5 Wachstumskurven von Stamm IBE100 auf Methylpropen	49
Abbildung 3-6 Wachstumskurven von Stamm IBE200 auf Methylpropen	50
Abbildung 3-7 Wachstumskonstanten im Vergleich	51
Abbildung 3-8 MP/Butan-Co-Oxidation durch die Stämme IBE100 und IBE200	53
Abbildung 3-9 Indigobildung aus Indol.....	54
Abbildung 3-10 Indigo-Bildung durch die Stämme IBE100 und IBE200	54
Abbildung 3-11 Enzymaktivitäten der Alkohol-Dehydrogenasen aus Stamm IBE200	58
Abbildung 3-12 Organisation der am Methylpropen-Abbau beteiligten Gene.....	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-13 Evolutionäre Beziehungen zwischen α -Untereinheiten von SDMs	61
Abbildung 3-14 Evolutionäre Beziehungen zwischen Epoxid-Hydrolasen (EPH)	62
Abbildung 3-15 Evolutionäre Beziehungen zwischen Alkohol-Dehydrogenasen (MdpB)	63
Abbildung 3-16 Evolutionäre Beziehungen zwischen Aldehyd-Dehydrogenasen (MdpC)	63
Abbildung 3-17 Evolutionäre Beziehungen zwischen 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Ligasen	64
Abbildung 3-18 Evolutionäre Beziehungen zwischen 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutasen	65
Abbildung 3-19 Differenzielle SDS-PAGE von Stamm IBE100	69
Abbildung 3-20 Genexpressionsmuster von Stamm IBE200	71
Abbildung 3-21 Expressionsniveaus der Abbau-Gene in <i>M. paragordoniae</i> IBE200	72
Abbildung 3-22 Der Abbauweg von Methylpropen in den Stämmen IBE100 und IBE200	73
Abbildung 3-23 Sequenzvergleich von α -Untereinheiten ausgewählter SDMs	75
Abbildung 3-24 Homologiemodell von IbeA aus Stamm IBE100	77
Abbildung 3-25 Homologiemodell von IbeA aus Stamm IBE200	78
Abbildung 3-26 Homologiemodell von IsoA aus <i>Rhodococcus</i> sp. AD45	79
Abbildung 3-27 Sequenzvergleich ausgewählter Epoxid-Hydrolasen	80
Abbildung 3-28 Homologiemodell der Epoxid-Hydrolase <i>MpEPH</i> aus Stamm IBE200	81
Abbildung 3-29 Sequenzvergleich ausgewählter Acyl-CoA-Mutasen	82
Abbildung 3-30 Homologiemodell der Mutase <i>MpHcmAB</i> aus Stamm IBE200	83
Abbildung 3-31 Zunahme von 1,2-Epoxy-2-methylpropan im Ruhezellen-Ansatz	86
Abbildung 3-32 Nachweis von 1,2-Epoxy-2-methylpropan im Gasraum	87
Abbildung 3-33 Epoxidierungsgeschwindigkeit von IbeABCDE im Ruhezellenansatz	87
Abbildung 3-34 1,2-Epoxy-2-methylpropan-Abnahme im Ruhezellenansatz	88
Abbildung 4-1 Vergleich der Gencluster	101
Abbildung 4-2 Vergleich der Operonstruktur des Isopren-Abbaus	103
Abbildung 5-1 Plasmidkarte des Expressionsplasmides	123
Abbildung 7-1 NBP-Assay: Farbumschlag bei verschiedenen Konzentrationen an IBO	155
Abbildung 7-2 Reaktionsmechanismus NBP-Assay	155
Abbildung 7-3 Kalibrierkurve: NBP-Assay	156
Abbildung 7-4 Kalibrierkurve Bradford-Assay	157

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Eigenschaften von Methylpropen.....	15
Tabelle 3-1 Ergebnisse der Schnelltests.....	47
Tabelle 3-2 Wachstumsparameter der Stämme IBE100 und IBE200.....	50
Tabelle 3-3 Substratverwertung der Stämme IBE100 und IBE200	52
Tabelle 3-4 Atmungsraten von Stamm IBE200	55
Tabelle 3-5 NAD(P)-Umsatz im Zellextrakt von Stamm IBE200.....	57
Tabelle 3-6 Mit dem Abbau von MP assoziierte Gene	60
Tabelle 3-7 Mit der Synthese von Adenosylcobalamin assoziierte Gene	66
Tabelle 3-8 Mit dem Abbau von MP nicht assoziierte Gene in den Clustern	68
Tabelle 3-9 Peptidmassen Fingerprint von Stamm IBE100.....	70
Tabelle 3-10 Daten der Homologiemodelle ausgewählter SDMs	76
Tabelle 3-11 Mittels PMF nachgewiesene Peptide in BUT6 pST-K-ibeABCDEF-eph	85
Tabelle 4-1 Substrat-Aktivität ausgewählter SDMs	106
Tabelle 5-1 Verwendete Stämme	113
Tabelle 5-2 Verwendete Plasmide	113
Tabelle 5-3 Zusammensetzung Acrylamid-Gel	117
Tabelle 5-4 PCR-Ansätze	119
Tabelle 5-5 PCR-Programme	119
Tabelle 5-6 Primer	120
Tabelle 5-7 Sequenzierungs- und Mapping-Statistiken.....	122
Tabelle 5-8 Parameter für die Berechnung von Substrattunnel.....	125
Tabelle 7-1 Accession numbers der Isolate	147
Tabelle 7-2 OD ₆₀₀ -Werte der Wachstumskurven von Stamm IBE100	154
Tabelle 7-3 OD ₆₀₀ -Werte der Wachstumskurven von Stamm IBE200	154
Tabelle 7-4 OD ₆₀₀ -Werte der Wachstumskurven von Stamm IBE200 mit Supplementen....	154
Tabelle 7-5 Messdaten Kalibrierkurve NBP-Assay	155
Tabelle 7-6 A ₆₀₀ -Werte des NBP-Assays der Konversion von MP zu IBO.....	156
Tabelle 7-7 A ₆₀₀ -Werte des NBP-Assays zur Epoxid-Abnahme	156
Tabelle 7-8 Messdaten Kalibrierkurve Bradford-Assay	157

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angstrom	MdpC	Aldehyd-Dehydrogenase
2-HIBA	2-Hydroxyisobuttersäure	MeaH	G Protein Chaperon von HcmAB
2-HIBAL	2-Hydroxyisobuteraldehyd		
3-HBA	3-Hydroxybuttersäure	<i>Mg</i>	<i>Mycobacterium gilvum</i>
aa	Aminosäure(n)	MM	Minimalmedium
AdoCbl	Adenosylcobalamin, Vitamin B12	MMO	Methan-Monooxygenase
		MMSD	Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase
AlkMO	Alken-Monooxygenase		
A _n	Absorption bei der Wellenlänge n	<i>Mp</i>	<i>Mycobacterium paragordoniae</i>
		MP	Methylpropen
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MS	Massenspektrometer
bp	Basenpaar(e)	MTBE/ETBE	2-Methoxy/Ethoxy-2-methylpropan, Methyl/Ethyl tert-Butylether
CDS	Coding DNA sequence		
CoA	Coenzym A		
CoM	Coenzym M	NAD(P)	Nicotinamidadenindinukleotid (-phosphat), oxidiert
Da	Dalton		
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser	NAD(P)H	Nicotinamidadenindinucleotid (-phosphat), reduziert
dH ₂ O	deionisiertes Wasser		
DNA	Deoxyribonucleic acid	NBP	4-(4-Nitrobenzyl)pyridin
EaCoMT	Epoxyalkan-CoM-Transferase	NCBI	National Center for Biotechnology Information
ECM	Ethylmalonyl-CoA-Mutase		
EPH	Epoxid-Hydrolase	nt	Nukleotid(e)
ESI	Electrospray ionization	OD _n	Optische Dichte bei der Wellenlänge n
Etn	Ethen-Monooxygenase		
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	orf	Open reading frame
FadB	Hydroxy-Acyl-CoA Dehydrogenase	PBS	Phosphate Buffered Saline
		PCM	Pivalyl-CoA-Mutase
FC	Fold change	PCR	Polymerase chain reaction
FDR	False discovery rate	PhaA	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase
FID	Flammenionisationsdetektor		
GC	Gaschromatographie	PMF	Peptide mass fingerprint, Peptidmassen Fingerprint
gDNA	gesamt DNA		
GSH	Glutathion	PMMA	Polymethylmethacrylat
GST	Glutathion-S-Transferase	RNA	Ribonucleic acid
HcmAB	2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase	RNAseq	RNA sequencing
		RPKM	Reads per kilobase per million mapped reads
HF	High fidelity		
HPLC	High-performance liquid chromatography	rRNA	ribosomale RNA
		RT	Raumtemperatur
Hsp65	Hitzeschockprotein 65	SDM	Soluble diiron monooxygenase, lösliche di-Eisen-Monooxygenase
Ibe	Isobuten-Monooxygenase		
IBO	Isobutylenoxid, 1,2-Epoxy-2-methylpropan	SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat
ICM	Isobutyryl-CoA-Mutase		
Iso	Isopren-Monooxygenase		
Km	Kanamycin	TAE	Tris base, acetic acid, Ethylenediaminetetraacetic acid
LC	Lethal concentration		
LEH	Limonenepoxid-Hydrolase		
LTA ₄	Leukotrien A ₄ -Hydrolasen	TEMED	Tetramethylethylendiamin
MB	2-Methylbut-1-en	TIC	Total ion count
MCM	Methylmalonyl-CoA-Mutase	TPP	Thiamin-Pyrophosphat
MDD	Diphosphomevalonat-Decarboxylase	TRBA	Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe
MdpB	Alkohol-Dehydrogenase aus der Familie der GMC-Oxidoreduktasen		

Zusammenfassung

Die Stämme IBE100 und IBE200 wurden aus Belebtschlamm einer Kläranlage mit Methylpropen (MP) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle isoliert. Mittels Vergleich der 16S rRNA sowie *hsp65* Gensequenzabschnitte und Genom-basierter Taxonomie wurden die Stämme IBE100 und IBE200 den Spezies *Mycolicibacterium gadium* und *Mycobacterium gordonae* zugeordnet. Diese obligat aeroben Bakterien sind Oxidase- und Katalase-positiv, säurefest, nicht motil und bilden gelb-pigmentierte, kreisförmige, flache Kolonien aus. Aufgrund der wachsartigen Beschaffenheit der Zellen wurden Flüssigkulturen mit dem Detergenz Triton X-100 versetzt, um ein starkes Verklumpen zu vermeiden.

Neben dem Isolationssubstrat Methylpropen (IBE100: $\mu = 0,018 \text{ h}^{-1}$ und IBE200: $\mu = 0,025 \text{ h}^{-1}$) unterscheiden sich die Stämme in der Nutzung der Substrate, die als alleinige Kohlenstoff- und Energiequellen verwendet werden können. Stamm IBE100 ist in der Lage, auf den vermuteten Metaboliten von MP, 1,2-Epoxy-2-methylpropan, 2-Methylpropan-1,2-diol, 2-Hydroxyisobuttersäure, 3-Hydroxybuttersäure sowie Glucose, Fructose und Vollmedien (LB, NB, TB) zu wachsen, Stamm IBE200 hingegen nicht. Strukturanaloga von MP und seinen Metaboliten (verzweigte kurzkettige Alkene, Epoxide, vicinale Diole), zyklische aliphatische Verbindungen und Aromaten induzierten bei beiden Stämmen kein Wachstum. Die cometabolische subterminale Oxidation von *n*-Butan durch dieselbe Monooxygenase, die MP oxidiert, wurde ebenso nachgewiesen wie ihre Induzierbarkeit durch MP und die Indigobildung aus Indol.

Eine am Abbauweg von MP beteiligte Alkohol-Dehydrogenase, welche die Oxidation von 2-Methylpropan-1,2-diol katalysiert, ist nicht homolog zu beschriebenen Enzymen gleicher Funktion, die in Abbauwegen von *tert*-Butanol und 2-Methylpropan-1,2-diol vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Dehydrogenase im Zellextrakt NADP gegenüber NAD bevorzugt.

Aus der Sequenzierung des Gesamtgenoms, einer differentiellen Expressionsanalyse und einem Peptidmassen Fingerprint wurde ein Abbauweg für Methylpropen abgeleitet. Die identifizierten Schlüsselgene codieren für eine lösliche 4-Komponenten-di-Eisen-Monooxygenase mit Epoxidase-Aktivität, eine Epoxid-Hydrolase und eine 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase. Die Tertiärstrukturen dieser Enzyme wurden modelliert. In beiden Stämmen sind die beteiligten Gene in Clustern von 61,0 bzw. 58,5 kbp in einer erstaunlich hoch konservierten Operonstruktur angeordnet. Diese Cluster enthalten auch die Gene, die für Teile des aeroben Synthesewegs von Adenosylcobalamin codieren, einem Vitamin, das für die von der Mutase katalysierte Kohlenstoffumlagerungsreaktion erforderlich ist. Eine Konvergenz mit dem *tert*-Butanol-Abbauweg wurde ersichtlich, jedoch konnte der

Zusammenfassung

Alkohol selbst aufgrund des Fehlens der erforderlichen spezifischen Oxygenase nicht als Kohlenstoffquelle genutzt werden.

Dies ist der erste Nachweis eines Abbauweges für MP auf genetischer Ebene (Helbich et al. 2023), der bisher rein auf Transformationsanalysen mit vermuteten Metaboliten beruht, die aus MTBE-Abbauexperimenten postuliert wurden.

Die für die Epoxidierung von MP verantwortliche Monooxygenase wurde als Mitglied der Gruppe 2 der löslichen Monooxygenasen des Aromaten-/Alken-/Isopren-Typs identifiziert, die aus einer Oxygenase- α -Untereinheit IbeA, einer γ -Untereinheit IbeB, einem Ferredoxin vom Rieske-Typ IbeC, einem Kopplungsprotein IbeD, einer β -Untereinheit IbeE und einer flavinhaltigen NAD(P)H-Reduktase IbeF besteht. Die Tertiärstruktur der α -Untereinheit IbeA wurde modelliert und mit ihrer nächsten Verwandten, der Isopren-Monooxygenase aus *Rhodococcus* sp. AD45, verglichen. Die Geometrien des vorhergesagten aktiven Zentrums und der Substrattunnel lassen auf eine gewisse sterische Einschränkung bei der Substratverwertung schließen.

Die Monooxygenase wurde in dem *n*-Alkan abbauenden *Mycobacterium fluoranthenorans* BUT6 mit pST-K, einem *E. coli*-*Mycobacterium*-Shuttle- und Expressionsvektor, heterolog exprimiert. Für die Ausbildung einer katalytischen Aktivität war eine Inkubationstemperatur von ~ 20 °C erforderlich. Die Monooxygenase war trotz der gescheiterten Expression der Reduktase-Komponente IsoF aktiv. Die Umwandlung von MP in 1,2-Epoxy-2-methylpropan in ruhenden Zellen wurde kolorimetrisch mit dem NBP-Assay nachgewiesen ($K_M = 271$ mM, $v_{max} = 46$ mM \cdot h⁻¹).

Schlagwörter: Methylpropen, mikrobiologischer Abbau, Umweltmikrobiologie, Isobuten-Monooxygenase, Genomanalyse, Proteomanalyse, Transkriptomanalyse, *Mycolicibacterium gadium*, *Mycobacterium paragordoniae*

Abstract

Strains IBE100 and IBE200 – using methylpropene (MP) as the sole source of carbon and energy – were isolated from activated sludge from a wastewater treatment plant. Based on the 16S rRNA gene sequence and the partial *hsp65* gene sequence comparison, as well as genome-based taxonomy, the strains IBE100 and IBE200 were identified as *Mycolicibacterium gadium* and *Mycobacterium paragordoniae*, respectively. These obligately aerobic bacteria are oxidase and catalase positive, acid fast, non-motile, and form circular flat colonies of yellow color. Due to the waxy nature of the cells, liquid cultures were supplemented with the detergent Triton X-100 to mitigate severe clumping.

Apart from the substrate of isolation, 2-methylpropene (IBE100: $\mu = 0.018 \text{ h}^{-1}$ and IBE200: $\mu = 0.025 \text{ h}^{-1}$), the strains differ in the variety of substrates which can be used as sole sources of carbon and energy. Strain IBE100 is able to grow on presumed metabolites of MP, 1,2-epoxy-2-methylpropane, 2-methylpropane-1,2-diol, 2-hydroxyisobutyric acid, 3-hydroxybutyric acid as well as glucose, fructose, and rich media (LB, NB, TB), while strain IBE200 is not. Structural analogues of MP and its metabolites (branched short chain alkenes, epoxides, vicinal diols), cyclic aliphatic compounds and aromatics did not induce growth in both strains. Co-metabolic subterminal oxidation of *n*-butane by the very monooxygenase that oxidizes MP was shown as well as its inducibility by MP and indigo formation from indole.

An alcohol dehydrogenase involved in the degradation pathway of MP, which catalyzes the oxidation of 2-methylpropane-1,2-diol, is not homologous to previously described enzymes with the same function occurring in degradation pathways of *tert*-butanol and 2-methylpropane-1,2-diol. It could be shown that the dehydrogenase in the cell extract prefers NADP to NAD. A degradation pathway of methylpropene derived from whole genome sequencing, differential expression analysis and peptide-mass fingerprinting was postulated. Key genes identified are coding for a 4-component soluble diiron monooxygenase with epoxidase activity, an epoxide hydrolase, and a 2-hydroxyisobutyryl-CoA mutase. Tertiary structures of these enzymes were modeled. In both strains, involved genes are arranged in clusters of 61.0 and 58.5 kbp, respectively, with a surprisingly highly conserved operon structure. These clusters also contain the genes coding for parts of the aerobic pathway of adenosylcobalamin synthesis, a vitamin essential for the carbon rearrangement reaction catalyzed by the mutase. Convergence with the *tert*-butanol degradation pathway became apparent, although the alcohol could not be used as a carbon source due to the lack of the required specific oxygenase.

This is the first proof of a degradation pathway of MP on the genetic level (Helbich et al. 2023), which up to now has been solely based on transformation analysis with presumptive metabolites, postulated from MTBE degradation experiments.

Abstract

The monooxygenase which is responsible for the epoxidation of MP was identified to be a member of the group 2 aromatic-/alkene-/isoprene-type soluble diiron monooxygenases, consisting of an oxygenase α -subunit IbeA, a γ -subunit IbeB, a Rieske-type ferredoxin IbeC, a coupling protein IbeD, a β -subunit IbeE, and a flavin containing NAD(P)H reductase IbeF. The tertiary structure of α -subunit IbeA was modeled and compared to its closest neighbor, the isoprene monooxygenase from *Rhodococcus* sp. AD45. The geometries of the predicted active site and the substrate tunnels inferred a steric constraint regarding substrate utilization. The monooxygenase was heterologously expressed in *n*-alkane degrading *Mycobacterium fluoranthenorans* BUT6 with pST-K, an *E. coli*-*Mycobacterium* shuttle and expression vector. An incubation temperature of ~ 20 °C was needed for catalytic activity. The monooxygenase was active, despite the failed expression of the reductase component IsoF. Conversion of MP into 1,2-epoxy-2-methylpropane within resting cells was proven colorimetrically by means of the NBP-assay ($K_M = 271$ mM, $v_{max} = 46$ mM \cdot h⁻¹).

Keywords: methylpropene, microbial degradation, environmental microbiology, isobutene monooxygenase, genome analysis, proteome analysis, transcriptome analysis, *Mycobacterium gadium*, *Mycobacterium paragordonae*

1 Einleitung

Methylpropen (Isobuten, MP) ist ein farbloses Gas mit einer weltweiten Jahresproduktion (2011) von etwa $3 \cdot 10^6$ Mg. Natürliche Vorkommen sind unbekannt. Es gibt Bestrebungen, diesen industriell wichtigen Synthesebaustein auf biologischem Wege herzustellen (van Leeuwen et al. 2012; Escobedo-Hinojosa et al. 2021). MP findet vielfältige Anwendungen und dient unter anderem als Ausgangsverbindung für die Synthese von Harzen und Polymeren, Vernetzern und Härtern, Kraftstoff- und Schmierstoffadditiven, Dispergatoren, Antioxidantien, Vitaminen und Duftstoffen. Es wird auch als Treibmittel verwendet und gelangt so bei der Verwendung und dem Recycling von Spraydosen in die Atmosphäre. Eine weitere Emissionsquelle stellt die Herstellung von *tert*-Butylhydroperoxiden, genauer die nachgeschaltete Abluftbehandlung des Prozesses, dar.

Die strukturelle Homologie des Moleküls zu Isopren sowie der Aggregatzustand lassen auf eine vergleichbare Wirkung auf die Atmosphärenchemie schließen. Während Reaktionen des Alkens mit OH-Radikalen und NO_x die Ozonbildung in der Troposphäre fördern, wird das Ozon in der Stratosphäre durch die Bildung von Ozonid- und Criegee-Zwischenprodukten abgebaut (Pacifico et al. 2009).

Um diese negativen Effekte zu verringern, gilt es gemäß den Grundsätzen der Umweltpolitik (Vorsorge- oder Vermeidungsprinzip; Verursacherprinzip) Emissionsminderungsmaßnahmen umzusetzen. Da es sich um einen gasförmigen Stoff handelt, sind diese hauptsächlich quellenbezogen in der Abluftbehandlung zu suchen. Eine Möglichkeit dafür bietet die biologische Abluftreinigung, die bei mesophilen Bedingungen, ohne Chemikalieneinsatz und unter geringen Abfallstoffströmen einen breiten Frachtbereich behandeln und somit eine energie- und kosteneffiziente Lösung gegenüber chemischen und physikalischen Vergleichsverfahren bieten kann. Hierfür bedarf es für die Entwicklung und Implementierung von technischen Lösungen über die Kenntnisse zur (photo-)chemischen Degradation hinaus vor allem Kenntnisse zum biologischen Degradationspotenzial.

Bislang sind nur wenige Bakterienstämme bekannt, die Methylpropen oxidieren. Während *Xanthobacter autotrophicus* Py2 und *Nocardioides* sp. JS614 1,2-Epoxy-2-methylpropan (Isobutylenoxid) als Dead-End-Produkt akkumulieren (Ensign 1996; Owens et al. 2009), war *Mycobacterium* sp. ELW1 bisher der einzige Bakterienstamm, der Methylpropen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann (Kottegoda et al. 2015). Das Wissen zu dem Abbauweg in diesem Stamm beruhte nur auf Transformationsanalysen mit mutmaßlichen Metaboliten, die aus MTBE-Abbauexperimenten postuliert wurden.

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung von Bakterienstämmen, die MP als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen, die Aufklärung der/des Abbauwege/s auf genetischer/

Einleitung

enzymatischer Ebene sowie die Identifizierung von Schlüsselenzymen mit Fokus auf der initialen Oxidation des Substrats.

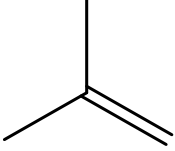
Die gewonnenen Isolate wurden mikrobiologisch und metabolisch charakterisiert. Wachstumstests, Substratverwertung, Sauerstoffzehrung und Reduktionsäquivalentennutzung hatten die Aufgabe, Hinweise zu postulierten Reaktionsschritten und Enzymen zu liefern. Die Sequenzierung und Analyse der Genome beider Stämme sollte die Identifizierung der am Abbau beteiligten Gene ermöglichen. Die Kombination aus differenzieller Transkriptomanalyse sowie Peptidmassen Fingerprint sollte die gewonnenen Erkenntnisse verifizieren. Datenbankrecherchen wurden angestellt, um das Vorhandensein von Stämmen mit Abbaupotenzial gegenüber verzweigten kurzkettigen Aliphaten anzuzeigen. Die Erstellung von Homologiemodellen ausgewählter Enzyme sollte Vorhersagen zu deren Charakterisierung ermöglichen. Abschließend wurde die lösliche di-Eisen-Monooxygenase für die initiale Oxidation von MP heterolog exprimiert und auf ihre Epoxidase-Aktivität hin untersucht.

2 Grundlagen

2.1 Methylpropen, chemische und physikalische Eigenschaften

Methylpropen (MP) ist ein verzweigter, ungesättigter Aliphater und eines der vier Isomere von Buten. Unter Normalbedingungen handelt es sich um ein farbloses, brennbares Gas, welches unter Druck verflüssigt werden kann. Synonyme sind 2-Methylprop-1-en, 2-Methylpropen, 2-Methylpropylen, Isobuten, Isobutylen, γ -Butylen. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften sind in Tabelle 2-1 gelistet.

Tabelle 2-1 Eigenschaften von Methylpropen

Strukturformel		
CAS-Nummer	115-11-7	
molare Masse	56,108	g · mol ⁻¹
Schmelzpunkt	-140,34	°C
Siedepunkt	-6,90	°C
Gasdichte (0 °C, 101,3 kPa)	2,582	kg · m ⁻³
Dampfdruck (20 °C)	257,0	kPa
Koeffizienten Antoine-Gleichung		
A	6,84134	
B	923,20	
C	240,00	
H^{cp}	2,8–8,6 · 10 ⁻⁵	mol · m ⁻³ · Pa ⁻¹
Flammpunkt	-80	°C
Zündtemperatur	465	°C
Löslichkeit in Wasser (25 °C)	263	mg/L, mischbar in Ethanol, Ether
log K_{OW}	2,35	
LC₅₀ Ratte	620.000	mg/m ³ , 4 h
LC₅₀ Maus	415.000	mg/m ³ , 2 h

$\log_{10} p = A - B/(t + C)$, p in mm Hg, t in °C. Quellen: GESTIS-Stoffdatenbank ZVG 13720, PubChem (Kim et al. 2023), (Sander 2015).

MP wird über die Atemwege resorbiert und ist beim Tier gering toxisch. Aufgrund der höheren Dichte als Luft kann es die Atemluft in der Lunge verdrängen. Als Vergiftungssymptome treten narkoseähnliche Symptome auf. Untersuchungen an mehreren Modellen (*Salmonella*/Mikrosomen-Test, *E. coli*, Maus-Lymphoma-Zellen, Mikronukleustest mit Humanlymphozyten *in vitro*) ergaben keine Hinweise auf mutagene Wirkung. In Maus und Ratte wird MP durch mikrosomale Cytochrom P450 Monooxygenasen in 2-Methyl-1,2-epoxypropan umgewandelt, welches erwartungsgemäß mutagen wirkt (Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie 1997).

2.2 Vorkommen

Mehrere biologische Systeme, nativ wie rekombinant, konnten identifiziert werden, welche MP produzieren (van Leeuwen et al. 2012). Erste Berichte stammen aus den Jahren 1984 und 1987, bei denen 178 Mikroorganismen aus drei Stammdatenbanken gescreent wurden, von denen 33 Pilze, 31 Hefen und 6 Bakterien unter oxidischen Bedingungen Spuren von MP produzierten (Fukuda et al. 1984). Die Hefe *Rhodotorula minuta* var. *texensis* IFO 1102 zeigte dabei die höchste Umsatzrate ($0,45 \text{ mg}_{\text{MP}} \cdot \text{L}_{\text{Medium}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bzw. $41 \text{ } \mu\text{g}_{\text{MP}} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) in Anwesenheit von *L*-Phenylalanin (Fukuda et al. 1985). Dabei wurde MP durch Decarboxylierung von Isovalerat produziert, welches beim Abbau von *L*-Leucin als Metabolit auftritt. Das dafür verantwortliche mikrosomale Cytochrom P450 (cyt P450_m), eine NADPH-abhängige Reduktase, stammt aus dem Abbauweg von *L*-Phenylalanin und katalysiert dort die *para*-Hydroxylierung von Benzoat (Fujii et al. 1988).

Die Diphosphomevalonat-Decarboxylase (MDD) kann in einer unspezifischen Nebenreaktion aus 3-Hydroxyisovalerat mittels Decarboxylierung mit anschließender Dehydrierung MP bilden (Gogerty und Bobik 2010). Dies konnte mit einer MDD aus *Saccharomyces cerevisiae* in *E. coli* *in vivo* ($154 \text{ pmol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g Zellen}^{-1}$) als auch mit dem gereinigten Enzym ($1,33 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ Protein) gezeigt werden.

Keines der Buten-Isomere kommt in der Natur quantitativ vor; die Gewinnung erfolgt rein industriell aus fossilen Rohstoffen (Abschnitt 2.3).

2.3 Produktion und Verwendung

Die Jahresproduktion von MP betrug 2011 weltweit $2,99 \cdot 10^6$ Mg, davon entfielen 66 % auf Europa, 17,5 % auf Japan, 10 % auf den Mittleren Osten und 6,5 % auf Afrika. MP wird in Steamcrackern oder Raffinerien aus der C₄-Fraktion gewonnen. Die Siedepunkte aller Komponenten liegen nahe beieinander ($-11,7 - -1 \text{ } ^\circ\text{C}$); eine Trennung durch Destillation ist somit nicht möglich. MP wird mittels schwefelsaurer oder kationentausch-katalysierter Hydratisierung (zu *tert*-Butanol) sowie Etherifizierung (zu MTBE) vom Gemisch selektiv getrennt (Reinheit >99,9 %) und kann bei Bedarf anschließend zurückgespalten werden (Geilen et al. 2000).

MP findet Verwendung in der Herstellung von Elastomeren (Butylkautschuk), Harzen und anderen Kunststoffen (PMMA), Vernetzern und Härtern, Kraftstoff- und Schmierstoffadditiven (ETBE, MTBE, Isooctan, Polyisobuten), Dispergatoren, Antioxidantien (Butylhydroxytoluol), Vitaminen (Vitamin A), Duftstoffen (Citral, Linalool, Geraniol) sowie als Ausgangsverbindung u.a. für *tert*-Butanol, *tert*-Butylamin, Methacrolein, Methacrylsäure, Isopren und Isobutenoxid. Weiter wird es in Gemischen mit anderen gasförmigen Aliphaten als Treibgas in Druckdosen eingesetzt.

Die Bedeutung von MP als Industriechemikalie wird durch die Erweiterung der Produktionskapazität in Deutschland deutlich. Die Firma Global Bioenergies S.A. schätzt den globalen Markt derzeit auf $1,5 \cdot 10^7$ Mg und nahm 2017 am Standort Leuna eine Demonstrationsanlage mit einer Kapazität von 100 Mg in Betrieb. Hier wird an die Arbeiten von Gogerty und Bobik (2010) angeknüpft (Abschnitt 2.2). Glucose wird durch einen rekombinanten *E. coli* fermentiert. Aus dem entstehenden Acetyl-CoA wird über Acetoacetyl-CoA 3-Hydroxyisovaleryl-CoA gebildet, welches anschließend zu 3-Methylcrotonyl-CoA dehydriert wird. Zwei Decarboxylierungsreaktionen erzeugen das gewünschte Isobuten (US 11,124,806 B2).

Die Firmen BASF SE und OMV nahmen Ende 2021 eine Anlage am Standort Burghausen mit einer Kapazität von $6 \cdot 10^4$ Mg/a in Betrieb. Ein neu entwickelter Katalysator soll die direkte Gewinnung von MP aus der C4-Fraktion ermöglichen und macht somit die Zwischenschritte über die Hydratisierung oder Etherifizierung obsolet.

2.4 Stand der Forschung zum Abbau ungesättigter und verzweigter Aliphaten

MP ist aufgrund seiner Molekülstruktur den reduzierten sowie verzweigten Aliphaten zuzuordnen. Der aerobe mikrobielle Abbau aliphatischer Verbindungen wird im Regelfall durch einen Monooxygenase-Angriff eingeleitet (Rojo 2009). Bei MP ist die Oxygenierung sowohl am sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatom durch eine Methan-Monooxygenase, als auch an der C=C-Bindung durch eine Alken-Monooxygenase denkbar, wobei der Angriff an der Doppelbindung aufgrund der Anfälligkeit des π -Elektronensystems für die Oxidation durch aktivierten Sauerstoff wahrscheinlicher ist. Aus den jeweils entstehenden potenziellen Metaboliten, einem terminalen Alkohol (2-Methylprop-2-en-1-ol) bzw. einem Epoxid (1,2-Epoxy-2-methylpropan), ergeben sich verschiedene Möglichkeiten für den weiteren Abbauweg.

2-Methylprop-2-en-1-ol könnte durch zweimalige Dehydrogenierung zur korrespondierenden Säure oxidiert werden und nach anschließender CoA-Aktivierung als Methacrylyl-CoA in den L-Valin-Abbauweg eingehen (Abbildung 2-1 linke Seite und Abschnitt 2.4.5.2).

1,2-Epoxy-2-methylpropan kann aufgrund seiner Epoxidgruppe u.a. mit Peptiden und DNA reagieren. Dieses hochreaktive Zwischenprodukt sollte rasch einem entgiftenden Ringöffnungsschritt unterzogen werden, der auf drei verschiedene Arten und mit unterschiedlichen Nukleophilen durchgeführt werden kann (Abbildung 2-1 rechte Seite). Der aktuelle Wissensstand zu den weiteren Abbauwegen ist im Folgenden zusammengefasst.

Grundlagen

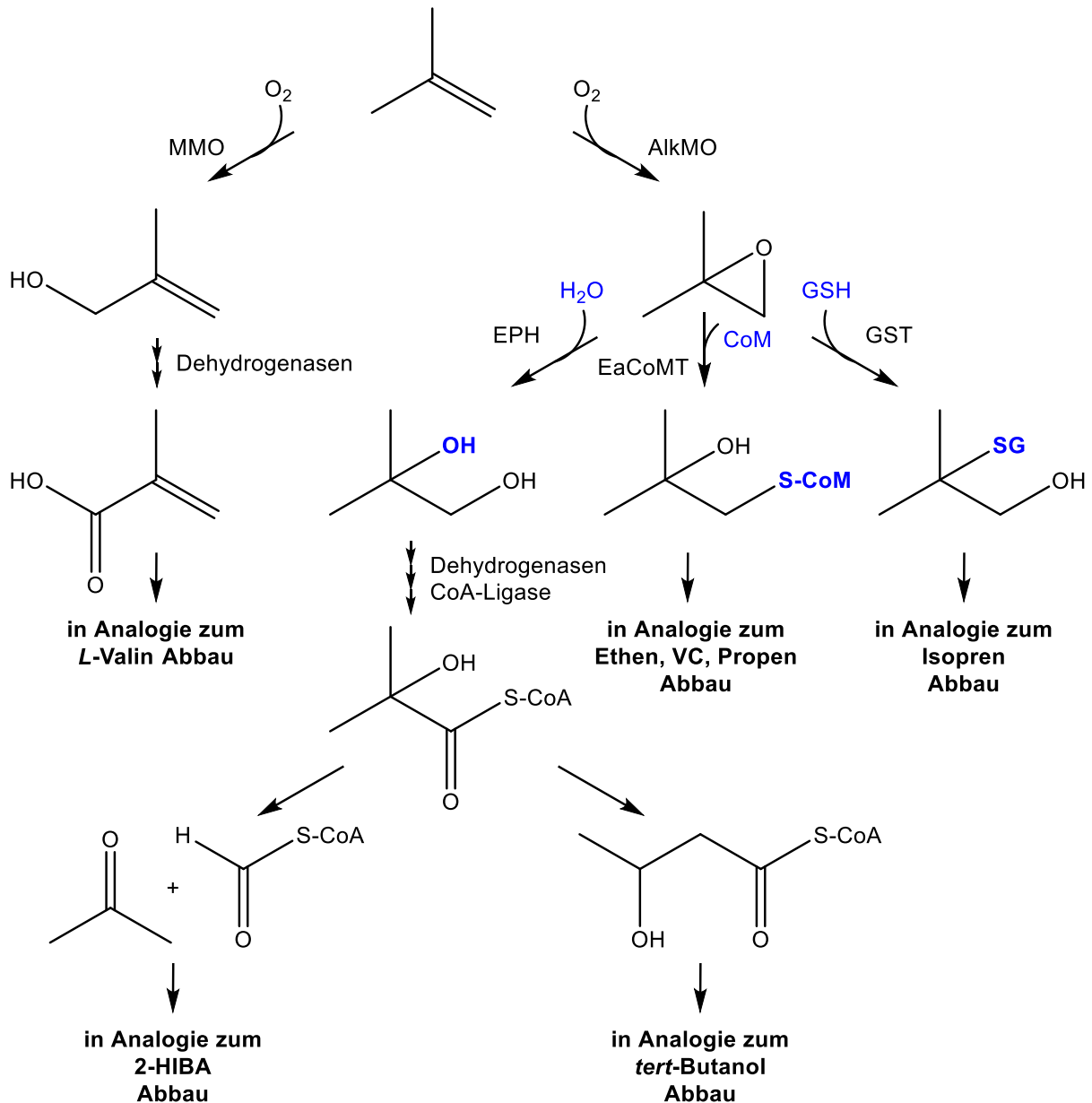


Abbildung 2-1 Mögliche Abbauewege für Methylpropen

Der aerobe mikrobielle Abbau aliphatischer Verbindungen wird durch einen Monooxygenase-Angriff eingeleitet. Es können Alkohole oder Epoxide gebildet werden, wobei Alkohole eine weitere terminale (linker Zweig) oder subterminale Oxidation und Epoxide eine Ringöffnung (rechter Zweig) durchlaufen. Hierbei können drei verschiedene Nukleophile (blau) zum Einsatz kommen: Glutathion mittels Glutathion-S-Transferase, Coenzym M mittels Epoxyalkan-Coenzym M-Transferase oder Wasser mittels Cofaktor-unabhängiger Epoxid-Hydrolase. MMO: Methan-Monooxygenase, AlkMO: Alken-Monooxygenase, EPH: Epoxid-Hydrolase, CoM: Coenzym M, EACoMT: Epoxyalkan-Coenzym M-Transferase, GSH: Glutathion, GST: Glutathion-S-Transferase, VC: Vinylchlorid, 2-HIBA: 2-Hydroxyisobuttersäure.

2.4.1 Lösliche di-Eisen-Monooxygenasen

Die Nutzung von Monooxygenasen (MOs) für den aeroben Katabolismus ermöglicht es Bakterien, ein immenses Spektrum an Substraten zu erschließen. Die initiale Reaktion beim Abbau reduzierter Aliphaten wird für gewöhnlich durch Monooxygenasen katalysiert (Rojo

2009). Das Substrat wird in einer Redoxreaktion mittels molekularem Sauerstoff oxidiert. Dabei verbleibt ein Sauerstoffatom kovalent gebunden am Substrat; das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert. NAD(P)H fungiert dabei als Elektronendonator. Die Familie der löslichen, nicht-Häm-di-Eisen-Monooxygenasen (Soluble Di-iron Monooxygenases, SDMs) kann Monohydroxylierungen und Epoxidierungen katalysieren (Leahy et al. 2003); Beispielreaktionen sind in Abbildung 2-2 dargestellt.

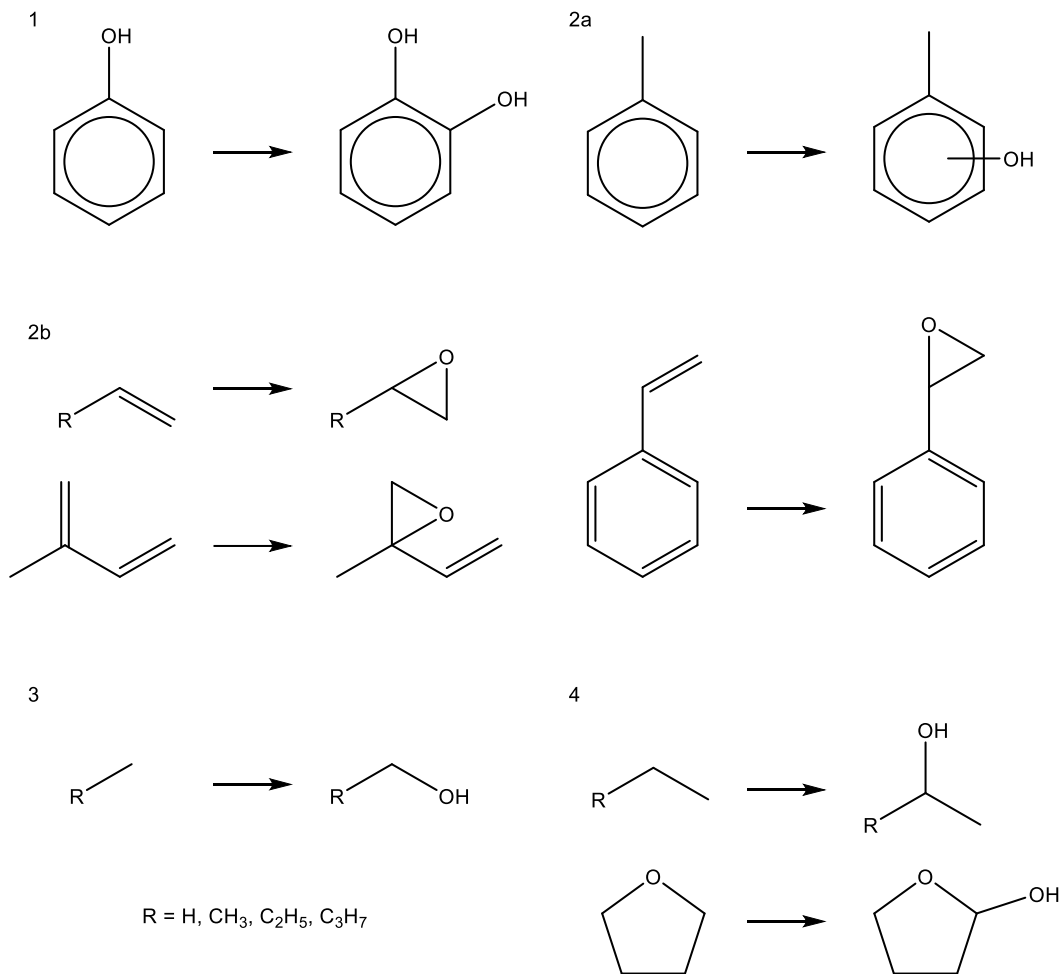


Abbildung 2-2 Initiale Oxygenierungsreaktionen durch lösliche di-Eisen-Monooxygenasen

ortho-Hydroxylierung von Phenol (1), Hydroxylierung von Toluol (2a), Epoxidierung von Alkenen und Styrol (2b), terminale Hydroxylierung von kurz-kettigen Alkanen (3), subterminale Hydroxylierung von Alkanen und Tetrahydrofuran.

SDMs sind Mehrkomponenten-Enzyme, bestehend aus drei oder vier Komponenten mit jeweils vier bis sechs Untereinheiten (Abbildung 2-3): Eine Oxygenase ist zusammengesetzt aus zwei oder drei Untereinheiten mit dem katalytischen Zentrum in der α -Untereinheit lokalisiert, einem Kopplungs-/Effektorprotein, einer Reduktase und in manchen Fällen einem Rieske-Typ Ferredoxin (Leahy et al. 2003).

Grundlagen

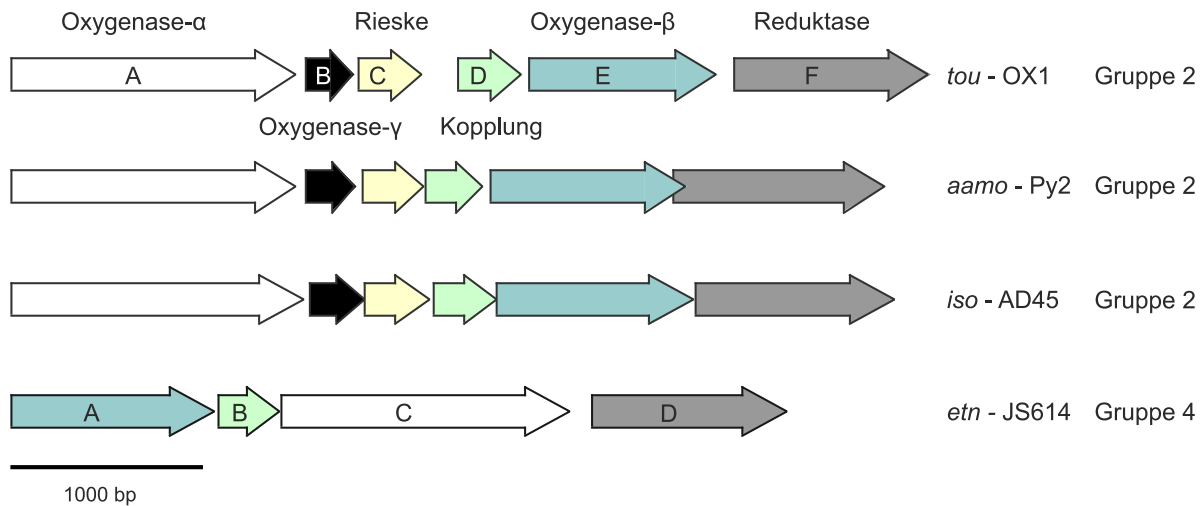


Abbildung 2-3 Operonstruktur ausgewählter löslicher di-Eisen-Monooxygenasen

Toluol-Monooxygenase *tuABCDEF* aus *Ps. stutzeri* OX1, Alken-Monooxygenase *aamoABCDEF* aus *X. autotrophicus* Py2, Isopren-Monooxygenase *isoABCDEF* aus *Rhodococcus* sp. AD45, Ethen-Monooxygenase *etnABCD* aus *Nocardioides* sp. JS614. Eine Oxygenase ist zusammengesetzt aus zwei oder drei Untereinheiten mit dem katalytischen Zentrum lokalisiert in der α -Untereinheit, einem Kopplungsprotein, einer Reduktase und in manchen Fällen einem Rieske-Typ Ferredoxin.

SDMs werden bezüglich der Aminosäuresequenz ihrer α -Untereinheit klassifiziert. Fast zeitgleich wurden zwei im Kern identische Systeme vorgestellt: Notomista und Kollegen entwarfen ein 6-Gruppensystem (Notomista et al. 2003), Leahy und Kollegen ein 4-Gruppensystem (Leahy et al. 2003). Später erweiterten Coleman und Kollegen letzteres System um zwei Gruppen mit in der Zwischenzeit neu charakterisierten Monooxygenasen (Coleman et al. 2006). Die bei diesem Aminosäuresequenzvergleich entstehenden Gruppen stellen keine Gruppierung im Sinne der biologischen Systematik dar. Eine Vielzahl an Spezies unterschiedlicher Abteilungen können eine oder mehrere SDMs beherbergen (Coleman et al. 2011). Vielmehr spiegeln die Gruppen gleichzeitig die Substrataffinität der SDMs sowie die Anzahl und Reihenfolge der Untereinheiten wieder, wie Abbildung 2-4 verdeutlicht. Hierbei können SDMs der Gruppen 2 und 3 sowohl aromatische als auch aliphatische Verbindungen oxygenieren (McClay et al. 2000; Colby et al. 1977; Ensign 2001; van Hylckama Vlieg et al. 1998), wohingegen Vertreter aus den anderen Gruppen entsprechend nur aromatische (CF600) oder aliphatische (JS614) Verbindungen transformieren. Die Benennung der Gruppen erfolgte nach den transformierten Substraten: Gruppe 1: Phenol-MOs, Gruppe 2: Aromaten-/Alken-/Isopren-MOs, Gruppe 3: lösliche Methan-MOs, Gruppe 4: Alken-MOs, Gruppe 5: 2-Propan-/Tetrahydrofuran-MOs, Gruppe 6: 1-Propan-MOs. Selbstverständlich wurden seither weitere SDMs mit entsprechender und neuer Substrataffinität beschrieben, die sich einerseits in dieses System einordnen lassen, andererseits eine Verfeinerung der Aufgliederung erfordern. Dies wird mit den in dieser Arbeit vorgestellten SDMs verdeutlicht (Abschnitt 3.4.1) und in den Abschnitten 4.5.1 sowie 4.5.7 diskutiert.

Grundlagen

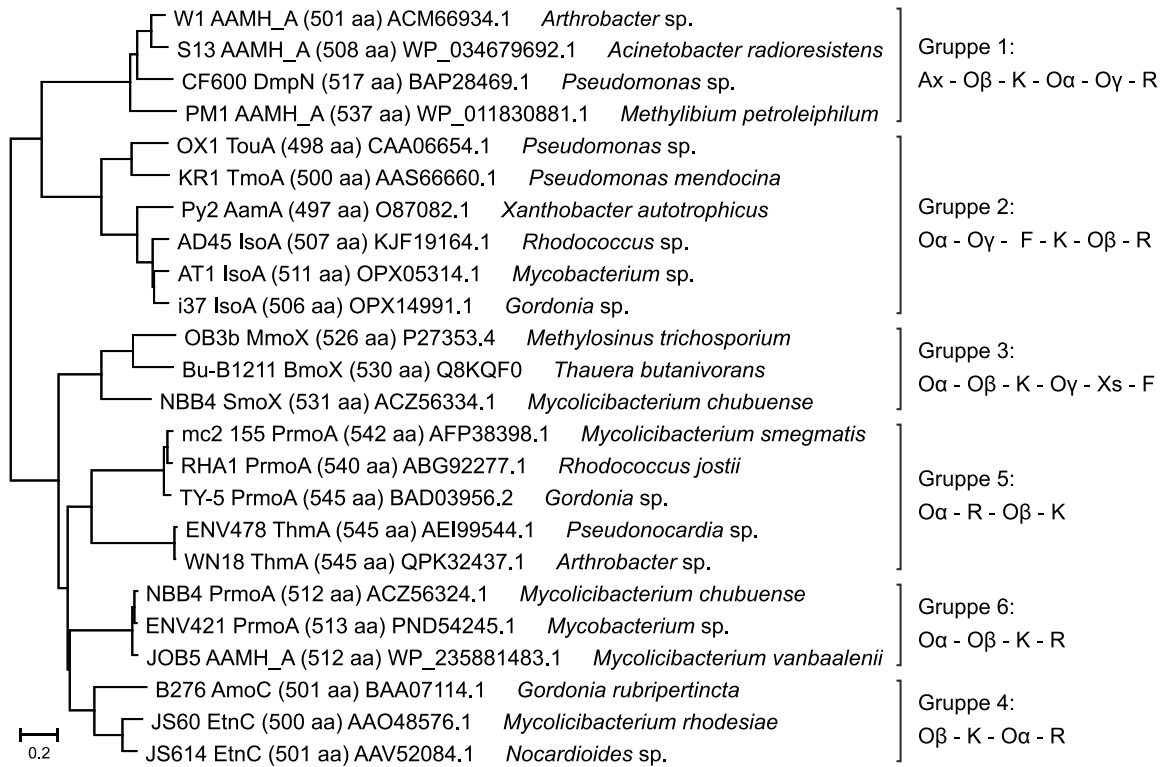


Abbildung 2-4 Evolutionäre Beziehungen von α -Untereinheiten ausgewählter SDMs

Substrataffinität und Operonstruktur werden durch verwandtschaftliche Gruppierung abgebildet. O: Oxygenase ($\alpha/\beta/\gamma$ -Untereinheit), K: Kopplungsprotein, R: Reduktase, F: Rieske-Typ Ferredoxin, Xs: Kupfer-Schalter, Ax: Regulator. Abbildung modifiziert nach Holmes und Coleman (Holmes und Coleman 2008).

SDMs aus der Gruppe 2 bestehen aus sechs Untereinheiten, die vier Komponenten bilden. Die Oxygenase besteht aus den Komponenten A, E und B, welche die α -, β - und γ -Untereinheiten ausmachen. Zusammen konstituieren sie ein $(\alpha\beta\gamma)_2$ -Heterohexamer (Sazinsky et al. 2004; McClay et al. 2000).

Komponente A: In der α -Untereinheit (56–59 kDa) ist das aktive Zentrum lokalisiert, in dem sich ein carboxyl-gebrücktes di-Eisen-Zentrum zwischen einem Bündel aus vier α -Helices befindet. Die Eisenliganden werden durch das für diese Enzymklasse charakteristische E...E/DXXH -Motiv koordiniert (Nordlund und Eklund 1995). Ein gegabelter Substrattunnel führt das Substrat zum aktiven Zentrum bzw. das Produkt wieder heraus (siehe Effektor-Protein, Komponente D). Insgesamt kann eine hohe Konservierung bezogen auf Sequenz und Struktur der Untereinheit über alle Gruppen der SDMs hinweg festgestellt werden. Dies wird durch die Notwendigkeit der Beibehaltung spezifischer Liganden am aktiven Zentrum und der Erhaltung einer gewissen Topologie um das aktive Zentrum begründet (Leahy et al. 2003).

Komponente E: Die β -Untereinheit (36–38 kDa) besitzt keine katalytische Aktivität und ist deshalb von den Einschränkungen der Konservierung befreit. Aufgrund ihrer Struktur- aber nicht Sequenzähnlichkeit zur α -Untereinheit ist sie vermutlich ein evolutionäres Duplikat, welches jedoch das aktive Zentrum verloren hat (Leahy et al. 2003). Die β -Untereinheit hat

eine strukturgebende Funktion. Zusammen mit der α -Untereinheit wird eine Schlucht gebildet, welche die Berührungsfläche der Dimerstrukturen ausmacht (Sazinsky et al. 2004).

Komponente B: Bisher unbekannt ist die Rolle der γ -Untereinheit (8–12 kDa). Es wird vermutet, dass sie eine stabilisierende Funktion für den Oxygenase-Komplex ausübt (Sazinsky et al. 2004). Allerdings könnte es sich auch um eine rein rudimentäre Untereinheit handeln, da SDMs der Gruppen 4, 5 und 6 ohne diese auskommen.

Die Elektronen für die Hydroxylierung oder Epoxidierung des Substrats der SDM stammen von NADH. Sie werden von einer Reduktase aufgenommen und über ein Ferredoxin sowie ein Kopplungsprotein zum aktiven Zentrum der Oxygenase transportiert. Das allgemeine Schema des Elektronentransports ist in Abbildung 2-5 dargestellt.

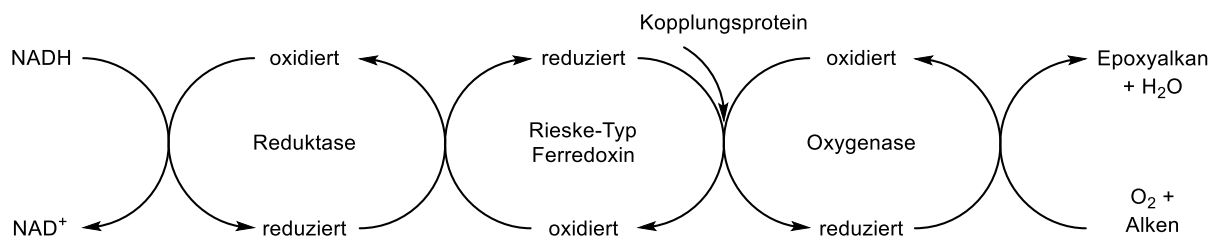


Abbildung 2-5 Elektronenübergang einer Alken-Monooxygenase mit vier Komponenten

NADH wird von der Reduktase oxidiert, die Elektronen werden über ein Rieske-Typ Ferredoxin und ein Kopplungsprotein dem aktiven Zentrum zugeführt, wo über das di-Eisen-Zentrum der Oxygenase molekularer Sauerstoff für eine Hydroxylierungs- oder Epoxidierungsreaktion aktiviert wird.

Komponente F: Die NADH-Oxidoreduktase (36–39 kDa) ist ein Eisen-Schwefel Flavoprotein. Es beinhaltet eine N-terminale Ferredoxin-Domäne und eine C-terminale FAD- sowie eine NADH-Bindedomäne. FAD bildet eine prosthetische Gruppe des Proteins. Ein CX₄CX₂CX₃₁₋₃₂C-Motiv koordiniert die Eisenliganden des [2Fe-2S] Clusters. Die Oxidoreduktase wird durch NADH reduziert, die Elektronen auf die prosthetische Gruppe übertragen. Danach bildet das Protein einen temporären Komplex mit dem Ferredoxin aus, in dem der Elektronenübergang vom FAD über den [2Fe-2S] Cluster der Oxidoreduktase auf den [2Fe-2S] Cluster des Ferredoxins stattfindet. Die somit oxidierte Oxidoreduktase löst sich abschließend vom reduzierten Ferredoxin ab (Acheson et al. 2015). Leahy und Kollegen bemerkten, dass das für die Ferredoxin-Untereinheit codierende Gen immer am Ende des Operons lokalisiert ist. Sie zogen daraus den Schluss, dass die Expression einer Oxidoreduktase ohne die anderen Untereinheiten nachteilig für die Zelle sei (Leahy et al. 2003). Mit der Charakterisierung der subterminal hydroxylierenden SDMs der Gruppe 5 (Abbildung 2-4) wurde jedoch gezeigt, dass das entsprechende Gen auch an anderer Stelle im Operon gereiht sein kann (Holmes und Coleman 2008).

Komponente C: Ein Ferredoxin (12–15 kDa) fungiert als obligater Elektronenmediator zwischen der Reduktase und dem aktiven Zentrum des Oxygenase-Komplexes (Small und Ensign 1997). Es ist wie die γ -Untereinheit der Oxygenase nur in SDMs der Gruppen 1, 2 und

3 vorzufinden. Ein CXH...CX₂H-Motiv bindet die Eisenliganden des Rieske [2Fe-2S] Clusters, der für den Elektronenübergang zuständig ist (Elsen et al. 2007). Das Protein ist für seine jeweilige SDM spezifisch und besitzt eine konservierte Topologie, da es sowohl an der Oxidoreduktase als auch der Schlucht des Oxygenasekomplexes für den Elektronentransport funktional binden muss. Im reduzierten Zustand geht es einen Komplex mit der Oxygenase ein, um die Elektronen des [2Fe-2S] Clusters auf das di-Eisen-Zentrum der Oxygenase zu übertragen.

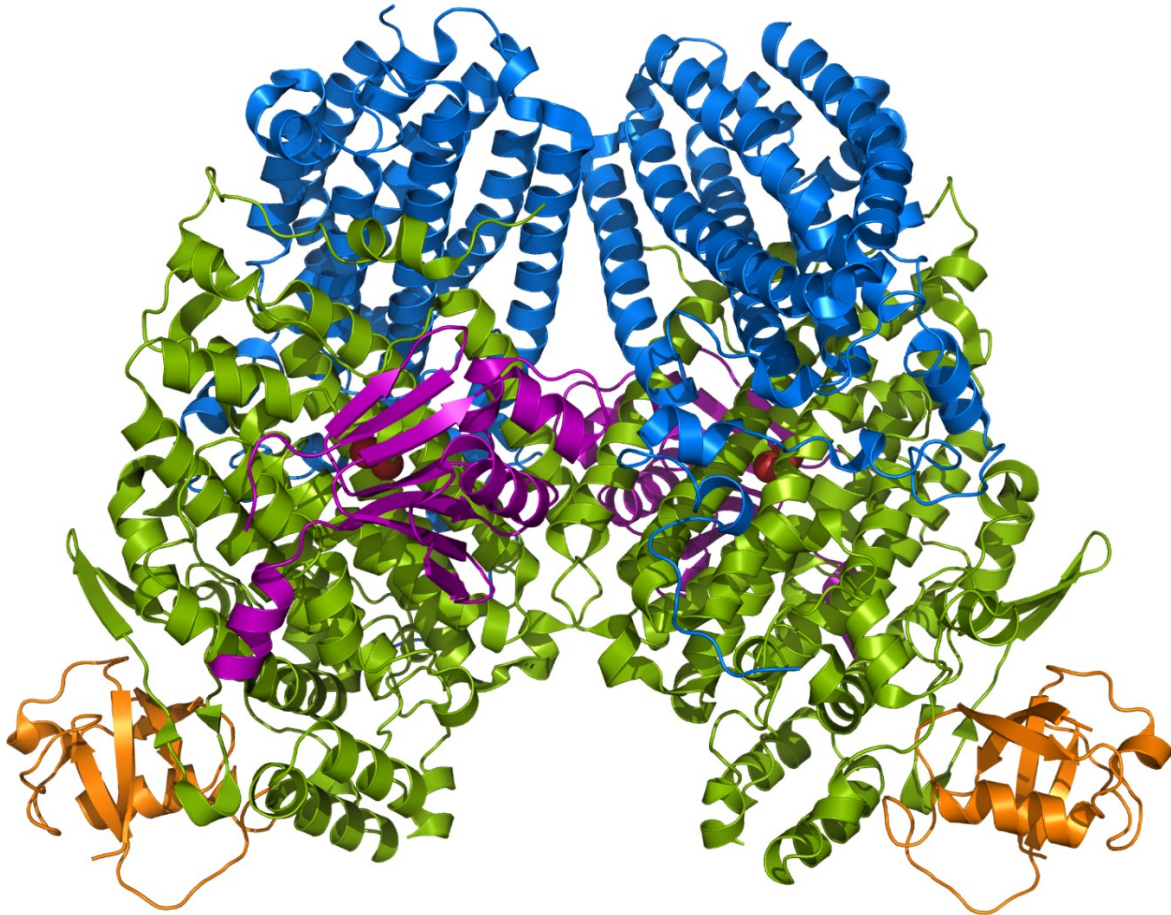


Abbildung 2-6 Hydroxylase-Effektorprotein-Komplex TouABED aus *Ps. mendocina* KR1

Modell (pdb: 3q3m) der Kristallstruktur des Heterohexamers der Oxygenase TmouABE aus *Ps. mendocina* KR1 im Komplex mit dem Effektorprotein TouD. TouA in grün mit di-Eisen-Zentrum, TouB in blau, TouE in orange, Tou D in violett.

Komponente D: Das Kopplungs- oder Effektorprotein (11–13 kDa) ist ein Polypeptid ohne Cofaktor und katalytische Aktivität (Zhou et al. 1999). Nach der Dissoziation des Ferredoxin-Oxygenase-Komplexes bindet es an die gleiche Stelle der Oxygenase (Acheson et al. 2015). Es bewirkt Konformationsänderungen der α -Untereinheit der Oxygenase, was eine Volumenänderung des aktiven Zentrums, die Änderung des Redoxpotenzials des di-Eisen-Zentrums sowie den Kollaps des Eingangs der Gabel des Substrattunnels zur Folge hat (Bailey et al. 2008b; Acheson et al. 2014).

Im Gegensatz zu Hydroxylierungen ist der Reaktionsmechanismus der Epoxidierung im aktiven Zentrum einer SDM bisher nicht beschrieben. Es ist jedoch zu vermuten, dass analog zur Hydroxylierung von Toluol ein Peroxo-Intermediat mit dem Alken gebildet wird, das nach Protonierung eines der Eisenatome homolytisch gespalten wird (Acheson et al. 2017).

2.4.2 Epoxid-Hydrolasen

Epoxid-Hydrolasen sind Teil einer von drei Familien an Enzymen, welche die Ringöffnung von Epoxiden bei der Transformation kurzkettiger Aliphaten katalysieren. Es wird jeweils ein spezifisches Nukleophil verwendet: Epoxyalkan-CoM-Transferasen nutzen das Coenzym M (Krishnakumar et al. 2008), Glutathion-S-Transferasen das Tripeptid Glutathion (Allocati et al. 2009) und Epoxid-Hydrolasen Wassermoleküle. Epoxide gelten aufgrund ihrer gespannten, energiereichen Ringstruktur als besonders reaktiv und können leicht mit Nukleotiden und Peptiden reagieren – mit entsprechend negativen Auswirkungen auf den Organismus (Arand et al. 2003a). Diese Enzyme spielen somit eine wichtige Rolle in der Entgiftung, sind aber auch bei der Virulenz (Bahl et al. 2016) und im Katabolismus (van Loo et al. 2006) relevant.

Die Öffnung eines Epoxidrings ist irreversibel und produziert im Fall der Epoxid-Hydrolasen ein nicht toxisches sowie wasserlöslicheres 1,2-Diol (Abbildung 2-7), welches je nach Substituenten optisch aktiv sein kann.

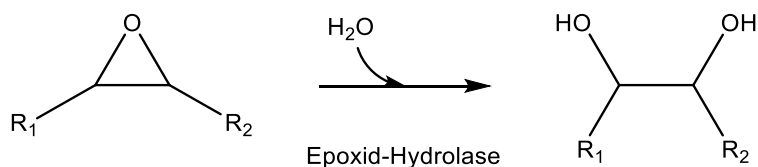


Abbildung 2-7 Reaktionsschema von Epoxid-Hydrolasen

Epoxide können durch Epoxid-Hydrolasen mit Wasser als Nukleophil zu 1,2-Diolen gespalten werden.

Die Superfamilie der Epoxid-Hydrolasen kann weiter unterteilt werden in Leukotrien A₄ (LTA₄)-Hydrolasen und α/β -fold-Hydrolasen, wobei letztere Gruppe aufgrund struktureller und katalytischer Unterschiede wiederum in Limonenepoxid-Hydrolasen (LEH) und Epoxid-Hydrolasen aufgegliedert werden kann (Arand et al. 2003a).

Obwohl genomische Analysen mikrobielle Epoxid-Hydrolasen ubiquitär bezeugen (van Loo et al. 2006; Stojanovski et al. 2020), sind Beschreibungen katabolisch involvierter Epoxid-Hydrolasen rar. In *Nocardia* sp. A60 konnte Propan-1,2-diol im Zellextrakt nach Zugabe von 1,2-Epoxypropan nachgewiesen werden (de Bont et al. 1982). Der Umsatz wurde einer nicht weiter charakterisierten Epoxid-Hydrolase zugeschrieben. In *Corynebacterium* sp. N-1074 wurde im Zellextrakt gezeigt, dass der Abbau von 1,3-Dichlor-2-propanol zu R-3-Chlor-1,2-propandiol über das Epoxid-Intermediat Epichlorhydrin abläuft (Nakamura et al. 1992;

Watanabe et al. 2015). Auch hier schrieb man die Epoxid-Spaltung einer Hydrolase zu. In *Mycobacterium* sp. ELW1 wurde der Umsatz von Isobutylenoxid zu Methylpropan-1,2-diol mittels Ruhezellen gezeigt und für diese Reaktion eine Epoxid-Hydrolase postuliert (Kottegoda et al. 2015).

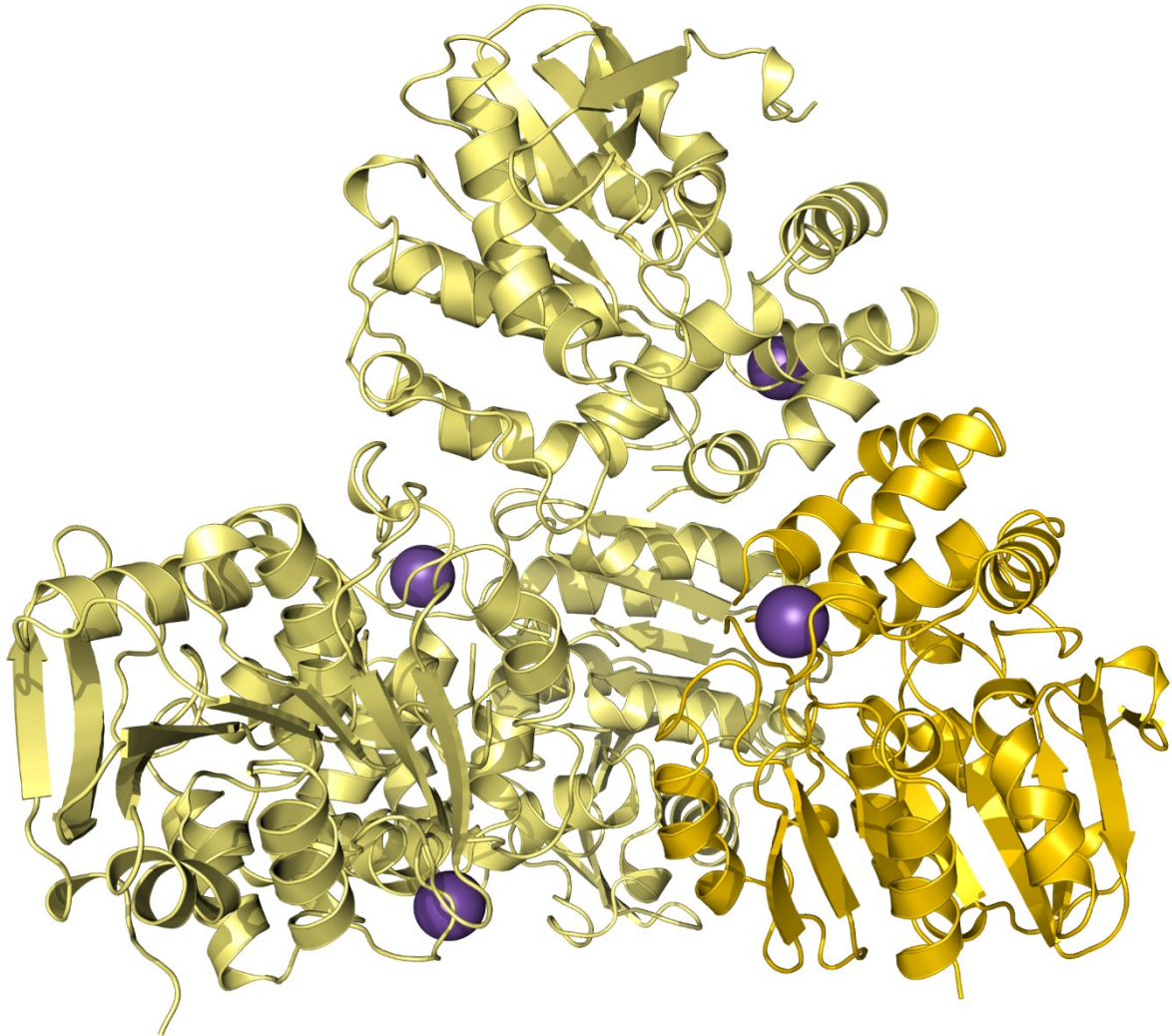


Abbildung 2-8 Epoxid-Hydrolase aus *Agrobacterium tumefaciens* AD1

Modell (pdb: 1ehy) der Kristallstruktur des Homotetramers der Epoxid-Hydrolase EchA aus *Agrobacterium tumefaciens* AD1. Monomer in gold, Kalium in violett.

In *Rhodococcus erythropolis* DCL 14 wird bei der Mineralisierung von *D*-Limonen der Metabolit (4*R*)-1,2-Epoxymenth-8-en mittels LEH zum korrespondierenden Diol umgewandelt (van der Werf et al. 1998; van der Werf et al. 1999). *Agrobacterium tumefaciens* AD1 wächst auf Epichlorhydrin; im Zellextrakt konnte ein Umsatz von Epichlorhydrin, Epibromhydrin, Glycidol und Epoxypropan zu den entsprechenden Diolen gezeigt werden (van den Wijngaard et al. 1989). Die Kristallstrukturen der LEH (pdb: 1nu3) aus Stamm DCL 14 (Arand et al. 2003b) und der Epichlorhydrin-Hydrolase (1ehy) aus Stamm AD1 (Nardini et al. 1999) konnten aufgelöst

werden. Im Folgenden wird weiter auf die Epichlorhydrin-Hydrolase aus Stamm AD1 eingegangen.

Das Enzym bildet ein α_4 -Homotetramer (Abbildung 2-8). Die Struktur eines Monomers kann in zwei Domänen aufgeteilt werden, die katalytische core-domain, bestehend aus acht β -Strängen verbunden durch α -Helices (Ollis et al. 1992) und die cap-domain. Das aktive Zentrum befindet sich in einer Spalte zwischen diesen beiden Domänen. Zwei konservierte Tyrosin-Reste der cap-domain koordinieren das Heteroatom im Epoxidring des Substrats. In der core-domain befindet sich eine konservierte Triade an Aminosäuren (Asp-His-Asp/Glu), die für die Aktivierung des Wassermoleküls und die Öffnung des Epoxidringes zuständig ist. Ein konserviertes HGXP-Motiv sitzt direkt hinter dem ringöffnenden Asparaginsäure-Rest der Triade und soll den Enzym-Substrat-Komplex stabilisieren. In einer Zwei-Schritt Reaktion (Abbildung 2-9) wird zunächst eines der Kohlenstoffatome des Epoxidrings nukleophil durch diesen Asparaginsäure-Rest kovalent gebunden. Ein Ladungsverschiebungnetzwerk bestehend aus den beiden anderen Mitgliedern der Triade, der Base Histidin und einer Säure (Asparagin- oder Glutaminsäure), aktiviert ein Wassermolekül und induziert so die Hydrolyse des Enzym-Substrat-Intermediates.

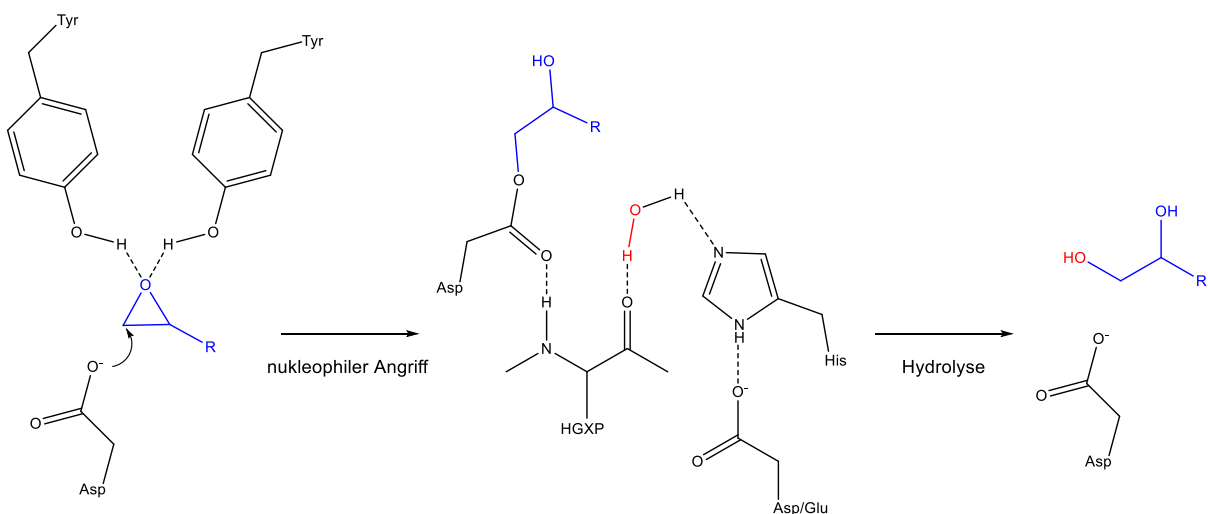


Abbildung 2-9 Epoxidhydrolyse

Zwei-Schritt Reaktionsmechanismus der Epoxidhydrolyse. Zwei Tyrosinreste koordinieren das Substrat (blau). Im ersten Schritt attackiert ein Asparaginsäure-Rest das Substrat und bildet ein kovalentes Enzym-Substrat-Intermediat. Im zweiten Schritt wird das Intermediat durch ein aktiviertes Wassermolekül (rot) hydrolysiert. Abbildung modifiziert nach van Loo und Kollegen (van Loo et al. 2006).

2.4.3 Acyl-CoA-Mutasen

Acyl-CoA-Mutasen können den Grad der Verzweigung einer Verbindung verändern und so ein breiteres Spektrum von Molekülen dem zentralen Metabolismus verfügbar machen. Sie katalysieren reversible Radikalreaktionen benachbarter Wasserstoffatome und CoA-aktivierter

Carboxylgruppen (Abbildung 2-10) mit Hilfe des Cofaktors Adenosylcobalamin (Vitamin B12, Abbildung 2-13). Das schwach kovalent gebundene Zentralion Cobalt ermöglicht eine homolytische Spaltung des Vitamins und die daraus resultierende Erzeugung eines Radikals (Marsh und Meléndez 2012). Dieses kann mit dem Substrat interagieren. Die Enzyme bestehen aus zwei Untereinheiten, bei der die große Untereinheit das Substrat und die kleine den Cofaktor koordiniert. Mit den Mutasen eng assoziiert sind GTP-abhängige Chaperone. Sie helfen beim korrekten Aufbau der Holo-Mutase, dienen als Schutzgruppe für die radikalischen Intermediate gegen oxidative Inaktivierung während der Reaktionskaskade und lösen den Cofaktor aus inaktiven Enzymen heraus (Padovani und Banerjee 2006; Cracan et al. 2010).

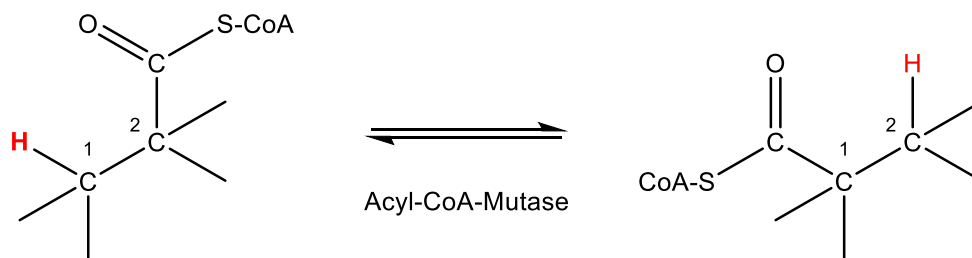


Abbildung 2-10 Reaktionsschema der Acyl-CoA-Mutasen

Vicinale Wasserstoffatome und CoA-aktivierte Carboxylgruppen können reversibel durch Acyl-CoA-Mutasen getauscht werden.

Acyl-CoA-Mutasen haben ein sehr enges Substratspektrum. Mit einer Ausnahme ist jeweils die Umwandlung nur eines Edukt-Produkt-Paares pro Enzymklasse bekannt. Die Methylmalonyl-CoA-Mutase MCM spielt eine Rolle im Abbau ungeradzahlgiger Fettsäuren, verzweigter Aminosäuren und in der Bereitstellung von Methylmalonyl-CoA für die Polyketid-Synthese, indem sie Methylmalonyl-CoA und Succinyl-CoA ineinander umwandelt (Dayem et al. 2002). Ebenfalls für die Polyketid-Synthese relevant sind Isobutyryl-CoA und *n*-Butyryl-CoA, welche von der Isobutyryl-CoA-Mutase ICM mutiert werden (Brendelberger et al. 1988). Die Assimilation von Acetat im Ethylmalonyl-CoA-Weg läuft über die Ethylmalonyl-CoA-Mutase ECM ab, die *R*-Ethylmalonyl-CoA und *S*-Methylsuccinyl-CoA isomerisiert (Erb et al. 2008). Im Abbau verzweigter Ether-Oxygenate wie ETBE und MTBE kommt die 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase HCM zum Einsatz, welche 2-Hydroxyisobutyryl-CoA und *S*- bzw. *R*-3-Hydroxybutyryl-CoA ineinander umwandelt (Yaneva et al. 2012; Weichler et al. 2015). Die Umwandlung von Pivalyl-CoA und Isovaleryl-CoA konnte mit einer Pivalyl-CoA-Mutase PCM (Kitanishi et al. 2015) und der Variante einer Isobutyryl-CoA-Mutase IcmF demonstriert werden (Cracan und Banerjee 2012).

Die Kristallstruktur der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase aus *Aquicola tertiarycarbonis* L108 konnte bestimmt werden (Kurteva-Yaneva et al. 2015). Das Enzym bildet ein $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer (Abbildung 2-11, nur das $\alpha\beta$ -Dimer dargestellt), welches durch die zwei großen Untereinheiten HcmA verbunden ist. Das mechanistische Modell dieser Reaktion ist in

Abbildung 2-12 für das Substrat 2-HIBA-CoA veranschaulicht, ist aber allgemein gültig für die Umlagerung anderer Substrate (z. B. Glutamat, Methylmalonyl-CoA, Isobutyryl-CoA, Ethylmalonyl-CoA, Pivalyl-CoA) durch korrespondierende spezifische Mutasen (Marsh und Meléndez 2012).

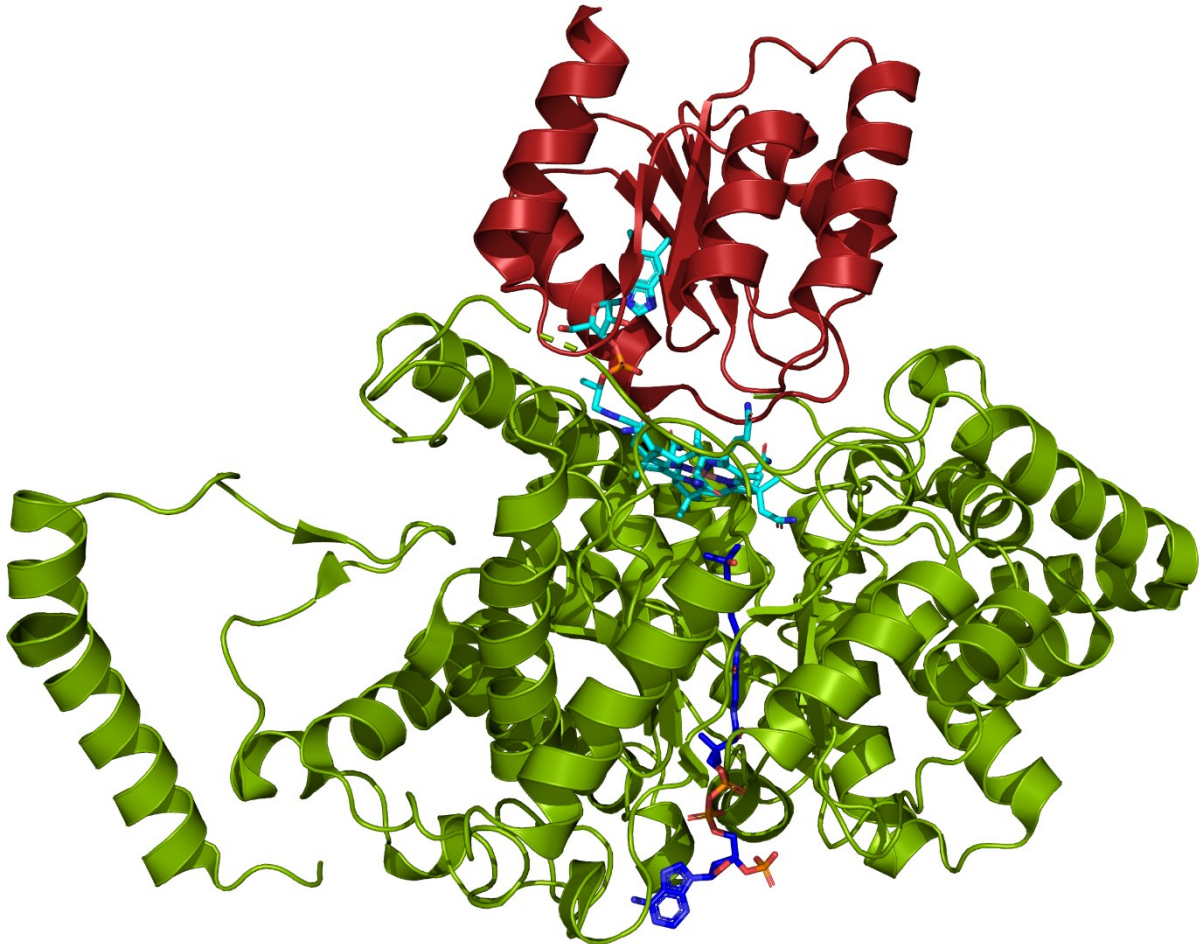


Abbildung 2-11 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase HcmAB aus *A. tertiaricarbonis* L108

Modell (pdb: 4r3u) der Kristallstruktur der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase HcmAB aus *A. tertiaricarbonis* L108. $\alpha\beta$ -Dimer des $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramers. HcmA in grün, HcmB in rot, Adenosylcobalamin in türkis, 3-Hydroxybutyryl-CoA in blau.

Die kleine Untereinheit HcmB bindet Adenosylcob(III)alamin und bietet es der großen Untereinheit HcmA dar. Mittels Homolyse wird aus dem Vitamin ein Adenosylradikal (Ado) geschaffen, welches an HcmA bindet, während der Corrin-Ring mit HcmB verbunden bleibt. Dieses Radikal abstrahiert und inkorporiert ein Wasserstoffatom des an HcmA gebundenen Substrates 2-HIBA-CoA, wodurch ein Substratradikal sowie ein hydriertes Adenosyl-Molekül erzeugt werden. Die CoA-aktivierte Carbonylgruppe des Substrats erfährt eine 1,2-Umlagerung durch HcmA; es entsteht ein lineares Produktradikal. Dieses abstrahiert nun wieder ein Wasserstoffatom des hydrierten Adenosyl-Moleküls und bildet so das finale Produkt 3-HBA-CoA sowie ein neues Adenosylradikal, welches wieder mit dem Cob(II)alamin

rekombiniert und sich von HcmB löst. Das Vitamin kann in einem nächsten Zyklus wiederverwendet werden (Marsh und Meléndez 2012). Die Umlagerung findet nicht mit der freien Säure statt. Die katalysierten Reaktionen sind reversibel, das *in vitro* Gleichgewicht liegt auf der Seite des Substrats (Yaneva et al. 2012).

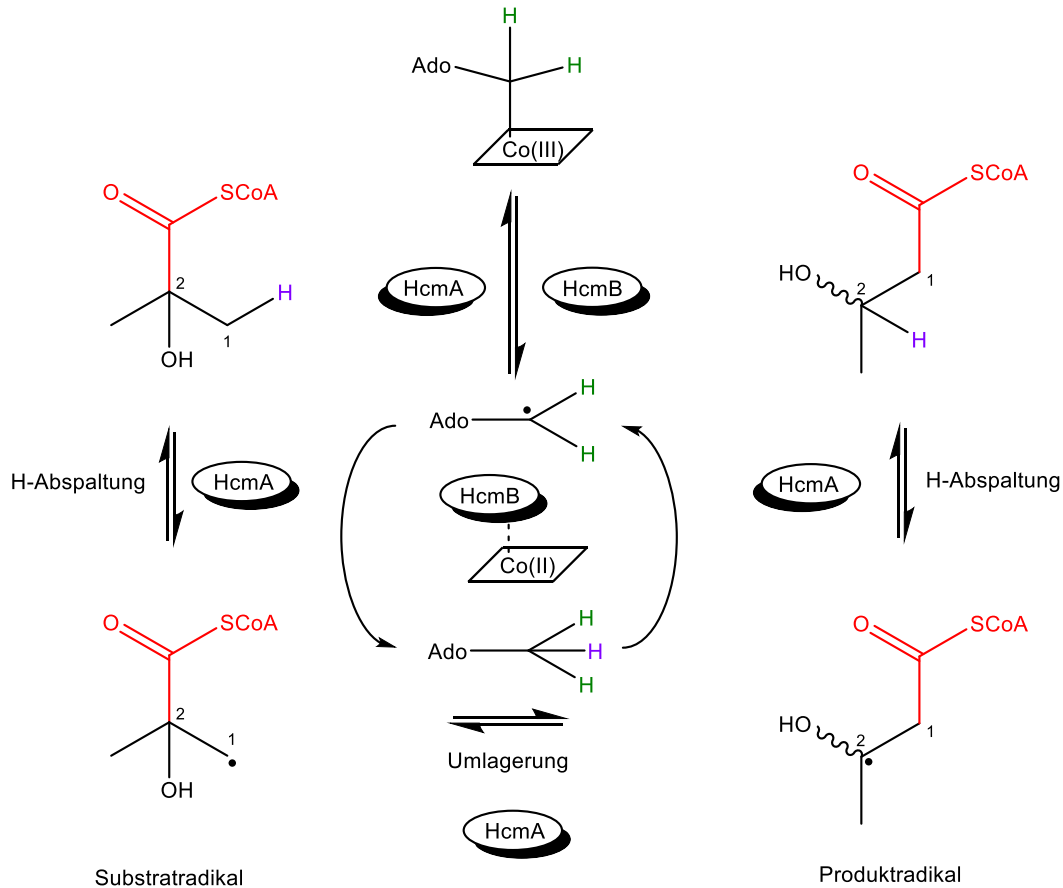


Abbildung 2-12 Reaktionsschema der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase

Radikalische, Vitamin B12-abhängige Linearisierung von 2-HIBA zu 3-HBA und Adenosylcobalamin-Zyklus. Die zu bewegendende CoA-aktivierte Carboxylgruppe ist in rot, die zu bewegendenden Wasserstoffatome in grün und violett dargestellt. Die beteiligten Untereinheiten sind in Ovalen eingefasst, Co(x) im Rhomboid stellt den planaren Corrinring mit dem Cobaltion im jeweiligen Oxidationszustand dar. HcmB bindet Adenosylcobalamin, welches von HcmA und HcmB durch Homolyse gespalten wird. HcmA bindet das Substrat und das Adenosyl-Radikal (Ado), abstrahiert Wasserstoff (H) und mutiert das Substrat. Abbildung modifiziert nach Marsh und Meléndez (Marsh und Meléndez 2012).

2.4.4 Synthese von Adenosylcobalamin

Adenosylcobalamin (AdoCbl) ist ein essenzielles Coenzym für Acyl-CoA Mutasen, welche vicinale Wasserstoffatome und CoA-aktivierte Carboxylgruppen reversibel tauschen können (Abschnitt 2.4.3). Es ist dasjenige Vitamin mit der größten Molekülstruktur, bestehend aus einem Cobalt-chelatierenden Corrin sowie einem Dimethylbenzimidazolribonucleotid- und einem Adenosyl-Liganden (Abbildung 2-13). Letzterer wird bei der Mutasereaktion radikalisch abgespalten.

Grundlagen

Drei bakterielle Synthesewege sind hierfür beschrieben (Fang et al. 2017), die *de novo*-Synthese, welche es in einer aeroben sowie einer anaeroben Variante gibt sowie der sogenannte salvage-Weg (Abbildung 2-14). Letzterer erfordert eine externe Cobinamid-Quelle sowie einen entsprechenden ABC-Transporter, wohingegen der Porphyrin-Ring bei den *de novo*-Wegen aus 5-Aminolaevulinat synthetisiert wird. Die *de novo*-Synthese kann entweder über den C4- oder den C5-Weg eingeleitet werden, wobei die Vorstufe 5-Aminolaevulinat entweder aus Glutamat (C5) oder Succinyl-CoA (C4) in Kombination mit Glycin synthetisiert wird.

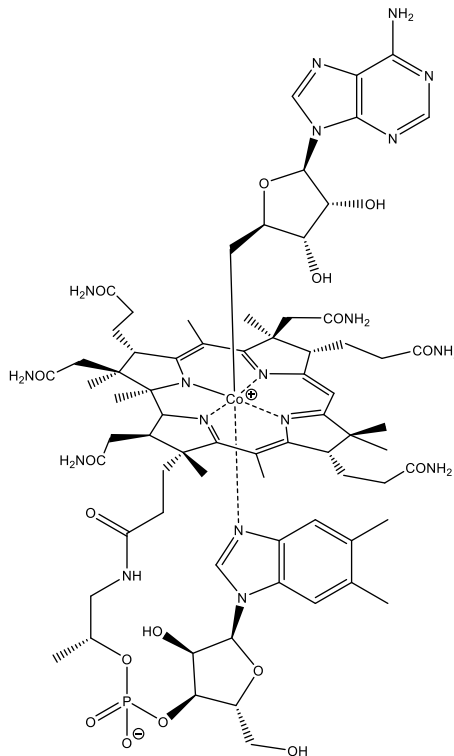


Abbildung 2-13 Adenosylcobalamin

Adenosylcobalamin ist das Vitamin mit der größten Molekülstruktur. Im Zentrum steht ein Corrin, ein Cobalt-chelatierender Tetrapyrrol-Ring. Dieser ist mit einem Propionsäure-Rest sowie mehreren Methyl-, Acetamid- und Propionamid-Resten substituiert. Am Propionsäure-Rest ist über einen Amino-2-propanol-Linker ein 5,6-Dimethylbenzimidazolribonucleotid verbunden, welches mit dem freien Stickstoffatom des Imidazol-Ringes das Cobalt-Ion von der Unterseite des Corrins mit chelatiert. Der namensgebende Adenosyl-Rest befindet sich oberhalb des Corrins und ist mit dem Cobalt-Ion kovalent verknüpft. Diese Bindung wird bei der Mutasereaktion radikalisch gespalten. Abbildung gemäß Hodgkin und Kollegen (Hodgkin et al. 1957).

Zwei Moleküle 5-Aminolaevulinat werden zu Porphobilinogen kondensiert, wovon wiederum vier Moleküle polymerisiert und zu Uroporphyrinogen III zyklisiert werden. Es erfolgen schrittweise acht Methylierungsreaktionen des Ringes sowie die Ringverkürzung zum Corrin-Gerüst. Anschließend werden zwei Carboxylreste amidisiert. Das Cobalt-Ion wird nun in den Corrin-Ring eingebracht und der Adenosin-Ligand damit verknüpft. Alle bis auf einen Carboxylrest werden amidisiert. Am verbliebenen freien Propionsäure-Rest wird ein Amino-2-

Grundlagen

propanol-Linker angehängt, dessen Hydroxygruppe phosphoryliert und danach über GTP aktiviert wird. In einem Nebenweg wird aus einem Molekül Flavinmononukleotid das α -Ribazol-5'-phosphat synthetisiert sowie mit dem Adenosylcobinamid-GDP verbunden. Im abschließenden Schritt chelatiert das freie Stickstoffatom des Imidazol-Ringes mit dem Cobalt-Ion, und der Phosphatrest an der 5'-Position wird entfernt.

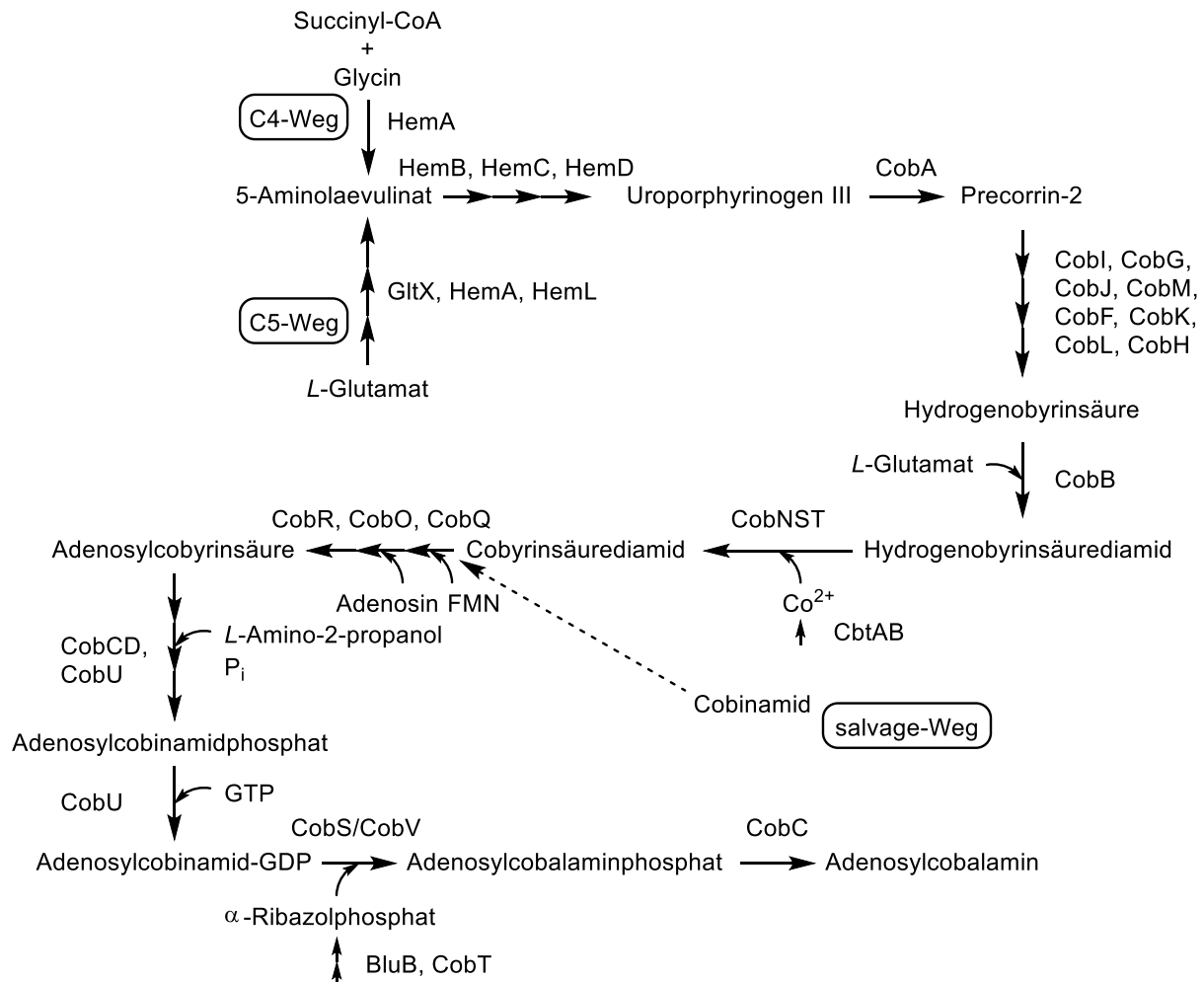


Abbildung 2-14 Syntheseweg von Adenosylcobalamin

Vereinfachte Darstellung des aeroben *de novo*-Synthesewegs von Adenosylcobalamin inklusive der C4- und C5-Wege der 5-Aminolaevalinat-Synthese. Fließschema gemäß Fang und Kollegen (Fang et al. 2017).

2.4.5 Abbau von MP, strukturanaloger Stoffe und möglicher Metabolite

Es sind verschiedene Bakterien beschrieben, die MP oxidieren können oder mit deren Zellextrakt eine Transformation des Stoffes gezeigt werden konnte (Abschnitt 2.4.5.1). Jedoch ist bisher nur ein einziger Stamm bekannt, der MP als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann. Der entsprechende Abbauweg wurde basierend auf der Analyse von Metaboliten im Medium und Wachstum des Stammes auf diesen Metaboliten postuliert (Abschnitt 2.4.5.6).

Aufbauend auf Abbildung 2-1 werden Oxidationsschritte und Abbauege vorgestellt, welche strukturanaloge Stoffe oder mögliche Metabolite behandeln. Diese können in Gänze oder in Teilen für MP anwendbar sein.

2.4.5.1 Oxidation von Methylpropen

Die initiale Oxidation von MP gibt die Folgeschritte des Abbaueges vor (Abbildung 2-1). Sowohl die Monohydroxylierung zu 2-Methylprop-2-en-1-ol als auch die Epoxidierung zu 1,2-Epoxy-2-methylpropan konnten gezeigt werden.

In einem Ruhezellen-Ansatz mit *E. coli* JM109 pIP107D konnte nach 20 Stunden Inkubation der terminale Alkohol per GC-MS nachgewiesen werden. Der Beweis erfolgte sowohl per Abgleich der Retentionszeit mit einem Standard als auch über das Massenspektrum (Takami et al. 1999). Das eingesetzte Plasmid trägt die Gene für die Cumen-Dioxygenase (*cumA1A2orf3A3A4*) aus *Pseudomonas fluorescens* IP01 (Aoki et al. 1996).

Der Autorengruppe um Takami gelang ebenfalls in einem Ruhezellen-Ansatz mit *E. coli* pAU96 die Transformation zu 1,2-Epoxy-2-methylpropan. Das dort eingesetzte Plasmid trägt die Gene für die Dimethylsulfid-Monooxygenase (*dsoABCDEF*) aus *Acinetobacter* sp. 20B (Horinouchi et al. 1997).

In der löslichen Fraktion von Zellextrakten des Methanotrophen *Methylobacterium* sp. CRL-26 (Patel et al. 1982) und des Propan-Abbauers *Brevibacterium* sp. CRL56 (Hou et al. 1983) wurde nach NADH-Umsatzversuch mit MP das Epoxid per GC-FID im Vergleich der Retentionszeiten mit Standards detektiert. Im Falle des Stammes CRL-26 wurde diese Transformation einer löslichen Methan-Monooxygenase zugeschrieben.

Ruhezellen des Propen-Abbauers *X. autotrophicus* Py2 (Ensign 1996) sowie Ethen-Abbauers *Nocardioides* sp. JS614 (Owens et al. 2009) waren in der Lage, MP zu epoxidieren. Bei Stamm Py2 wurde das Produkt in der Flüssigphase, bei Stamm JS614 im Gasraum, jeweils mittels GC-FID, nachgewiesen. Der Umsatz wurde der Propen-Monooxygenase XamoABCDEF bzw. der Ethen-Monooxygenase EtnABCD zugeschrieben.

2.4.5.2 Aerober Abbau von L-Valin

L-Valin ist neben L-Leucin und L-Isoleucin eine der drei verzweigten proteinogenen Aminosäuren. Identische Abbauege existieren mit wenigen Ausnahmen (*E. coli*, *S. cerevisiae* → Stickland-Gärung und Abbaueg nach Ehrlich) in allen Lebewesen; die meisten Untersuchungen bei Prokaryoten wurden jedoch an *Bacillus* sp. und *Pseudomonas* sp. durchgeführt (Norton und Sokatch 1970; Namba et al. 1969; Bannerjee et al. 1970). Die ersten drei Schritte erfolgen für alle verzweigten Aminosäuren gleichermaßen: Initial wird mittels Aminotransferase eine Transaminierung durchgeführt, bei der die Aminogruppe auf α -Ketoglutarat übertragen wird (Abbildung 2-15). Die entstehende α -Ketosäure wird von einem

spezifischen Dehydrogenase-Komplex (Decarboxylase für verzweigt-kettige α -Ketosäuren (E1), Lipoamid-Acyltransferase (E2), Lipoamid-Dehydrogenase (E3)) decarboxyliert und die α -Ketocarbonsäure mit Coenzym A aktiviert. Neben letzterem werden die Cofaktoren TPP, Liponsäure, FAD und NAD benötigt. Das verzweigte Acyl-CoA wird analog der Reaktion zum ersten Schritt der β -Oxidation durch eine Acyl-CoA-Dehydrogenase dehydriert; beim *L*-Valin-Abbau entsteht Methacrylyl-CoA. Eine mögliche Hydroxylierung von Methylpropen und weitere Oxidation würden 2-Methylprop-2-en-1-ol und Methacrylsäure ergeben, welche nach CoA-Aktivierung in den *L*-Valin-Abbau einmünden könnte (Abbildung 2-1).

Die folgenden Schritte sind *L*-Valin-spezifisch: Eine Enoyl-CoA Hydratase addiert Wasser endständig. Es entsteht 3-Hydroxy-Isobutanoyl-CoA. Der Thioester wird anschließend durch eine Hydrolase zur freien Säure gespalten, welche in einem Folgeschritt zu *S*-Methylmalonat-Semialdehyd dehydriert wird. In einer weiteren oxidativen Decarboxylierung wird das Semialdehyd durch die Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase MMSD in CO_2 und Propanoyl-CoA gespalten. Propanoyl-CoA kann nach Carboxylierung und der Vitamin B12-abhängigen Linearisierung durch die Methylmalonyl-CoA-Mutase MCM als Succinyl-CoA in den Zitronensäurezyklus eingehen (Massey et al. 1976).

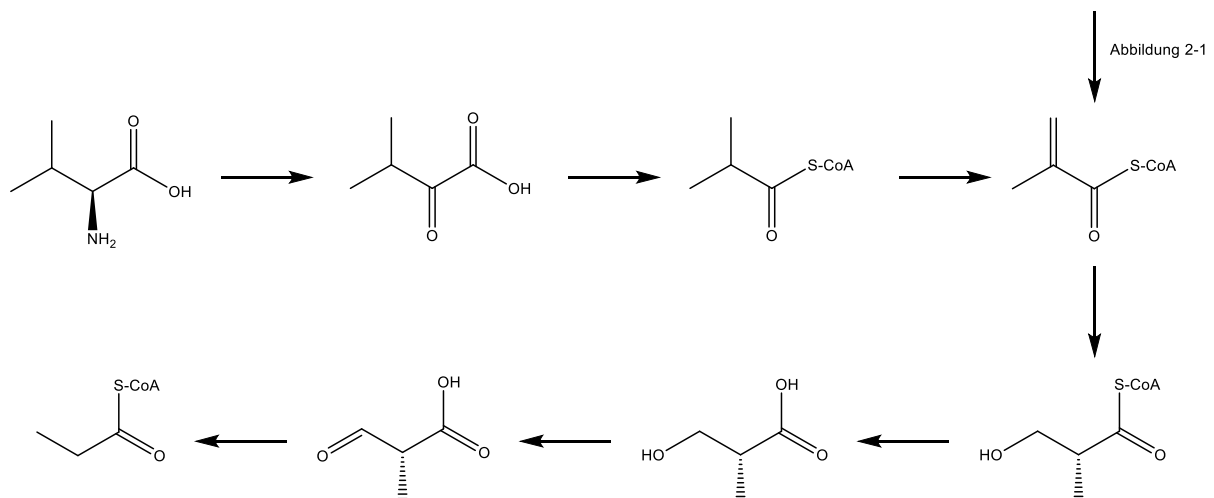


Abbildung 2-15 Aerober Abbau von *L*-Valin

Aerober Abbauweg der verzweigten Aminosäure *L*-Valin zu Propionyl-CoA nach Massey und Kollegen (Massey et al. 1976). Eine mögliche Hydroxylierung von Methylpropen und weitere Oxidation würden 2-Methylprop-2-en-1-ol und Methacrylsäure ergeben (Abbildung 2-1), die nach CoA-Aktivierung in den *L*-Valin-Abbau einmünden könnte.

2.4.5.3 Aerober Abbau von Ethen, Vinylchlorid, Propen

Kurzkettige 1-Alkene sind wichtige Industriegase, von denen Ethen auch natürlicherweise von Pflanzen produziert wird. Als Phytohormon dient es der Blütenausbildung und Fruchtreifung, des Blattabwurfs sowie als Signalstoff zwischen Individuen zur Giftstoffproduktion bei Schädlingsbefall oder Verwundung.

1-Alkene können von verschiedenen Bakterien mineralisiert werden, u.a. von solchen, die aus Boden: *Nocardioides* sp. JS614, *Gordonia rubripertincta* B-276, aus Wasser: *Xanthobacter autotrophicus* Py2, aus Süßwassersediment: *Mycobacterium chubuense* NBB4, aus Grundwasser: *Mycolicibacterium rhodesiae* JS60, und aus Belebtschlamm: *Pseudomonas aeruginosa* MF1 isoliert wurden (Furuhashi et al. 1981; van Ginkel und Bont 1986; Verce et al. 2000; Coleman et al. 2002; Coleman et al. 2006). So wurde beispielsweise *Nocardioides* sp. JS614 auf Ethen aus Boden einer Industrieanlage isoliert und kann Vinylchlorid sowie Vinylfluorid als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen (Coleman et al. 2002). Unter Supplementierung von Ethenoxid ist ein Wachstum auf Propen und für einen kurzen Zeitraum auch auf 1-Buten möglich. Während das Wachstum auf Ethen unabhängig von der Anwesenheit von CO₂ stattfand, war bei CO₂-freier Atmosphäre kein Wachstum auf Propen zu verzeichnen (Taylor et al. 2010). Nicht alle beschriebenen Mikroorganismen weisen dieses Substratspektrum auf. *Mycolicibacterium rhodesiae* JS60 kann ebenfalls Ethen und Vinylchlorid mineralisieren, nicht jedoch Propen (Coleman und Spain 2003b). In *Gordonia rubripertincta* B-276 und *Xanthobacter autotrophicus* Py2 wurde verstärkt der Propen-Abbau untersucht. Stamm B-276 kann ebenfalls u.a. auf Ethen und 1-Buten wachsen, Py2 auf Ethen (Furuhashi et al. 1981; van Ginkel und Bont 1986).

Der Abbau von 1-Alkenen beginnt mit einer Monooxygenasereaktion an der Doppelbindung; es werden entsprechende Epoxide erzeugt (Abbildung 2-17). Im Falle von Propen entsteht ein Racemat an *L*- und *D*-Epoxypropan. Die Ringöffnung des Epoxids wird durch die Addition von Coenzym M (CoM) durch eine Zink-abhängige Epoxyalkan-CoM-Transferase (EaCoMT) erreicht. Diese akzeptiert beide Epoxypropan-Isomere. War Vinylchlorid das ursprüngliche Substrat, geht die Chloridgruppe spontan ab; es entsteht ein Aldehyd-CoM-Konjugat. Wurde Ethen oxidiert, wird der endständige Alkohol durch eine Dehydrogenase zum korrespondierenden Aldehyd oxidiert. Beide Male unterläuft das Aldehyd einen weiteren Dehydrogenase-katalysierten Oxidationsschritt zur entsprechenden Säure. Eine carboxylierende 2-Oxoethyl-CoM-Reduktase reduziert die Thioether-Bindung, setzt somit den CoM-Rest frei und carboxyliert das Carbanion zur Malonylsäure. Diese kann im zentralen Metabolismus verwertet werden.

Bei der Propenoxidation werden die 2-Hydroxypropyl-CoM-Enantiomere jeweils durch eine spezifische Dehydrogenase zum nicht chiralen 2-Ketopropyl-CoM oxidiert. Der nächste Schritt läuft analog zur Ethenoxidation ab: Eine 2-Oxopropyl-CoM-Reduktase erzeugt Acetoacetat, welches nach CoA-Aktivierung in zwei Acetyl-CoA Moleküle gespalten werden kann.

Grundlagen

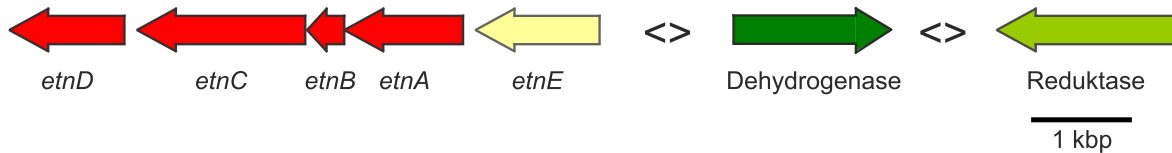


Abbildung 2-16 Ethen-Monooxygenase-Operonstruktur in *Nocardiooides* sp. JS614

etnABCD: Ethen-Monooxygenase (CP000508.1), *etnE*: Epoxyalkan-CoM-Transferase, Dehydrogenase: Alkohol/Aldehyd-Dehydrogenase, *Reduktase*: 2-Oxoalkyl-CoM-Reduktase, $\langle \rangle$ Abstand nicht maßstabsgetreu.

Die Gene für den Abbau von Ethen liegen in *Nocardiooides* sp. JS614 auf einem linearen Megaplasmid vor (Abbildung 2-16). Nach Entfernung desselben konnte der Stamm nicht mehr auf Ethen und VC wachsen. Die Aktivität der Ethen-Monooxygenase EtnABCD sowie der EaCoMT EtnE konnte im Rohextrakt gezeigt werden. Gene für die beiden Enzyme liegen in einem Operon organisiert zusammen mit einer CoA-Transferase, Acyl-CoA-Synthetase, Dehydrogenase und Reduktase vor (Mattes et al. 2005). Die Ergebnisse konnten später mittels

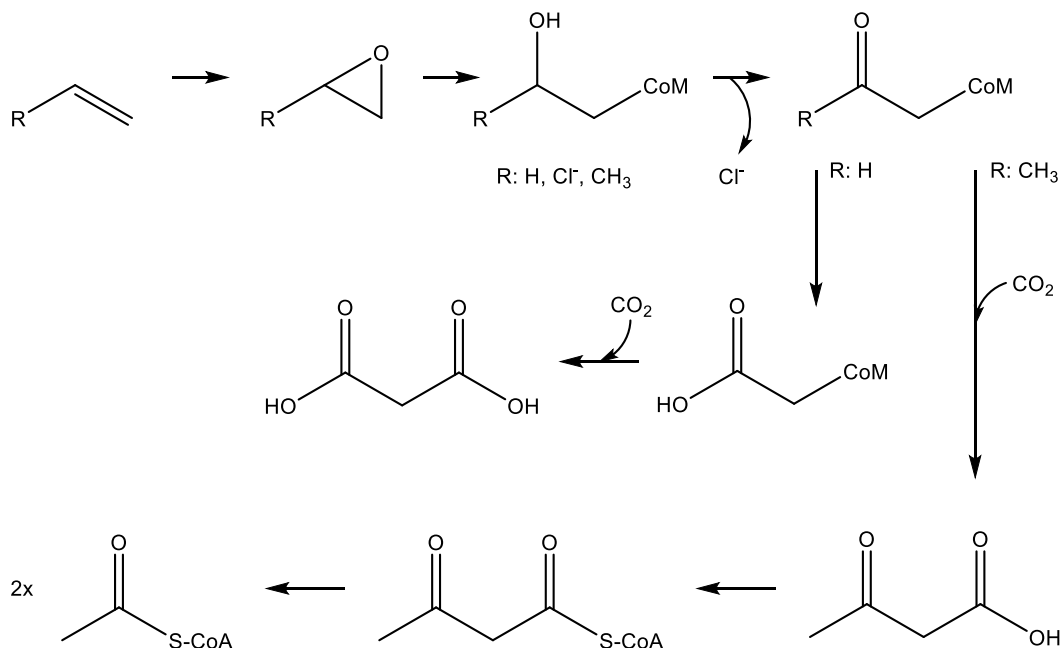


Abbildung 2-17 Aerober Abbau von kurzkettigen Alkenen

Aerober Abbau von Ethen/Propen/Vinylchlorid (Chuang und Mattes 2007; Broberg und Clark 2010). Das Alken wird durch eine Monooxygenase epoxidiert und der Ring mittels CoM-Transferase geöffnet. War Vinylchlorid (VC) das ursprüngliche Substrat, geht die Chloridgruppe spontan ab. Es entsteht ein Aldehyd-CoM-Konjugat, welches im Falle der Oxidation von Ethen durch eine Dehydrogenase erzeugt wird. Beide Male unterläuft das Aldehyd einen weiteren Dehydrogenase-katalysierten Schritt zur entsprechenden Säure. Der CoM-Rest wird anschließend durch eine Reduktion entfernt und das Carbanion zur Malonylsäure carboxyliert.

Das bei der Propen-Oxidation entstehende 2-Ketopropyl-CoM wird zu Acetoessigsäure carboxyliert und nach CoA-Aktivierung in zwei Acetyl-CoA gespalten.

Peptidmassen Fingerprint in einer differenziellen SDS-PAGE (Ethen, VC, Ethenoxid gegen Acetat) verifiziert und verfeinert werden (Chuang und Mattes 2007).

Auch in den Propen-abbauenden Stämmen B-276 und Py2 liegen die entsprechenden Gene für den Abbau jeweils auf einem Megaplasmid (Saeki et al. 1999; Krum und Ensign 2001). Sowohl die Propen-Monooxygenasen XamoABCDE (Py2) und AmoABCD (B-276) als auch die beiden EaCoMT wurden heterolog funktional exprimiert (Zhou et al. 1999; Smith et al. 1999; Krum und Ensign 2001). Im Rohextrakt von Stamm B-276 konnte eine CO₂-, NAD- sowie Dithiothreitol-abhängige Konversion von Epoxypropan zu Acetoacetat gezeigt werden (Allen, 1998).

2.4.5.4 Aerober Abbau von Isopren

Isopren wird von vielen Pflanzen produziert und hat mit $5 \cdot 10^8$ Mg/a den drittgrößten Anteil an in die Atmosphäre entweichendem Kohlenstoff (Guenther et al. 2012). Eine Vielzahl an Mikroorganismen unterschiedlicher Gattungen, welche Isopren als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können, konnte aus verschiedenen Umweltkompartimenten isoliert werden, z. B. Frischwassersediment: *Rhodococcus* sp. AD45, *Micrococcus* sp. i61b, Blätter: *Rhodococcus* sp. ACPA4, *Sphingopyxis* sp. OPL5, Boden: *Ramlibacter* sp. WS9, *Variovorax* sp. WS11, Meerwasser: *Gordonia* sp. i37, *Mycobacterium* sp. AT1 (van Hylckama Vlieg et al. 1998; Alvarez et al. 2009; Johnston et al. 2017; Crombie et al. 2017; Larke-Mejía et al. 2019). Ihnen gemein ist ein einziger, jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärter Abbauweg. Weder Archaeen oder Pilze, noch Anaerobier, die Isopren abbauen können, sind bis dato bekannt (McGenity et al. 2018).

In den aeroben Bakterien wird Isopren initial von einer löslichen di-Eisen-Monooxygenase unter Verbrauch von NADH an der Doppelbindung von Kohlenstoff 2 und 4 attackiert (Abbildung 2-19). Das gebildete Epoxid wird mittels einer Glutathion-S-Transferase geöffnet und mit Glutathion konjugiert; es entsteht 2-(Glutathion-S-yl)-2-methylbut-3-en-1-ol. Glutathion als essenzieller Cofaktor konnte ausgemacht und das Konjugat per NMR-Spektroskopie identifiziert werden (van Hylckama Vlieg et al. 1998; van Hylckama Vlieg et al. 1999). Der Alkohol-Rest wird anschließend von einer Dehydrogenase unter Regeneration von NAD zur Carbonsäure oxidiert (van Hylckama Vlieg et al. 1999). Die weiteren Schritte sind unbekannt. Es wird vermutet, dass zunächst der Säurerest CoA-aktiviert, der Glutathionyl-Rest abgespalten wird und dann das entstehende chirale Produkt, vorzugsweise (2S)-Methylbutanoyl-CoA, in den L-Isoleucin-Abbau einfließt (Dawson et al. 2022).

Die für die bekannten Schritte notwendigen Gene liegen auf einem Megaplasmid in einem konservierten Cluster vor (Abbildung 2-18), erstmals identifiziert im Stamm *Rhodococcus* sp. AD45. Upstream der Isopren-Monooxygenase (*isoABCDE*) liegen die Gene für die Transferase (*isoI*) und Dehydrogenase (*isoH*) (van Hylckama Vlieg et al. 2000).

Grundlagen

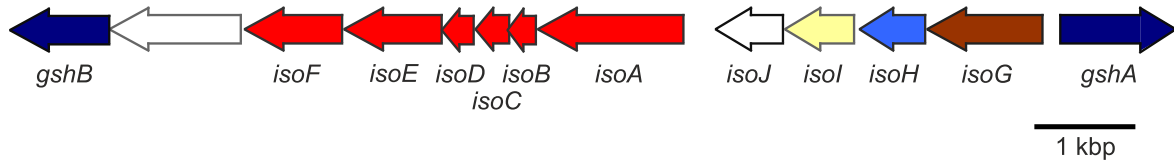


Abbildung 2-18 iso-Operonstruktur in *Rhodococcus sp. AD45*

gshAB: Glutathion-Synthase, *isoABCDEFG*: Isopren-Monooxygenase (JYOP01000009), *isoJ*: unbekannte Funktion, *isoI*: Glutathion-S-Transferase, *isoH*: Dehydrogenase, *isoG*: CoA-Ligase.

IsoA, IsoE, IsoF, GshB, IsoJ, IsoI, und IsoH konnten per Peptidmassen Fingerprint in einer differenziellen SDS-PAGE (Isopren gegen Succinat) identifiziert werden. Ein Knock-out von IsoA sowie die Entfernung des Megaplasmids führten dazu, dass Stamm AD45 nicht mehr auf Isopren wuchs. Die durch Isopren sowie Epoxyisopren induzierte Gene *isoGHIJABCDEF* konnten per Transkriptom-Analyse bestätigt werden (Crombie et al. 2015).

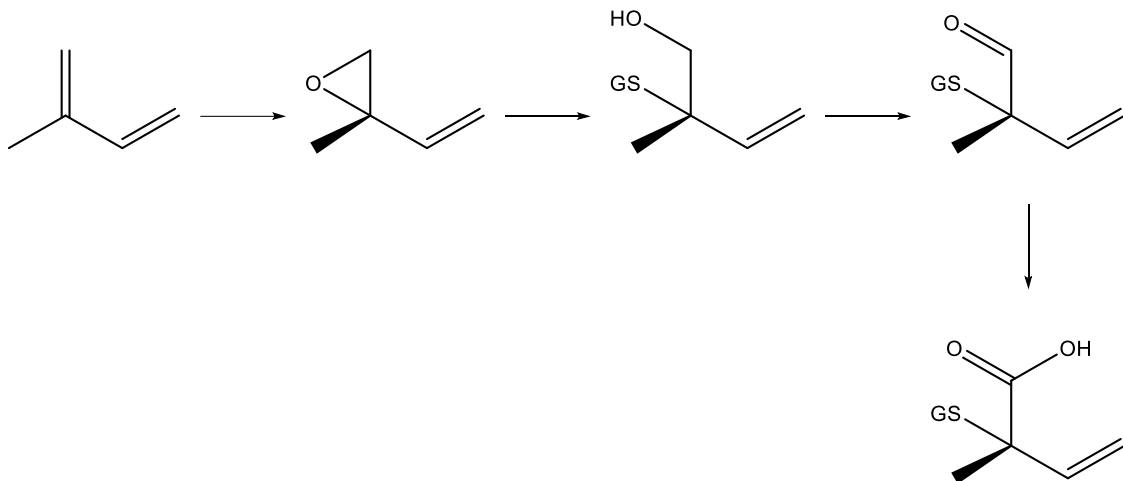


Abbildung 2-19 Aerober Abbau von Isopren

Partiell aufgeklärter aerober Abbauweg von Isopren nach van Hylckama Vlieg und Kollegen (van Hylckama Vlieg et al. 1998). Eine Monooxygenase epoxidiert die Doppelbindung der Kohlenstoffatome 2 und 4, der Epoxidring wird mittels Glutathion-Transferase geöffnet. Der Alkohol-Rest wird zur Säure oxidiert. Die weiteren Schritte sind unbekannt.

Kürzlich konnte der Stamm *Alcaligenes sp. 13f* auf Isopren als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle isoliert werden; sein Genom beinhaltet weder die typische Isopren-Monooxygenase noch die Glutathion-Transferase (Uttarotai et al. 2022). Untersuchungen zu einem neuartigen Isopren-Abbauweg stehen aus.

2.4.5.5 Aerober Abbau von *tert*-Butanol

MTBE und ETBE lösten in den 1990er Jahren Tetraethylblei als Klopfschutzmittel in Ottokraftstoffen ab. Seither kam es zu Tankleckagen, woraufhin die Etherverbindungen quantitativ in die Umwelt eingetragen wurden. Dies förderte die Erforschung der Abbauege,

wobei *tert*-Butanol als zentraler Metabolit ausgemacht wurde. Mehrere Bakterienstämme wurden isoliert, welche diese Etherverbindungen sowie *tert*-BuOH mineralisieren: *Methylibium petroleiphilum* PM1 aus einem Kompost-Biofilter (Hanson et al. 1999), *Aquicola tertiaricarbonis* L108 aus Grundwasser einer MTBE-kontaminierten Industriefläche (Rohwerder et al. 2006), *Burkholderia cepacia* CIP I-2052, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 sowie *Aquicola tertiaricarbonis* TBA200 je aus Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage (Piveteau et al. 2001; François et al. 2002; Dobslaw et al. 2019), *Hydrogenophaga flava* ENV 735 aus einer MTBE-Anreicherung (Steffan et al. 2000) und *Mycobacterium austroafricanum* TBA100 aus Filtermaterial eines Biotrickling-Filters für ein Abluftgemisch aus Aceton und *tert*-Butanol (Dobslaw et al. 2019).

tert-Butanol wird zunächst durch eine Monooxygenase-Reaktion zu 2-Methylpropan-1,2-diol hydroxyliert. In den Stämmen PM1 und L108 wird dies von einer Rieske-Monooxygenase MdpJK, im Stamm IFP 2012 von einer AlkB-Oxygenase durchgeführt. Der Nachweis in Stamm PM1 erfolgte mittels Transkriptomanalyse, in L108 durch 2D-Protein-Gelelektrophorese sowie Peptidmassen Fingerprint und in Stamm IFP 2012 mittels Southern Blot Hybridisierung und RT-PCR (Hristova et al. 2007; Schäfer et al. 2007; Lopes Ferreira et al. 2007). Ebenfalls in Stamm IFP 2012 konnten nachfolgende Oxidationsschritte ausgehend vom Diol über 2-Hydroxyisobutyraldehyd (2-HIBAL) zu 2-Hydroxyisobuttersäure (2-HIBA) aufgedeckt werden. Die beteiligte Alkohol-Dehydrogenase MpdB wurde als Flavoprotein aus der Familie der Glucose-Methanol-Cholin Oxidoreduktasen identifiziert. Die Aldehyd-Dehydrogenase MpdC katalysiert den nachfolgenden Schritt zur Säure. Beide Enzyme konnten mittels Peptidmassen Fingerprint von prominenten Banden aus einer differenziellen SDS-PAGE identifiziert werden. Mit den abgeleiteten Nukleotidsequenzen konnten die dafür codierenden Gene erfasst und heterolog funktional exprimiert werden (Ferreira et al. 2006). In *Mycobacterium vaccae* JOB5 konnte im Medium Hydroxyaceton detektiert werden, worauf die Decarboxylierung von 2-HIBA zu CO₂ und 2-Propanol mit anschließender Oxidation des sekundären Alkohols zu Aceton und Hydroxyaceton postuliert wurde (Steffan et al. 1997). Ein Beweis dafür steht bisher jedoch aus. In Stamm L108 wurde gezeigt, dass 2-HIBA durch eine Mutasereaktion linearisiert wird (Rohwerder et al. 2006). Hierzu muss zunächst die Säure mittels Coenzym A-Ligase HCL aktiviert werden, was durch Knock-out sowie eine *in vitro* Reaktion des gereinigten Enzyms bewiesen wurde (Zahn et al. 2019). Der Thioester kann anschließend in Abhängigkeit von Cobalamin (Vitamin B12) radikalisch durch die 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase HcmAB zu S-3-Hydroxybutyryl-CoA umgeformt werden; der Beweis dafür erfolgte ebenfalls über einen Knock-out der α -Untereinheit (Yaneva et al. 2012). Per Auswertung einer Transkriptomanalyse wurden die finalen Schritte des Abbauweges in PM1 postuliert. So waren eine 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase sowie eine Acetyl-CoA-Acetyltransferase hochreguliert, die entsprechend für die Dehydrogenierung von 3-HBA-CoA

zu Acetoacetyl-CoA und dessen Spaltung in zwei Acetyl-CoA zugeordnet wurden (Hristova et al. 2007).

Die Gene für die am Abbau beteiligten Enzyme sind in Stamm PM1 (Abbildung 4-1) sowohl chromosomal als auch auf einem Megaplasmid zu verorten (Hristova et al. 2007). Zur Lokalisation entsprechender Gene in den Stämmen L108 und IFP 2012 liegen keine Informationen vor.

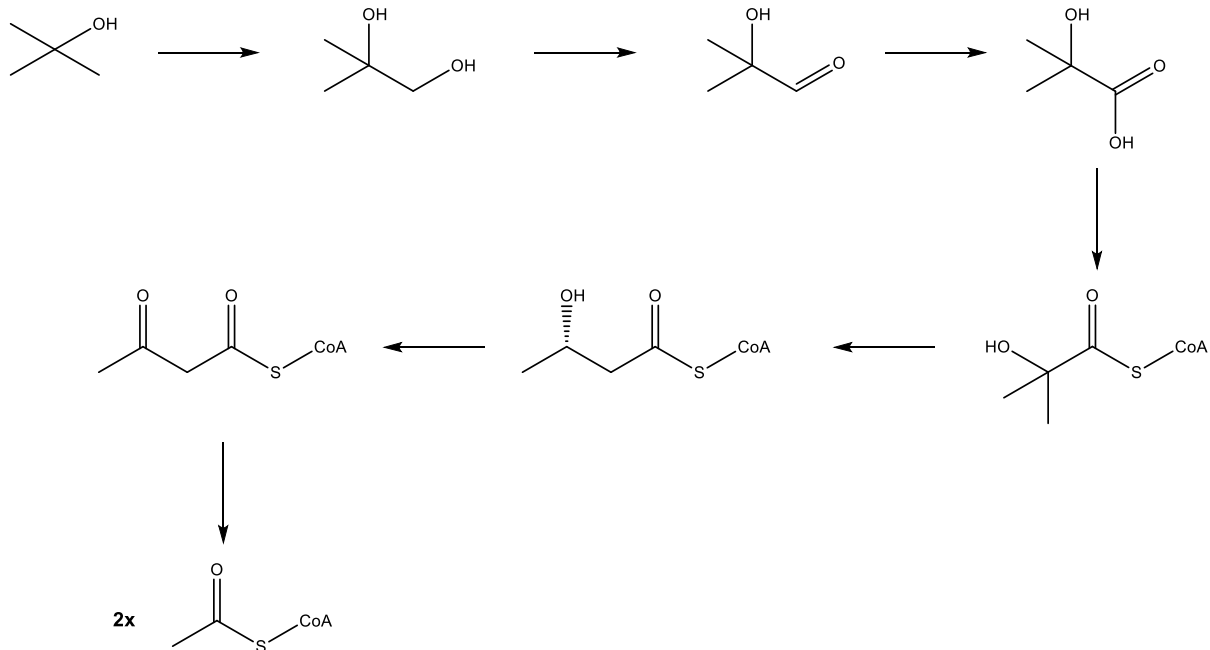


Abbildung 2-20 Aerobier Abbau von *tert*-Butanol

Aerobier Abbauweg von *tert*-Butanol nach Hristova und Kollegen (Hristova et al. 2007). Nach Monooxygenierung zu einem Diol wird der endständige Alkohol-Rest zur Säure oxidiert, CoA-aktiviert und das verzweigte Molekül in einer Mutase-Reaktion linearisiert. Nach Dehydrogenierung des verbleibenden Alkohol-Restes wird das Molekül in zwei Acetyl-CoA gespalten.

2.4.5.6 Aerobier Abbau von Methylpropen

Methylpropen (MP) ist das Kernsubstrat dieser Arbeit. Bakterienstämme wurden in der Vergangenheit bezüglich des Wachstums auf MP hin untersucht, jedoch nur *Mycobacterium* sp. ELW1 kann das Substrat als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Stamm ELW1 wurde aus Sediment eines Baches isoliert. Aus Untersuchungen mit potenziellen Metaboliten und Supplementen wurde ein Abbauweg postuliert. Wie bei den bisher vorgestellten Abbauwegen zu Alkenen (Abschnitte 2.4.5.3 und 2.4.5.4) initiiert auch hier vermutlich eine Alken-Monooxygenase diesen. Es entsteht zunächst 1,2-Epoxy-2-methylpropan. Mehrere Möglichkeiten der Ringöffnung sind denkbar, z. B. eine Konjugation mit Coenzym M oder Glutathion (analog dem Alken- bzw. Isopren-Abbau) sowie eine Hydrolyse (Abbildung 2-1). Stamm ELW1 hydrolysiert das Epoxid zu 2-Methylpropan-1,2-diol. Die übrigen Schritte

Grundlagen

verlaufen mutmaßlich wie für den Abbau von *tert*-Butanol (Abschnitt 2.4.5.5) beschrieben (Kottegoda et al. 2015).

Ein Wachstum konnte auf den postulierten Metaboliten Epoxymethylpropan, 2-Methylpropan-1,2-diol, 2-HIBA und 3-HBA, sowie die Produktion und der Verbrauch des Diols und der Säuren über die Zeit nach Zugabe von Epoxymethylpropan mit auf MP gewachsenen Ruhezellen mittels GC-FID gezeigt werden. Die Monooxygenase wurde durch für diesen MO-Typ erfolgreiche charakteristische Inhibition durch Octin als Alken-Monooxygenase identifiziert. Im Ruhezellenversuch konnte hier keine MP-Abnahme gemessen werden. Epoxymethylpropan als postulierter erster Metabolit im Abbauweg konnte in keinem der Versuche nachgewiesen werden, jedoch erfolgte die Oxidation von Ethen zu Ethenoxid mit entsprechendem analytischem Nachweis. Die Involvierung einer Hydrolase als Ringöffner wurde angenommen, da Epoxymethylpropan von Ruhezellen stöchiometrisch zum Diol umgesetzt wird und nach Zugabe des Coenzym M-Analogons und EaCoMT-Inhibitors 2-Bromethansulfonsäure keine Änderung der Umsatzkinetik feststellbar war. In Cobalt-defizitärem Medium war kein Wachstum auf MP, Epoxymethylpropan, 2-Methylpropan-1,2-diol und 2-HIBA möglich, wohl aber auf 3-HBA. Daraus wurde geschlossen, dass 2-HIBA von einer Cobalt-abhängigen Mutase zu 3-HBA linearisiert wird (Kottegoda et al. 2015).

Eine dem Stamm zugeordnete Plasmidsequenz (CP032156) ist in der NCBI nucleotide database eingetragen. Sie beinhaltet mögliche Abbaugene; jedoch existiert dazu bisher keine Publikation in der Fachliteratur. Die Sequenz wird im Abschnitt 4.5.7 diskutiert.

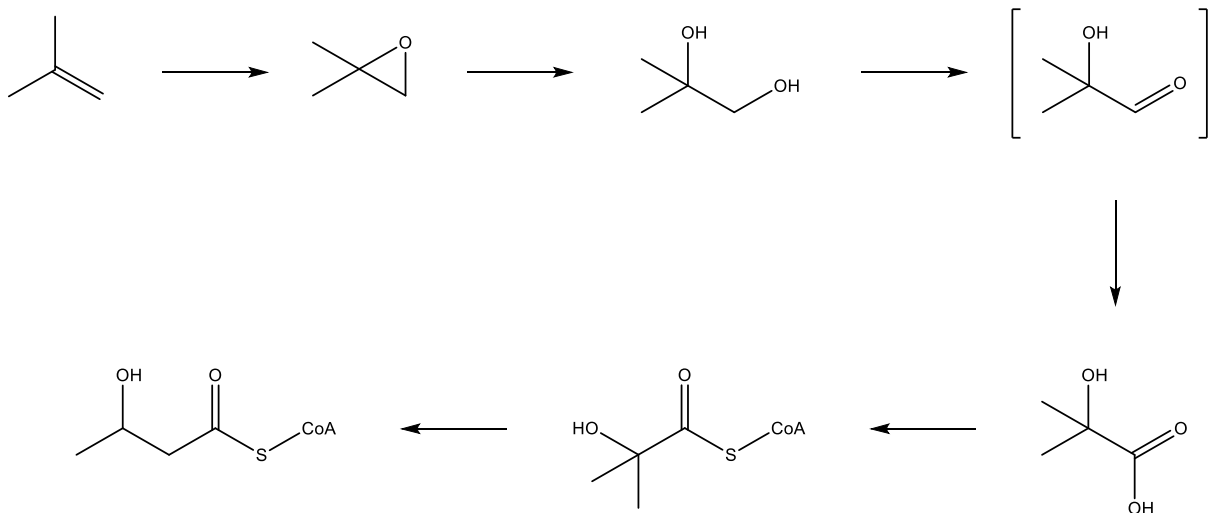


Abbildung 2-21 Aerober Abbau von Methylpropan

Aerober Abbauweg nach Kottegoda und Kollegen (Kottegoda et al. 2015). Der durch eine Monooxygenase erzeugte Epoxidring wird hydrolytisch zum Diol gespalten, welches analog zum Abbau von *tert*-Butanol zu zwei Acetyl-CoA transformiert wird.

2.4.5.7 Aerober Abbau von 2-HIBA bzw. 1,2-MPD

Die Mineralisierung von 2-HIBA ist bekannt aus dem Abbau der Ether ETBE/MTBE sowie deren Abbauprodukt *tert*-Butanol und folgt nach CoA-Aktivierung einer Mutase-katalysierten Linearisierung des Kohlenstoffgerüsts (Abschnitt 2.4.5.5). Der Stamm *Actinomycespora chiangmaiensis* DSM 45062 kann sowohl auf 2-HIBA als auch seinem Vorprodukt 2-Methylpropan-1,2-diol wachsen. Entgegen des bekannten Abbauweges für *tert*-Butanol wird hier die aktivierte Säure durch eine Thiamin-Pyrophosphat-(TPP)-abhängige Lyase gespalten (Rohwerder et al. 2020). Als Produkte entstehen Aceton und Formyl-CoA, wobei Aceton wahrscheinlich weiter über Acetol und Methylglyoxal zu Pyruvat – und diese Carbonsäure weiter zu CO₂ – oxidiert wird (Abbildung 2-22).

In *A. chiangmaiensis* DSM 45062 konnten alle Metabolite mittels HPLC-RI, GC-FID oder GC-MS nachgewiesen werden. Die Gene für die beteiligten Enzyme – TPP-Lyase, 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Ligase HCL, 2-Methyl-propan-1,2-diol-Dehydrogenase MdpB und Aldehyd-Dehydrogenase MdpC – befinden sich in einem Cluster, während die Gene für die Aceton-Monooxygenase und die Dehydrogenasen nicht gruppiert auftreten.

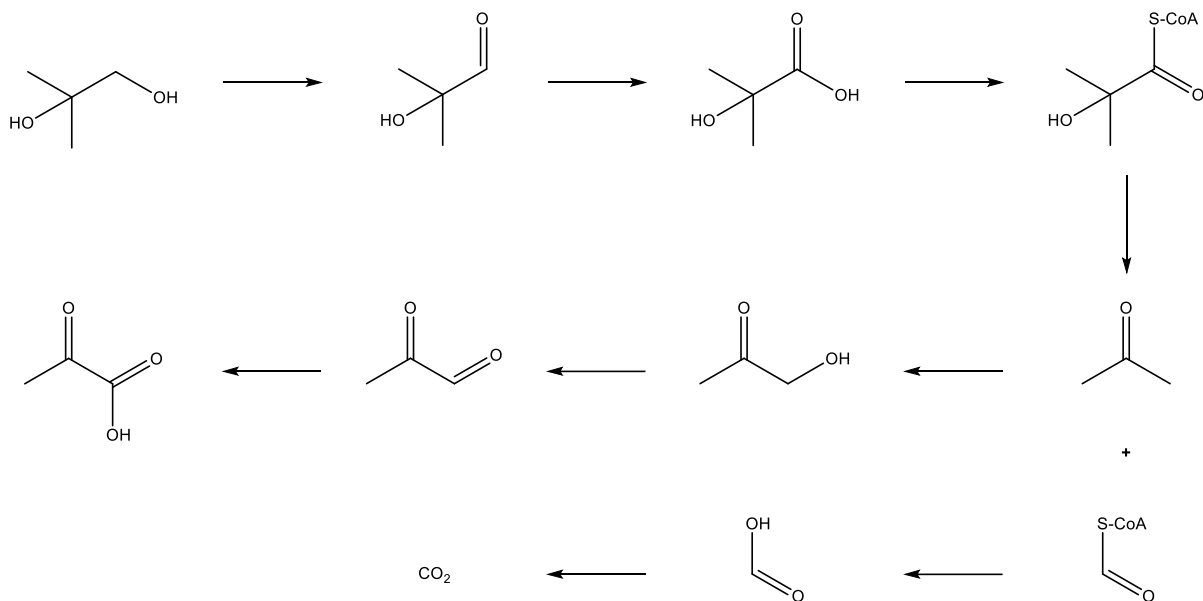


Abbildung 2-22 Aerober Abbau von 2-Methylpropan-1,2-diol / 2-HIBA

Aerober Abbauweg von 2-Methylpropan-1,2-diol bzw. 2-HIBA nach Rohwerder und Kollegen (Rohwerder et al. 2020). Das Diol wird analog zu den Abbauwegen von *tert*-Butanol und MP zur korrespondierenden Säure oxidiert sowie CoA-aktiviert. Anstelle einer Mutierung wird das Molekül in einer Thiamin-Pyrophosphat-abhängigen Reaktion zu Aceton und Formyl-CoA gespalten. Die Produkte werden jeweils zu Pyruvat bzw. CO₂ oxidiert.

Über die heterologe Expression des Lyase-Gens in *E. coli* konnte eine entsprechende Aktivität bezüglich der Spaltung von 2-HIBA-CoA gezeigt werden. Die Zugabe von TPP zu den Rohextrakten von Wildtyp bzw. Expressionswirt konnte den Umsatz von 2-HIBA steigern. Die Kristallstruktur der Lyase konnte ebenfalls aufgeklärt werden (Zahn et al. 2022). Die Zugabe

von Selenit zum Medium verringerte die Akkumulation von Formiat, was außer über die Gensequenz auf eine Selenocystein-haltige Formiat-Dehydrogenase schließen lässt. Das auf 2-HIBA induzierte Proteom zeigte eine starke Häufigkeit des Lyase-Clusters, während das auf Aceton induzierte Proteom kaum Proteine daraus enthielt. Beide Proteome enthielten große Mengen einer löslichen di-Eisen-Monooxygenase, welche vermutlich die Oxidation des Metaboliten Aceton katalysiert und homolog zu den Aceton-Monooxygenasen von *Mycolicibacterium goodii* 12523 und *Mycolicibacterium smegmatis* MC2 155 ist (Rohwerder et al. 2020).

2.4.5.8 Anaerober Abbau von Aceton

Die Sulfat-reduzierenden Bakterien *Desulfococcus biacutus*, *Desulfotomaculum arcticum* und *Desulfotomaculum geothermicum* gehen den von *Actinomycespora chiangmaiensis* DSM 45062 durchgeführten Abbauweg von der anderen Seite an (Abbildung 2-23). Sie können auf 2-Propanol, Aceton, Butanon, 2-Pentanon und 3-Pentanon als Kohlenstoffquelle wachsen (Frey et al. 2018; Frey et al. 2021b; Frey et al. 2021a). Die Ketone werden zusammen mit Formyl-CoA in einer postulierten, Thiamin-Pyrophosphat-abhängigen Reaktion zu den korrespondierenden CoA-aktivierten tertiären Carbonsäuren kondensiert. Im Falle von Aceton entsteht 2-HIBA-CoA. Analog zum Abbauweg von *tert*-Butanol wird in einer Vitamin B12-abhängigen, Mutase-katalysierten Reaktion das Molekül zu 3-HBA-CoA linearisiert, die Hydroxyl- zur Ketogruppe dehydrogeniert und das Produkt thiolitisch in zwei Acetyl-CoA gespalten.

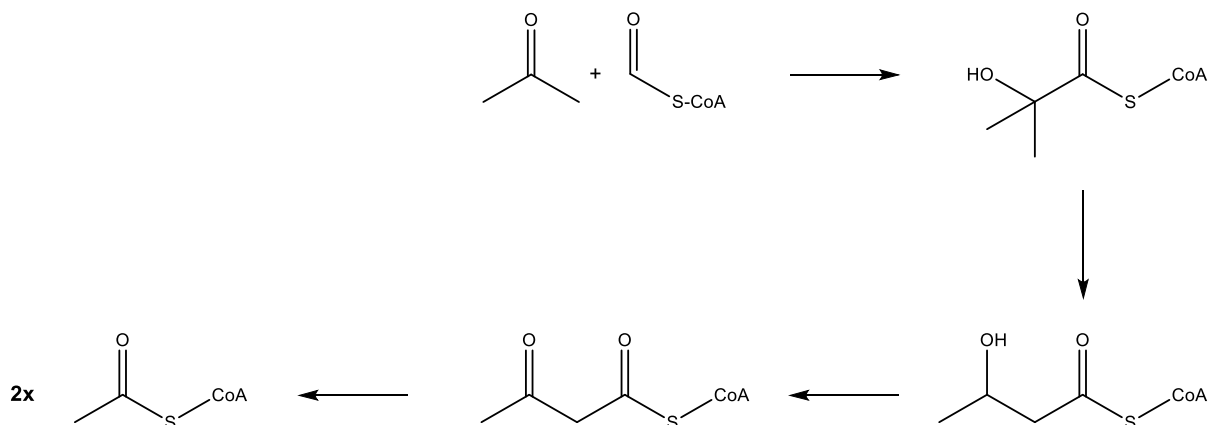


Abbildung 2-23 Anaerober Abbau von Aceton

Anaerober Abbauweg von Aceton nach Frey und Kollegen (Frey et al. 2018). Aceton wird zusammen mit Formyl-CoA in einer postulierten Thiamin-Pyrophosphat-abhängigen Reaktion zur korrespondierenden CoA-aktivierten tertiären Carbonsäure kondensiert. Es entsteht 2-HIBA-CoA. Analog zum Abbauweg von *tert*-Butanol wird in einer Vitamin B12-abhängigen, Mutase-katalysierten Reaktion das Molekül zu 3-HBA-CoA linearisiert, die Hydroxyl- zur Ketogruppe dehydrogeniert und das Produkt thiolitisch in zwei Acetyl-CoA gespalten.

Grundlagen

Mittels differenzieller 2D-SDS-PAGE (Frey et al. 2018; Frey et al. 2021b) bzw. differenzieller Gesamtproteomanalyse (Frey et al. 2021a) und Peptidmassen Fingerprint konnten Peptidsequenzen gewonnen und Gensequenzen aus den Genomen der Stämme zugeordnet werden, die für Thiamin-abhängige Enzyme, Mutasen, 3-HBA-CoA Dehydrogenasen und Acetyl-CoA-Acetyltransferasen codieren (Frey et al. 2018; Frey et al. 2021b; Frey et al. 2021a). Im Zellextrakt von *D. biacutus* konnten mittels HPLC-MS und HPLC-UV die Abnahme von 2-HIBA-CoA sowie die Zunahme von 3-HBA-CoA nach Zugabe von Adenosylcobalamin nachgewiesen werden. Die Mutase von *D. biacutus* wurde in *E. coli* Rosetta 2 kloniert und das Enzym gereinigt, womit in einem Assay die Reaktion von 2-HIBA-CoA zu 3-HBA-CoA – wie schon zuvor im Zellextrakt – gezeigt werden konnte. Ebenfalls kloniert und gereinigt wurde die 3-HBA-CoA-Dehydrogenase, wonach in einem Assay nach Zugabe von 3-HBA-CoA und NAD mittels HPLC-MS das erwartete Produkt Acetoacetyl-CoA nachgewiesen werden konnte (Frey et al. 2018).

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung von Reinstämmen und deren Taxonomie

Es konnten zwei Reinstämme aus Belebtschlamm aus einer Kläranlage in Basel isoliert werden, die Methylpropen (MP) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können. Sie waren phänotypisch (Abschnitt 3.2) und genetisch eindeutig unterscheidbar, weshalb auf ein BOX-Fingerprinting verzichtet wurde. Die partiellen Sequenzen der 16S rRNA Gene konnten zunächst per PCR amplifiziert und sequenziert werden, später die vollständigen Sequenzabschnitte aus der Genomsequenzierung für die Nomenklatur herangezogen werden (NCBI: IBE100: MNO81_29630, IBE200: GKP29_RS26675). Gleiches gilt für die Gensequenzen des Hitzeschockproteins 65 *hsp65* (IBE100: MNO81_27715, IBE200: GKP29_RS22280).

Es erfolgte ein Abgleich basierend auf der 16S rRNA Gensequenz und dem Gesamtgenom mit der NCBI nucleotide collection sowie dem Type Strain Genome Server. Demnach wurden der Stamm IBE100 *Mycolicibacterium gadium* strain CIP 105388^T und der Stamm IBE200 *Mycobacterium paragordoniae* 49061^T zugeordnet. Der Abgleich der partiellen Sequenzen der *hsp65*-Gene (nicht dargestellt) bestätigte in beiden Fällen die Ergebnisse aus dem 16S rRNA- und Gesamtgenom-Abgleich. Beide Organismen sind laut den Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe 466 der Risikogruppe 1 zugeordnet. Ein phylogenetischer Baum der Verwandtschaftsbeziehungen ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

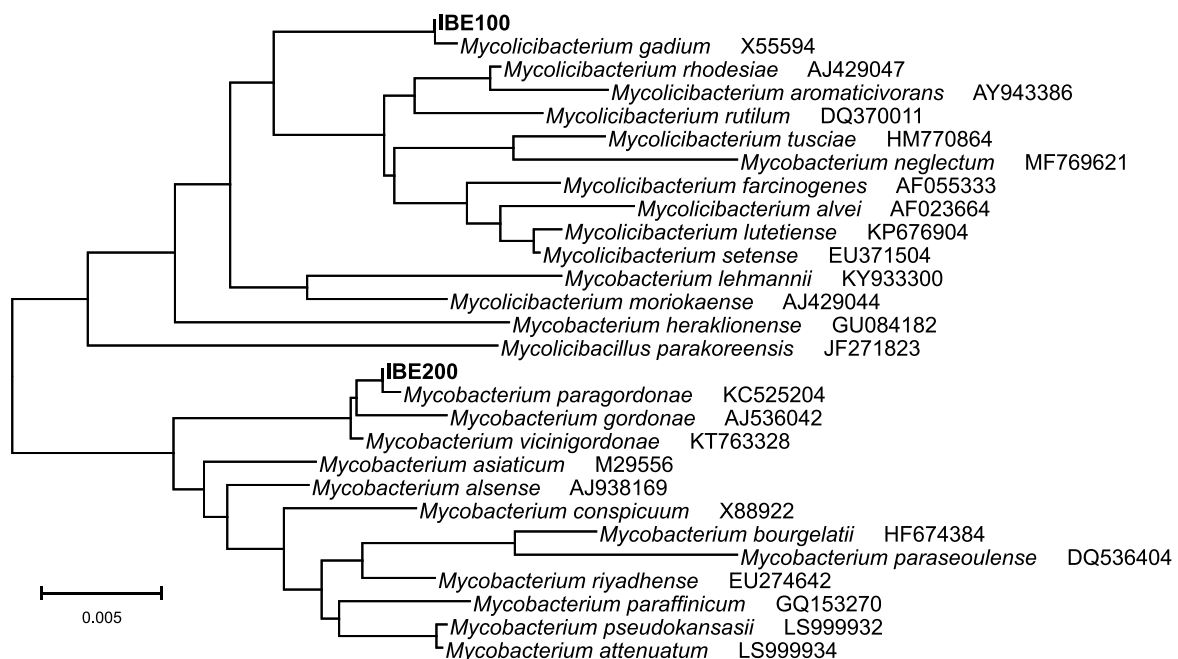


Abbildung 3-1 Phylogenetische Einordnung der Stämme IBE100 und IBE200

Verwandtschaftsbeziehungen der Isolate innerhalb der Familie der *Mycobacteriaceae*, basierend auf dem Abgleich der 16S rRNA Gene.

Beide Stämme waren Gegenstand der Aufklärung des Abbauweges von MP. Nicht jeder Stamm eignete sich für alle durchgeführten Versuche, jedoch ergänzten deren Ergebnisse sich zu einem Gesamtbild.

3.2 Mikrobielle Charakterisierung

M. gadium IBE100 bildet gelockte Kolonien mit glattem Rand. Das Profil ist erhaben, die Oberfläche stark unregelmäßig gefurcht und vermittelt einen trockenen Eindruck, ähnlich den Kolonien von *M. tuberculosis*. Die matt-gelben Kolonien wachsen auf einen Durchmesser von 0,7–1,2 mm heran. Die Pigmentierung nimmt mit der Zeit an Intensität zu (Abbildung 3-2 links). Die Zellen sind extrem hydrophob, neigen in Flüssigkultur zur Verklumpung und wachsen bevorzugt an der Glaswand im Gasraum der Kulturflasche (Abbildung 3-4 links). Die Zugabe von Detergenzien zum Medium, z. B. Triton X-100, vermögen kaum eine homogene Dispergierung.

M. paragordoniae IBE200 bildet kreisrunde Kolonien mit glattem Rand. Das Profil ist konvex, die Oberfläche glatt und glänzend. Die gelben Kolonien wachsen auf einen Durchmesser von 1,0–1,5 mm heran. Die Pigmentierung nimmt mit der Zeit einen satten orangefarbenen Ton an (Abbildung 3-2 rechts). Auch diese Zellen sind hydrophob; sie lassen sich jedoch wesentlich besser als die von Stamm IBE100 mit Triton X-100 in Flüssigkultur dispergieren.

Beide Stämme bilden innerhalb einer Woche gut sichtbare Kolonien auf Festmedium aus; somit zählen sie zu den schnell wachsenden Mycobakterien (rapidly growing Mycobacteria, RGM). Farbpigmente werden auch unter Lichtausschluss gebildet; somit gehören die Stämme zur Klasse der Skotochromogenen.



Abbildung 3-2 Koloniemorphologie der Stämme IBE100 und IBE200

IBE-Stämme nach zwei Wochen Wachstum auf Minimalmedium-Agar und MP. Links: *M. gadium* IBE100, rechts: *M. paragordoniae* IBE200. Beide Stämme zählen zu den Skotochromogenen, bilden also auch unter Lichtausschluss Farbpigmente. Die Intensität der Pigmentierung nimmt mit zunehmendem Alter der Zellen sowie bei erhöhter Lichtexposition zu.

Unter dem Mikroskop, bei 1.000-facher Vergrößerung betrachtet, lässt sich die kokkoid-plumpe Stäbchenform von *M. gadium* IBE100 erkennen, wohingegen *M. paragordoniae*

Ergebnisse

IBE200 Stäbchen mit runden Enden ausgebildet (Abbildung 3-3 oben). Beide Stämme sind nicht motil.

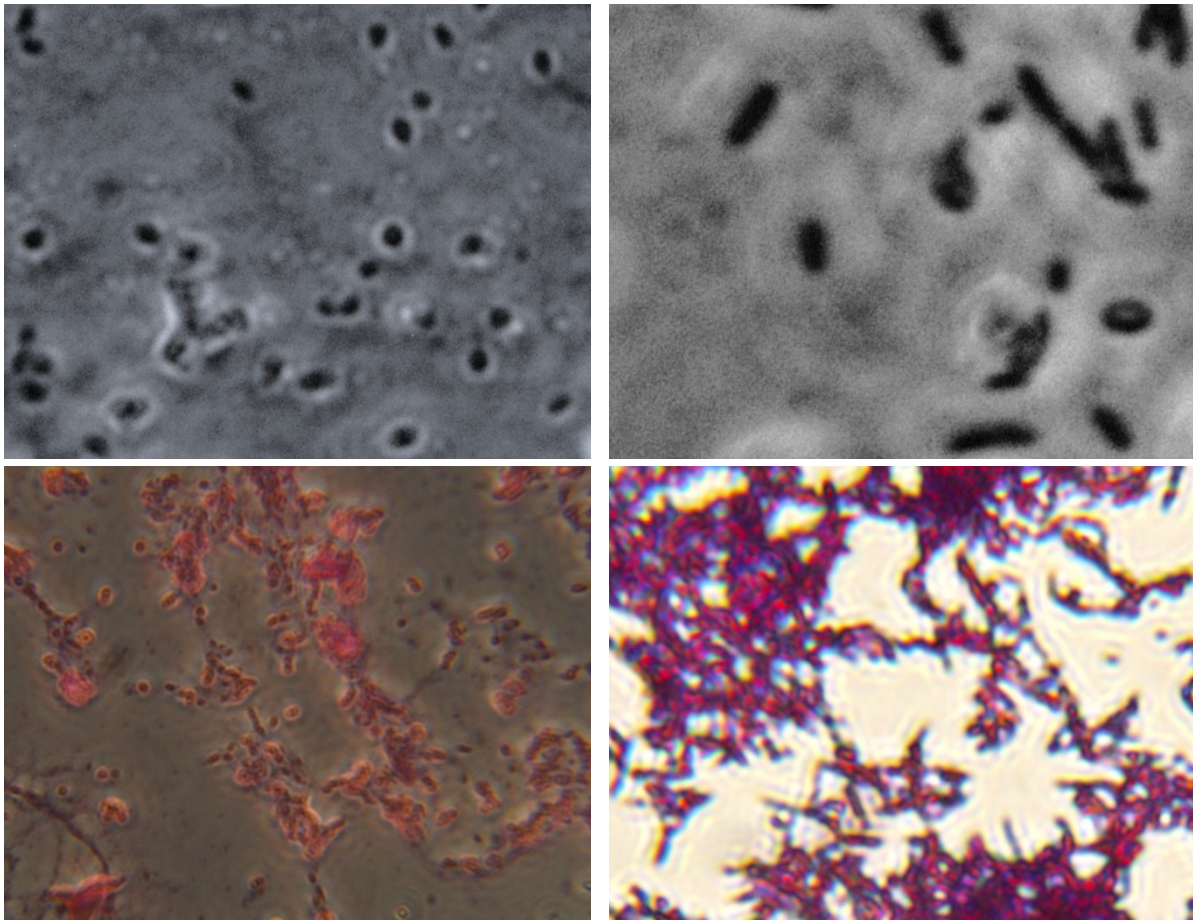


Abbildung 3-3 Zellmorphologie der Stämme IBE100 und IBE200

Mikroskopische Aufnahmen von *M. gadium* IBE100 (links) und *M. paragordoniae* IBE200 (rechts) bei 1.000-facher Vergrößerung im Phasenkontrast (oben) und bei 400-facher Vergrößerung im Hellfeld nach Ziehl-Neelsen-Färbung (unten).

Die Stämme IBE100 und IBE200 sind – dem Genus entsprechend – erwartungsgemäß grampositiv und säurefest (Tabelle 3-1), wie KOH- und Aminopeptidase-Tests sowie die Ziehl-Neelsen-Färbung (Abbildung 3-3 unten) bestätigten. Weiterhin besitzen sie die Enzyme Katalase und Cytochrom c-Oxidase. Beide Stämme stellen ihr Wachstum ein, wenn der Sauerstoff verbraucht, aber noch Substrat vorhanden ist, und setzen ihr Wachstum fort, wenn wieder Sauerstoff zugeführt wird; sie sind somit obligate Aerobier.

Tabelle 3-1 Ergebnisse der Schnelltests

Stamm	KOH	Aminopeptidase	Katalase	Oxidase	Säurefestigkeit
IBE100	–	–	+	+	+
IBE200	–	–	+	+	+

3.3 Katabolische Charakterisierung

3.3.1 Wachstumskurven

Die Wachstumsparameter bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen wurden für die Stämme IBE100 und IBE200 ermittelt. Hierbei waren primär zwei Besonderheiten zu beachten, die Neigung zur Klumpenbildung sowie der Aggregatzustand des Substrats.

Mykolsäuren, die namensgebenden Fettsäuren des Mycobacteria-Taxons, sitzen auf der Peptidoglycanschicht und verleihen den Zellen eine besonders wachsartige Eigenschaft. Diese Hydrophobizität fördert Klumpenbildung, das Aufschwimmen auf der Flüssigkeitsoberfläche des Mediums sowie bevorzugtes Wachstum der Zellen im Gasraum. Zur Dispergierung wurde dem Medium Triton X-100 zugegeben; zusätzlich wurden die Kulturen gerührt anstatt geschüttelt inkubiert. Einerseits werden Zellklumpen durch den Rührfisch geschert, andererseits spritzt das Medium weniger, wodurch die Zellen größtenteils in der Flüssigphase verbleiben (Abbildung 3-4 rechts).

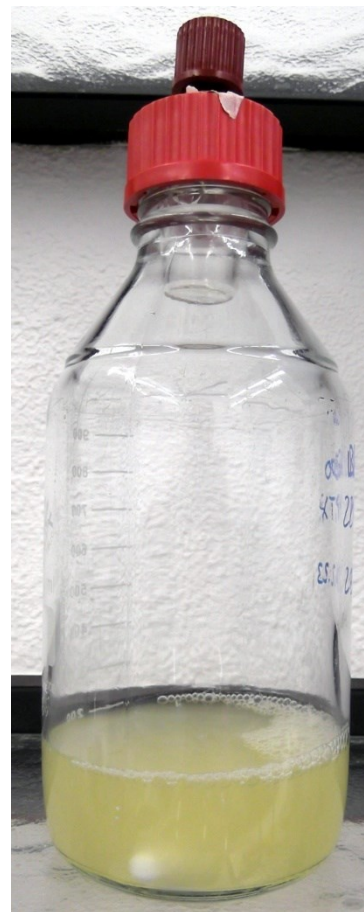


Abbildung 3-4 Wachstum in Flüssigkultur

Flüssigkultur von Stamm IBE100 in Schikanekolben bei geschüttelter Inkubation (links) mit bevorzugtem Zellwachstum an der Glaswand im Gasraum und in der Glasflasche bei gerührter Inkubation (rechts) mit Zellwachstum fast ausschließlich in der Flüssigphase.

Ergebnisse

MP ist bei Raumtemperatur gasförmig und konkurriert bei Zugabe in das Kulturgefäß um Volumen mit dem für den Metabolismus notwendigen Sauerstoff. Bei der Substratdosierung musste deswegen darauf geachtet werden, dass der Sauerstoff nicht komplett ausgeblasen wurde; alternativ wurde das Substrat im Überdruck zugegeben. Bei der Erstellung der Wachstumskurven wurde letztere Variante gewählt, da hier mit gasdichten Spritzen definierte Mengen an Substrat appliziert werden konnten. Weiter war darauf zu achten, dass bei der Probenahme für die photometrische Messung weder die Sauerstoff- noch Substratkonzentration in der Batch-Kultur wesentlich verändert wurde. Deshalb wurde hier zur Entnahme der Kulturflüssigkeit ebenfalls mit Spritzen gearbeitet.

Die Batch-Kulturen wurden in 1 L Glasflaschen mit 100 mL Minimalmedium, einer Start-OD₆₀₀ an MP-induzierten Zellen von mindestens 0,15 inokuliert und mit Konzentrationen von 0,63–21,02 mM (bezogen auf die Flüssigphase) an MP versetzt. Die Inkubation erfolgte gerührt bei 30 °C im Dunkeln über eine Woche hinweg. Die OD der Kulturen wurde regelmäßig photometrisch erfasst, die resultierenden Wachstumskurven sind in Abbildung 3-5 für Stamm IBE100 und in Abbildung 3-6 für Stamm IBE200 dargestellt. Die Wachstumskonstante μ für die jeweiligen Konzentrationen wurden aus den Werten der exponentiellen Phase berechnet, die Generationszeit t_d wiederum aus der Wachstumskonstanten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-2 zusammengestellt.

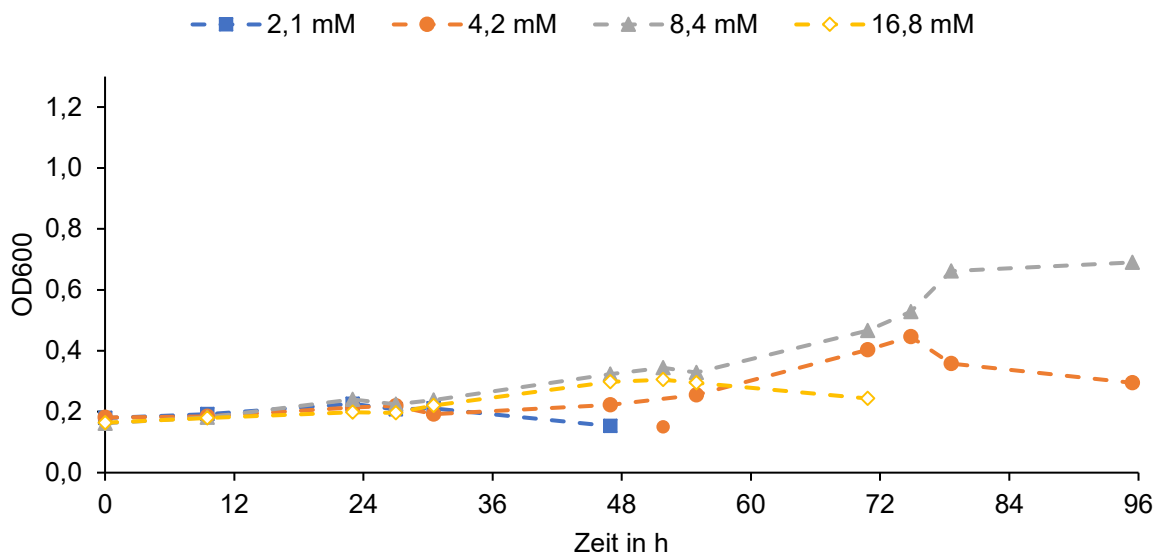


Abbildung 3-5 Wachstumskurven von Stamm IBE100 auf Methylpropen

Die OD₆₀₀ der Flüssigkulturen, versetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen an Methylpropen im Überdruck, wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden intervallweise ermittelt.

Ergebnisse

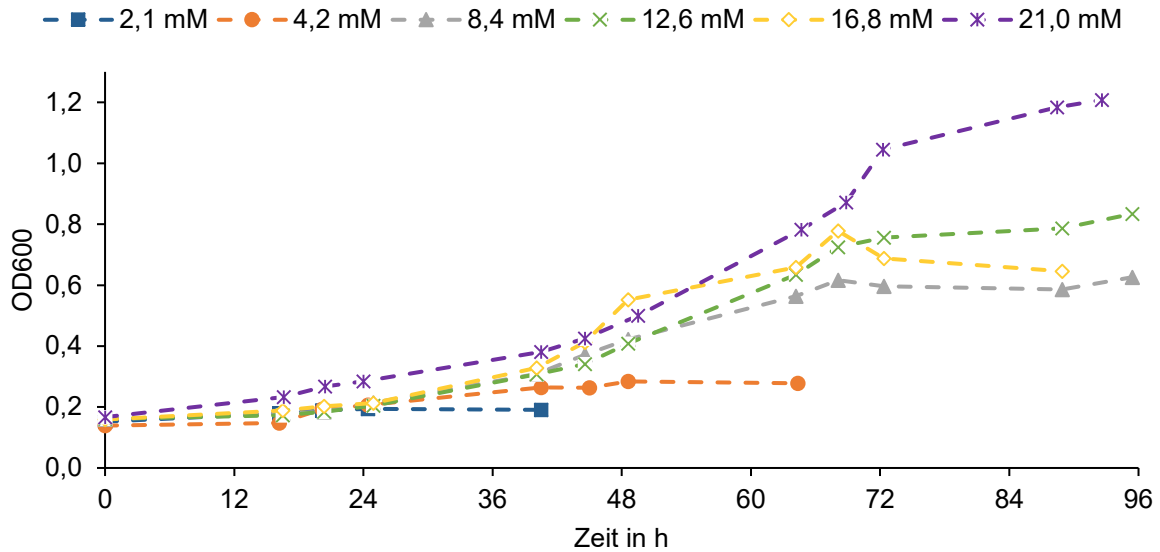


Abbildung 3-6 Wachstumskurven von Stamm IBE200 auf Methylpropen

Die OD₆₀₀ der Flüssigkulturen, versetzt mit unterschiedlichen Konzentrationen an Methylpropen im Überdruck, wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden intervallweise ermittelt.

Bei beiden Stämmen war bei initialen Substratkonzentrationen von weniger als 2,1 mM kein Wachstum zu verzeichnen. Anfängliche Konzentrationen von 2,1 mM oder mehr ermöglichten beiden Stämmen Wachstum, jedoch waren aufgrund von Klumpenbildung nicht alle Daten verwertbar (z. B. Abbildung 3-5, 4,2 mM: 52 h). So waren für den Stamm IBE100 bei initialen Konzentrationen von 12,6 und 21,0 mM keine Wachstumskurven erstellbar (Ergebnisse nicht dargestellt). Eine mechanische Homogenisierung der Proben führte ebenfalls zu keiner Verbesserung. Die nichthomogene Klumpenverteilung im Medium ermöglichte keine repräsentative Probenahme. Weiter führte die Homogenisierung zu einer vermehrten Scherung der Zellen und damit zu einer Verfälschung der OD.

Tabelle 3-2 Wachstumsparameter der Stämme IBE100 und IBE200

Konzentration	mM	4,2	8,4	12,6	16,8	21,0
μ_{IBE100}	h ⁻¹	0,019	0,018	-	0,012	-
$t_d, \text{IBE100}$	h	36,5	38,5	-	57,8	-
μ_{IBE200}	h ⁻¹	0,015	0,025	0,029	0,030	0,032
$t_d, \text{IBE200}$	h	46,2	27,7	23,9	23,1	21,7
μ_{ELW1}	h ⁻¹	-	0,050	-	-	-
$t_d, \text{ELW1}$	h	-	13,9	-	-	-

Wachstumskonstanten μ und Generationszeiten t_d der Stämme IBE100 und IBE200 bei verschiedenen initialen Konzentrationen an Methylpropen. Vergleichend der Literaturwert für Stamm ELW1 (Kottogoda et al. 2015).

Aus den Wachstumskonstanten von Stamm IBE200 bei verschiedenen Konzentrationen (Abbildung 3-7) konnten die Michaelis-Menten-Konstante $K_M = 6,9007$ mM und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $\mu_{\text{max}} = 0,0432$ h⁻¹ berechnet werden. Die Zunahme der Wachstumskonstante steht im hyperbolischen Verhältnis zur eingesetzten

Ergebnisse

Substratkonzentration, welche sich durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben lässt. Eine Sättigung tritt demnach bei einer Substratkonzentration zwischen 8,5 und 12,5 mM auf. Ein vergleichbarer Zusammenhang konnte für Stamm IBE100 nicht beobachtet werden. Die maximale Wachstumskonstante $\mu_{\max} = 0,015 \text{ h}^{-1}$ war bei einer initialen Substratkonzentration von $c = 4,2 \text{ mM}$ erreicht.

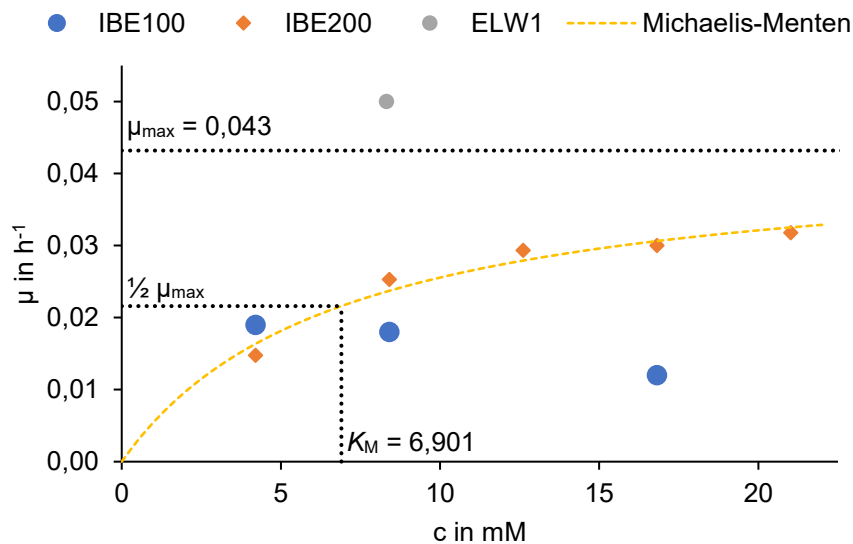


Abbildung 3-7 Wachstumskonstanten im Vergleich

Vergleich der Wachstumskonstanten der Stämme IBE100, IBE200 und ELW1 bei unterschiedlichen initialen Substratkonzentrationen an Methylpropen. Für Stamm IBE200 konnten die Michaelis-Menten-Konstante $K_M = 6,901 \text{ mM}$ und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $\mu_{\max} = 0,043 \text{ h}^{-1}$ berechnet werden.

3.3.2 Substratverwertung

Verschiedene Substrate wurden den Stämmen als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle in flüssigem Minimalmedium in Batch-Kulturen angeboten. Neben der Untersuchung der allgemeinen metabolischen Fähigkeiten wurden gezielt Substrate eingesetzt, die mögliche Metabolite denkbarer Abbauewege für MP oder Strukturanaloga derselben darstellen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-3 dargestellt, wobei – kein Wachstum und + mindestens eine Verdopplung der Start- OD_{600} von ungefähr 0,15 nach einer Woche Inkubation bedeuten.

Ergebnisse

Tabelle 3-3 Substratverwertung der Stämme IBE100 und IBE200

Substrat	IBE100	IBE200	ELW1
Methan, 20 mL	–	–	–
Propan, 10 mL	–	–	–
Butan, 10 mL	–	–	–
Hexan	–	+	–
Decan	+	+	+
1-Hexen	–	–	N/A
Methanol	–	–	–
Ethanol	–	–	+
1-Propanol	+	+	+
1-Butanol	+	+	+
1-Hexanol	+	+	N/A
2-Propanol	–	–	–
2-Butanol	–	–	–
2-Hexanol	–	–	N/A
<i>tert</i> -Butanol	–	–	–
<i>iso</i> -Butanol	+	–	+
1,2-Epoxy-2-methylpropan	+	–	+
Epoxypropan	–	–	–
<i>DL</i> -Propan-1,2-diol	–	–	–
2-Methylpropan-1,2-diol	+	–	+
Butan-2,3-diol	–	–	+
Glycerol	–	–	N/A
Propanal	+	+	N/A
Aceton	–	–	–
Ameisensäure	–	–	N/A
Essigsäure	+	–	+
Propansäure	+	+	+
Succinat	+	–	+
Citrat	–	–	N/A
2-Hydroxyisobuttersäure	+	–	+
<i>DL</i> -3-Hydroxybuttersäure	+	–	+
<i>L</i> -Valin	+	–	N/A
3-Hydroxy-2-methylpropan	–	–	+
Methacrylat	–	–	N/A
3-Chlor-2-methylpropan	–	–	N/A
2-Methylbut-1-en	–	–	–
2-Methylbut-2-en	–	–	–
Isopren	–	–	–
Squalen	+	+	N/A
<i>D</i> -Limonen	–	–	N/A
<i>D</i> -Fructose	+	–	+
<i>D</i> -Glucose	+	–	+
LB, NB, TB	+	–	N/A
Cyclohexan	–	–	N/A
Methylcyclohexen	–	–	N/A
Methylencyclohexan	–	–	N/A
Benzol	–	–	–
Benzoessäure	–	–	N/A
Toluol	–	–	–
Styrol	–	–	N/A
α -Methylstyrol	–	–	N/A

Getestete Substrate als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle in Flüssig-Minimalmedium. – kein Wachstum, + mindestens eine Verdopplung der Start-OD₆₀₀ von ungefähr 0,15 nach einer Woche Inkubation bei 30 °C. Zum Vergleich sind die von *Mycobacterium* sp. ELW1 verwerteten Substrate angegeben (Kottegoda et al. 2015). N/A: keine Daten.

Ergebnisse

In einem Co-Oxidationsversuch wurde Stamm IBE200 zusätzlich zu MP Butan angeboten, was selbst kein verwertbares Substrat war. Das Wachstum erfolgte auf Minimalmedium-Agar im Exsikkator. Nach Inkubation und Öffnen des Gefäßes war der typische Geruch von 2-Butanol wahrnehmbar, was ebenfalls kein verwertbares Substrat für den Stamm darstellte. Die GC-MS-Analyse einer Gasprobe aus dem Exsikkator bestätigte die Vermutung. Daraufhin wurde auf Minimalmedium-Agar neben den Stämmen IBE100 und IBE200 der Stamm *Pseudomonas veronii* MEK700, ein bekannter 2-Butanol- und Butanon-Verwerter (Onaca et al. 2007), ausgestrichen und unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert. Stamm MEK700 kann weder MP noch Butan oxidieren. In Abbildung 3-8 ist zu sehen, dass in der Nähe zu den Zellen der Stämme IBE100 und IBE200 jeweils mehr Zellmasse von Stamm MEK700 aufgewachsen war.

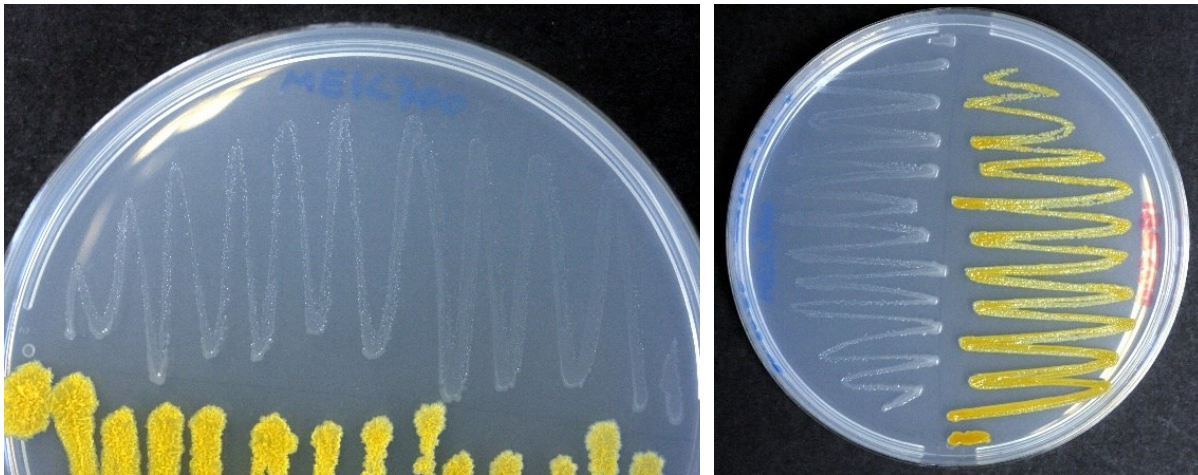


Abbildung 3-8 MP/Butan-Co-Oxidation durch die Stämme IBE100 und IBE200

Butan wurde von den Stämmen IBE100 (links) und IBE200 (rechts) bei gleichzeitigem Angebot von MP zu 2-Butanol oxidiert. Stamm MEK700 konnte den Alkohol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen, was durch vermehrtes Zellwachstum nahe den Oxidations-Stämmen sichtbar wurde.

Gleiches Verhalten konnte mit der Substratkombination MP+n-Pentan beobachtet werden, jedoch mit deutlich schwächerem Wachstum von Stamm MEK700, mit 2-Pentanol als vermutetes Oxidationsprodukt.

Wurde 1-Hexanol anstelle von MP als Kohlenstoffquelle angeboten, erfolgte keine Oxidation von n-Butan.

3.3.3 Indigobildung aus Indol

Der Indol-Test wird zum kolorimetrischen Nachweis von Monoxygenasen verwendet. Wird Indol in 3-Position hydroxyliert, entsteht Indoxyl, welches wiederum im tautomeren Verhältnis zu 3-Oxindol steht. In Gegenwart von Sauerstoff dimerisieren diese Stoffe abiotisch zu Indigo (Abbildung 3-9).

Ergebnisse

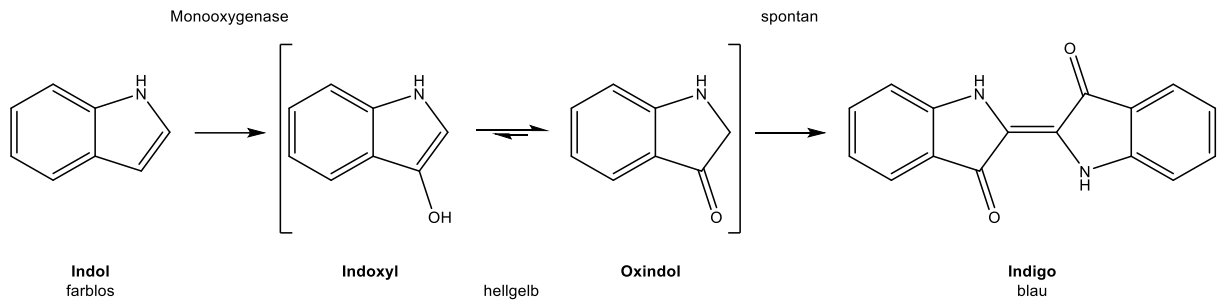


Abbildung 3-9 Indigobildung aus Indol

Indol wird von manchen Monooxygenasen in 3-Position hydroxyliert. Das entstehende Indoxyl steht im tautomeren Verhältnis zu Oxindol, mit dem Gleichgewicht auf der Oxindol-Seite. In Anwesenheit von Sauerstoff dimerisieren diese Stoffe spontan zu Indigo.

Auf MM-Festmedium und MP gewachsene Zellen der Stämme IBE100 und IBE200 wurden mit einer Indol-Lösung (farblos) besprüht und eine Stunde lang bei RT ohne MP inkubiert. Eine grünliche Färbung konnte um die ausgestrichenen Zellen herum wahrgenommen werden, was aus der subtraktiven Farbmischung der gelben Zellen und des Indigo-Farbstoffs resultierte (Abbildung 3-10). Auf 1-Hexanol gewachsene Zellen zeigten unter gleichen Bedingungen keine Indigobildung. Die Expression einer induzierbaren, MP-spezifischen Monooxygenase in den Stämmen ist somit wahrscheinlich.

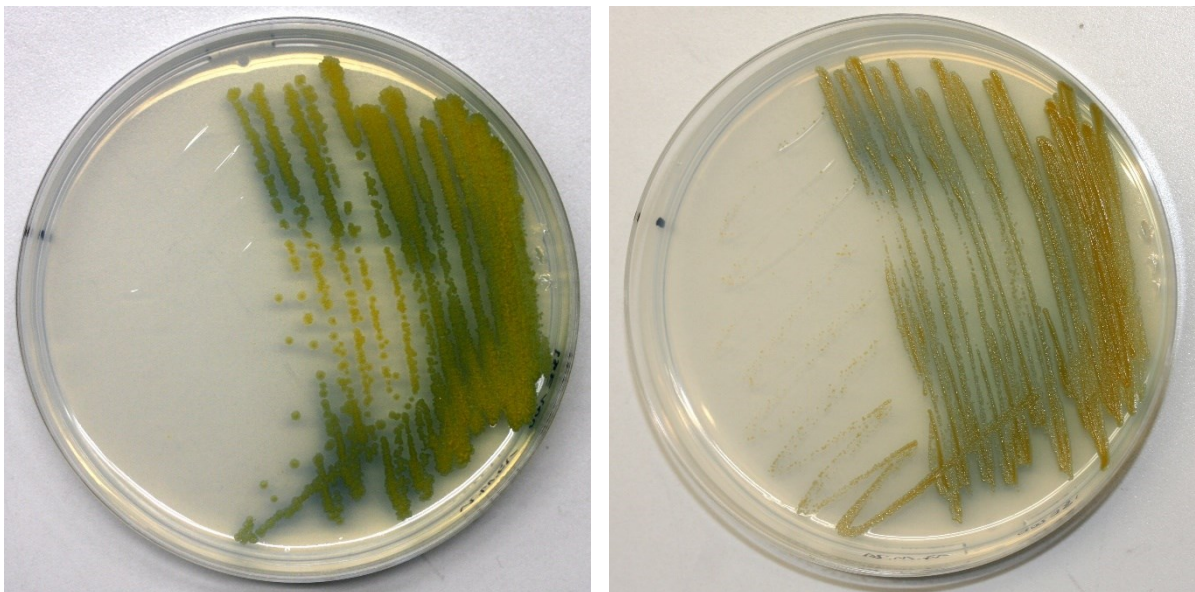


Abbildung 3-10 Indigo-Bildung durch die Stämme IBE100 und IBE200

Mit Indol-Lösung besprühte MP-induzierte Zellen der Stämme IBE100 (links) und IBE200 (rechts) zeigten eine Grün-Färbung, die aus der subtraktiven Farbmischung der gelben Zellen und des Indigo-Farbstoffs herrührte.

3.3.4 Ruhezellen-Ansatz der Stämme IBE100 und IBE200

Der Kulturüberstand MP-induzierter Zellen der Stämme IBE100 und IBE200 im Ruhezellen-Ansatz wurde auf mögliche Metabolite hin untersucht. Weder die GC-MS-Headspace-Analyse noch 4-(4-Nitrobenzyl)pyridin (NBP)-abhängige photometrische Assays für Epoxide zeigten

mit Sicherheit einen Metaboliten auf. Auch die Derivatisierung mit Phenylborsäure, die anschließende Flüssig-Flüssig-Extraktion und die GC-MS-Analyse, die auf Diol-Verbindungen abzielten, sowie die Ethylveresterung, Flüssig-Flüssig-Extraktion und GC-MS-Analyse auf der Suche nach Carbonsäuren waren erfolglos.

3.3.5 Sauerstoffzehrung

Zur Ermittlung der Möglichkeit zur Oxidation verschiedener Substrate durch Stamm IBE200 ohne eine zwingend vollständige Mineralisierung wurde die Sauerstoffzehrung aufgezeichnet. Auf MP gewachsenen Kulturen wurden neben MP und möglichen Metaboliten Strukturanaloga angeboten. Die optischen Dichten der Ansätze in PBS betragen $OD_{600} = 2,2-2,4$. Es wurde zunächst die Ruheatmung aufgezeichnet, anschließend das Substrat hinzugegeben und die resultierende Atmungsrate mit der Ruheatmung verrechnet, um die effektive Atmung zu erhalten. Aufgrund unterschiedlicher Dampfdrücke, Löslichkeiten und Aggregatzustände der getesteten Substrate konnte nicht in allen Fällen dieselbe Konzentration eingestellt werden (2,2–50 mM). Ein Vergleich untereinander ist qualitativ möglich. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-4 dargestellt.

Tabelle 3-4 Atmungsraten von Stamm IBE200

Substrat	C _{Substrat}	Ruheatmung	Substrat-Atmung	effektive Atmung
Methylpropen	2,2 mM	0,070	0,195	0,126
1,2-Epoxy-2-methylpropan	38 mM	0,072	0,118	0,046
2-Methylpropan-1,2-diol	38 mM	0,081	0,124	0,042
2-HIBA	33 mM	0,096	0,110	0,014
3-HBA	33 mM	0,073	0,058	-0,015
2-Methyl-1-buten	31 mM	0,091	0,089	-0,002
Isopren	33 mM	0,095	0,155	0,060
3-Hydroxy-MP	40 mM	0,113	0,050	-0,062
3-Chlor-MP	34 mM	0,119	0,066	-0,053
Epoxypropan	48 mM	0,130	0,057	-0,073
DL-Propan-1,2-diol	46 mM	0,120	0,053	-0,067
1-Hexen	27 mM	0,113	0,099	-0,014
Styrol	29 mM	0,122	0,095	-0,027
n-Hexan	26 mM	0,105	0,107	0,002
1-Hexanol	27 mM	0,072	0,224	0,152

Atmungsraten ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{OD}_{600}^{-1}$) der auf MP induzierten Zellen vor (Ruheatmung) und nach Zugabe verschiedener Substrate (Substrat-Atmung). Die effektive Atmungsrate ergibt sich aus der Differenz der beiden Werte. Die substratbezogenen Raten sind Mittelwerte aus jeweils drei Ansätzen (Ausnahme: sechs bei MP und 3-Hydroxy-MP, zwei bei Propan-1,2-diol).

Die Zugabe von MP erzeugte eine erwartungsgemäß hohe Sauerstoffzehrung. Die postulierten Metabolite 1,2-Epoxy-2-methylpropan, 2-Methylpropan-1,2-diol und 2-HIBA wurden ebenfalls oxidiert, jedoch mit geringerer Rate. Die Zugabe des postulierten Metaboliten 3-HBA induzierte hingegen keine Sauerstoffzehrung.

Strukturanaloga zu MP riefen unterschiedliches Verhalten hervor. Bei Zugabe von Isopren erfolgte eine Sauerstoffzehrung, bei 2-Methyl-1-buten und 3-Chlor-MP nicht. Strukturanaloga

zu 1,2-Epoxy-2-methylpropan und Methylpropan-1,2-diol, Epoxypropan und Propan-1,2-diol induzierten keinen Sauerstoffverbrauch.

3-Hydroxy-MP, der Metabolit einer möglichen Methan-Monooxygenase nach Oxidation von MP, verursachte keine Sauerstoffzehrung.

Styrol und Hexen sind beide relativ große unpolare Moleküle mit Vinylrest, der potenziell epoxidiert werden kann. Eine Sauerstoffzehrung bei Zugabe dieser Substrate konnte nicht beobachtet werden, vermutlich aus sterischen Gründen.

1-Hexanol wurde von den MP-induzierten Zellen oxidiert. Die Gene für dessen Abbau werden somit entweder konstitutiv exprimiert oder unspezifische Dehydrogenasen katalysieren die Reaktionen.

Hexan könnte mittels Alkan-Monooxygenasen des Typs lösliche di-Eisen-Monooxygenase, AlkB oder Cytochrom P450 Oxygenase zu 1-Hexanol oxidiert werden. Da keine erhöhte Sauerstoffzehrung messbar war, wird ein entsprechendes Enzym nicht konstitutiv exprimiert.

3.3.6 NAD(P)/NADH-Umsatz im Zellextrakt

Im Zellextrakt wurde überprüft, ob die Zugabe gewisser Substrate einen NAD(P)-Verbrauch auslösen. Dies ließe auf eine NAD(P)-Abhängigkeit der am Abbau von MP beteiligten Alkohol-Dehydrogenase schließen. Der NAD(P)-Umsatz wäre dabei proportional zum umgesetzten Substrat und könnte als NAD(P)H-Zunahme photometrisch gemessen werden. Zellextrakt wurde jeweils von 1-Hexanol- und MP-induzierten Zellen von Stamm IBE200 gewonnen. Die Umsatzraten – bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Proben – sind in Tabelle 3-5 dargestellt.

Im Zellextrakt MP-induzierter Zellen war bei der Zugabe von 1-Hexanol und Methylpropan-1,2-diol unter Verwendung von NAD ein Umsatz messbar. Kein Umsatz war hingegen bei der Zugabe der zu Methylpropan-1,2-diol strukturanalogen Stoffe Propan-1,2-diol, Ethan-1,2-diol bzw. Glycerol messbar.

Unter Verwendung von NADP im Zellextrakt MP-induzierter Zellen war bei der Zugabe von 1-Hexanol, Methylpropan-1,2-diol, Propan-1,2-diol, Ethan-1,2-diol, 1,2-Butandiol, 2,3-Butandiol bzw. Glycerol ein Umsatz messbar.

Im Zellextrakt 1-Hexanol-induzierter Zellen war ein Umsatz messbar bei der Zugabe von 1-Hexanol, 1-Heptanol oder 1-Octanol unter Verwendung von NAD. Kein Umsatz war messbar bei der Zugabe von Methylpropan-1,2-diol (NAD sowie NADP), 1-Propanol, 1-Butanol oder 1-Pentanol.

Die Zugabe des Alkohol-Dehydrogenase-Inhibitors 4-Methylpyrazol zu den Ansätzen mit 1-Hexanol (NAD) bzw. Methylpropan-1,2-diol (NADP) konnte die Reaktionen sofort vollständig stoppen (Abbildung 3-11).

Ergebnisse

Tabelle 3-5 NAD(P)-Umsatz im Zellextrakt von Stamm IBE200

Substrat	Umsatz	T	Reduktionsäquivalent	Zellen
1-Hexanol	263	30	NAD	MP
Methylpropan-1,2-diol	34	30	NAD	MP
<i>DL</i> -Propan-1,2-diol	0	30	NAD	MP
Ethan-1,2-diol	0	30	NAD	MP
<i>DL</i> -2,3-Butandiol	0	30	NAD	MP
<i>DL</i> -1,2-Butandiol	0	30	NAD	MP
Glycerol	0	30	NAD	MP
1-Hexanol	206	30	NADP	MP
Methylpropan-1,2-diol	101	30	NADP	MP
Methylpropan-1,2-diol	62	35	NADP	MP
<i>DL</i> -Propan-1,2-diol	76	30	NADP	MP
Ethan-1,2-diol	66	30	NADP	MP
<i>DL</i> -2,3-Butandiol	71	30	NADP	MP
<i>DL</i> -1,2-Butandiol	73	30	NADP	MP
Glycerol	68	30	NADP	MP
1-Hexanol	331	30	NAD	1-Hexanol
Methylpropan-1,2-diol	0	30	NAD	1-Hexanol
Methylpropan-1,2-diol	0	30	NADP	1-Hexanol
1-Propanol	0	30	NAD	1-Hexanol
1-Butanol	0	30	NAD	1-Hexanol
1-Pentanol	0	30	NAD	1-Hexanol
1-Hexanol	221	35	NAD	1-Hexanol
1-Heptanol	509	30	NAD	1-Hexanol
1-Octanol	307	30	NAD	1-Hexanol

Umsatzrate in $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, bezogen auf den Gesamtproteingehalt, Temperatur in $^{\circ}\text{C}$, als Reduktionsäquivalente kamen NAD und NADP zum Einsatz. Der Zellextrakt wurde entweder aus MP- oder 1-Hexanol-induzierten Zellen gewonnen.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass es sich beim Umsatz von 1-Hexanol und Methylpropan-1,2-diol um zwei unterschiedliche Alkohol-Dehydrogenasen handelt, die sich jedoch beide durch 4-Methylpyrazol vollständig inhibieren lassen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Methylpropan-1,2-diol-Dehydrogenase NADP-abhängig (3-fache Umsatzgeschwindigkeit verglichen mit NAD) ist. Die 1-Hexanol-Dehydrogenase war mit beiden Reduktionsäquivalenten katalytisch aktiv, jedoch mit einer Umsatzrate von lediglich 62 % unter Verwendung von NADP bezogen auf NAD. Weiter wird die 1-Hexanol-Dehydrogenase wahrscheinlich konstitutiv exprimiert, während die Methylpropan-1,2-diol-Dehydrogenase durch MP induziert wird.

Unter NADP-Verbrauch werden weitere Diole (Propan-1,2-diol, Ethan-1,2-diol, 1,2-Butandiol, 2,3-Butandiol und Glycerol) im Zellextrakt umgesetzt, mit Raten zwischen 65–75 % bezogen auf den Umsatz von Methylpropan-1,2-diol. Dies ist wahrscheinlich der Methylpropan-1,2-diol-Dehydrogenase zuzuschreiben.

Beide Dehydrogenasen wiesen bei einer Temperatur von 35 $^{\circ}\text{C}$ verglichen mit 30 $^{\circ}\text{C}$ im Reaktionsansatz eine niedrigere Umsatzrate auf (1-Hexanol-Dehydrogenase: 67 %, Methylpropan-1,2-diol-Dehydrogenase: 61 %).

Ergebnisse

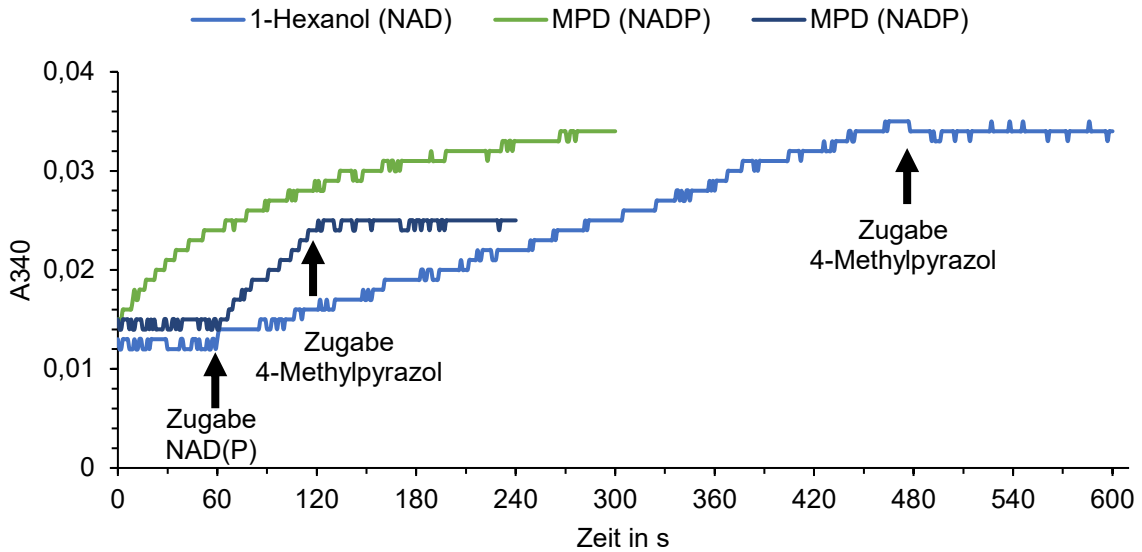


Abbildung 3-11 Enzymaktivitäten der Alkohol-Dehydrogenasen aus Stamm IBE200

Enzymaktivitäten und Inhibition der 1-Hexanol-Dehydrogenase und Methylpropan-1,2-diol-Dehydrogenase aus Stamm IBE200.

In weiteren Ansätzen wurde versucht, die NADH-Abhängigkeit der MP-oxidierenden löslichen di-Eisen-Monooxygenase im Zellextrakt von Stamm IBE200 nachzuweisen. Es war jedoch ein Grundumsatz von ca. $800 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ NADH zu NAD im Zellextrakt messbar, von dem sich die Rate nach Zugabe von MP oder strukturanaloger Stoffe (Methylbuten, Isopren) nicht unterschied (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.3.7 Zink-, Coenzym M-, Glutathion- und Cobalt-Einfluss auf das Wachstum

In Abbildung 2-1 wurden mögliche Abbauewege für MP vorgestellt. Bestimmte enzymatische Schritte sind dabei charakteristisch für die einzelnen Abbauewege und erfordern darüber hinaus spezifische Cofaktoren. Der Epoxid-Ringöffnungsschritt beim Abbau von Alkenen durch die Epoxyalkan-CoM-Transferase EaCoMT benötigt Zinkionen im katalytischen Zentrum. Beim Abbau von Isopren wird das Epoxid durch Konjugation mit dem Tripeptid Glutathion geöffnet. Die Mutasereaktion beim *tert*-Butanol-Abbau ist Vitamin B12- und somit Cobalt-abhängig. In Batch-Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Zinkchlorid und Coenzym M oder Glutathion zum Medium keinen Einfluss auf das Wachstum der Stämme IBE100 und IBE200 hatte, wohingegen ein Cobaltionen-defizitäres Medium kein Wachstum auf MP ermöglichte.

3.4 Genomanalyse der Isolate

Das Genom von *M. gadium* IBE100 ist etwa 6.036.732 bp groß und hat einen GC-Gehalt von 66,5 %. Es enthält 5.831 proteincodierende, 47 tRNA-codierende und 3 rRNA-codierende

Ergebnisse

Gene. Die Genomsequenz, die aus 87 Contigs besteht, ist bei GenBank unter dem BioProject PRJNA814055 mit der Zugangsnummer JAKZMO000000000 einsehbar.

Das Genom von *M. paragordoniae* IBE200 ist etwa 7.136.091 bp groß und hat einen GC-Gehalt von 66,8 %. Es enthält 6.279 proteincodierende, 50 tRNA-codierende und 6 rRNA-codierende Gene. Die Genomsequenz, bestehend aus 262 Contigs, ist bei GenBank unter dem BioProject PRJNA590116 mit der Zugangsnummer WNWV000000000 einsehbar.

Bei MP handelt es sich um ein verzweigtes Alken mit vier Kohlenstoffatomen. Folglich wurde das Genom mit Hilfe des tblastn-Algorithmus (Altschul et al. 1997) in der NCBI nucleotide collection database nach Genen durchsucht, die für Monooxygenasen codieren, welche an der Oxidation kurzkettiger Alkene beteiligt sind (AAO48576.1, ACZ56346.1, ACM61846.1, AAV52084.1 wurden als Abfrage verwendet). In beiden Stämmen konnten homologe Gene (*mmoX* und *ibeA*) innerhalb eines Clusters von Genen identifiziert werden, die möglicherweise mit dem Abbau von Alkenen in Verbindung stehen. Diese Cluster enthalten Gene, die für zwei Multikomponenten-Monooxygenasen, *mmoXYBR* und *ibeABCDEF*, zwei Alkohol-Dehydrogenasen, *mdpB* und *fadB*, eine Aldehyd-Dehydrogenase, *mdpC*, eine Multikomponenten-Mutase, *hcmAB* und ihr Chaperon, *meaH*, eine CoA-Ligase, *hcl*, Gene für die Cobalamin-Synthese, ein Zweikomponenten-Cobalttransporter, *cbtAB*, eine Acetyl-CoA-Acetyltransferase, *phaA* und mehrere Transkriptionsregulatoren codieren. Diese Cluster sind in Abbildung 3-12 dargestellt, und die Gene mit den vorhergesagten Funktionen sind in Tabelle 3-6 aufgeführt. In den Abschnitten 3.4.1 bis 3.4.7 werden die einzelnen codierten Enzyme dargestellt.

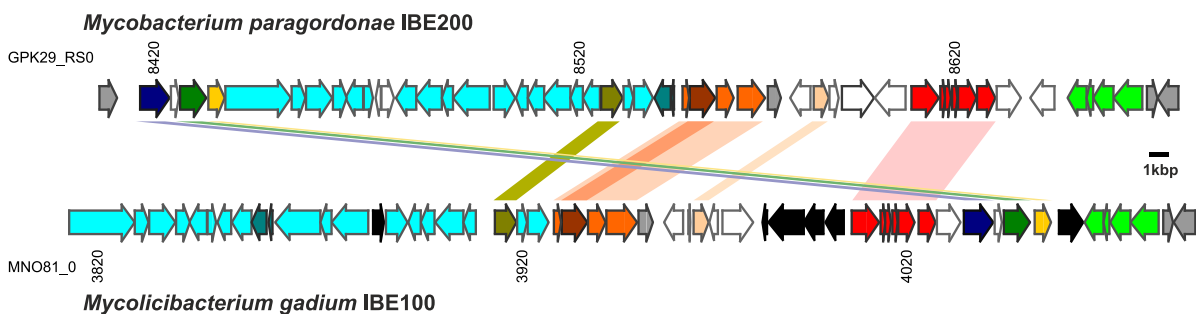


Abbildung 3-12 Organisation der am Methylpropen-Abbau beteiligten Gene

Organisation der postulierten, am MP-Abbau beteiligten Gene in den Stämmen IBE100 und IBE200. Gene, die für Enzyme mit übereinstimmend vorhergesagten Funktionen codieren, sind farbcodiert und mit Balken zwischen den beiden Clustern verbunden. Regulatoren sind grau dargestellt, Transposon-Elemente schwarz, offene Leserahmen, die nicht mit dem Abbauweg in Verbindung stehen oder deren Funktion unbekannt ist, in weiß. Die Funktionen der einzelnen Gene sind über den Locus tag in Tabelle 3-6 einsehbar.

Beide Cluster haben eine ähnliche Länge, 61,0 (IBE100: contig 3, JAKZMO010000003.1) bzw. 58,5 kbp (IBE200: contig 14, WNWV01000007.1), und weisen eine ähnliche Zusammensetzung und Reihenfolge der Gene auf. Jedoch konnten drei Unterschiede

Ergebnisse

ausgemacht werden: Erstens enthält der Stamm IBE100 mehrere Transposon-Elemente – upstream von *ibeABCDEF* sowie *mmoXYBR* und upstream (nicht gezeigt) sowie innerhalb des Cobalamin-Synthese-Genclusters. Diese Regulatoren sind im Stamm IBE200 nicht vorhanden. Der zweite Unterschied ist die Lage der *mdpB* Alkohol-Dehydrogenase-, *mdpC* Aldehyd-Dehydrogenase- und *eph* Epoxid-Hydrolase-codierenden Gene, die sich zwischen den beiden Monooxygenase-codierenden Genen in Stamm IBE100 und upstream der Cobalamin-Synthesegene in Stamm IBE200 befinden. Drittens codiert der IBE100-Gencluster

Tabelle 3-6 Mit dem Abbau von MP assoziierte Gene

Beschreibung/prognostizierte Funktion	Gen	Locus tag IBE100 MNO81_0	Locus tag IBE200 GKP29_RS0	Ähnlichkeit	Farbcode
Transkriptionsregulator	<i>araC</i>	-	8415	-	
Alkohol-Dehydrogenase aus der Familie der GMC-Oxidoreduktasen	<i>mdpB</i>	4035	8420	96,5 %	
Hydroxyisobutyraldehyd-Dehydrogenase	<i>mdpC</i>	4045	8430	92,4 %	
Epoxid-Hydrolase	<i>eph</i>	4050	8435	95,7 %	
Cobalaminsynthese, unterer Pfad	<i>cobX</i>	Details:	Tabelle 3-7		
Zwei-Komponenten-Cobalt-Transporter	<i>cbtAB</i>	3860– 3865	8.545– 8550		
Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	<i>phaA</i>	3915	8530	92,8 %	
Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase, β-Untereinheit	<i>hcmB</i>	3930	8555	95,7 %	
Hydroxyisobutyryl-CoA-Ligase	<i>hcl</i>	3935	8560	92,5 %	
G Protein Chaperon	<i>meaH</i>	3940	8565	90,2 %	
Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase, α- Untereinheit	<i>hcmA</i>	3945	8570	96,0 %	
Transkriptionsregulator	<i>gntR</i>	3950	8575	91,6 %	
3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase	<i>fadB</i>	3965	8585	90,7 %	
Isobuten-Monooxygenase, α- Untereinheit	<i>ibeA</i>	4000	8605	92,3 %	
Isobuten-Monooxygenase, γ- Untereinheit	<i>ibeB</i>	4005	8610	87,1 %	
Isobuten-Monooxygenase, Kopplungsprotein	<i>ibeC</i>	4010	8615	86,8 %	
Isobuten-Monooxygenase, 2Fe-2S	<i>ibeD</i>	4015	8620	91,7 %	
Isobuten-Monooxygenase, β- Untereinheit	<i>ibeE</i>	4020	8625	83,7 %	
Isobuten-Monooxygenase, Reduktase	<i>ibeF</i>	4025	8630	81,5 %	
Methan-Monooxygenase, 2Fe-2S	<i>mmoR</i>	4060	8645	75,3 %	
Methan-Monooxygenase, Kopplungsprotein	<i>mmoB</i>	4065	8650	85,9 %	
Methan-Monooxygenase, β- Untereinheit	<i>mmoY</i>	4070	8655	85,4 %	
Methan-Monooxygenase, α- Untereinheit	<i>mmoX</i>	4075	8660	91,8 %	
Zwei-Komponenten-Systemregulator		4080	8665	85,7 %	
Histidin-Kinase		4085	8670	87,9 %	

Die Ähnlichkeiten der übersetzten Aminosäuren zwischen den Enzymen der gleichen prognostizierten Funktion sind angegeben. Das Inkrement der Locus tags beträgt 5. Der Farbcode bezieht sich auf Abbildung 3-12.

für zwei mutmaßliche Transkriptionsregulatoren downstream des Mutase-codierenden Gens und *mmoXYBR*, während Stamm IBE200 für einen zusätzlichen mutmaßlichen Regulator downstream der *mdpB/mdpC/eph*-Gene codiert.

3.4.1 Lösliche di-Eisen-Monooxygenasen (SDMs)

In den Genomen der Stämme IBE100 und IBE200 konnten Gene identifiziert werden, die für zwei lösliche oxo-verbrückte di-Eisen-Monooxygenasen (soluble diiron monooxygenases, SDMs) codieren, wobei jede von ihnen potenziell an der Transformation von Methylpropen beteiligt sein könnte. Der *mmoXYBR*-Gencluster codiert für drei Komponenten, eine Hydroxylase bestehend aus einer α -Untereinheit MmoX (IBE100: 513 aa; IBE200: 514 aa) und einer β -Untereinheit MmoY (366 aa; 366 aa), ein Kopplungsprotein MmoB (111 aa; 112 aa) und eine Reduktase MmoR (342 aa; 344 aa). Diese weisen alle eine hohe Sequenzähnlichkeit

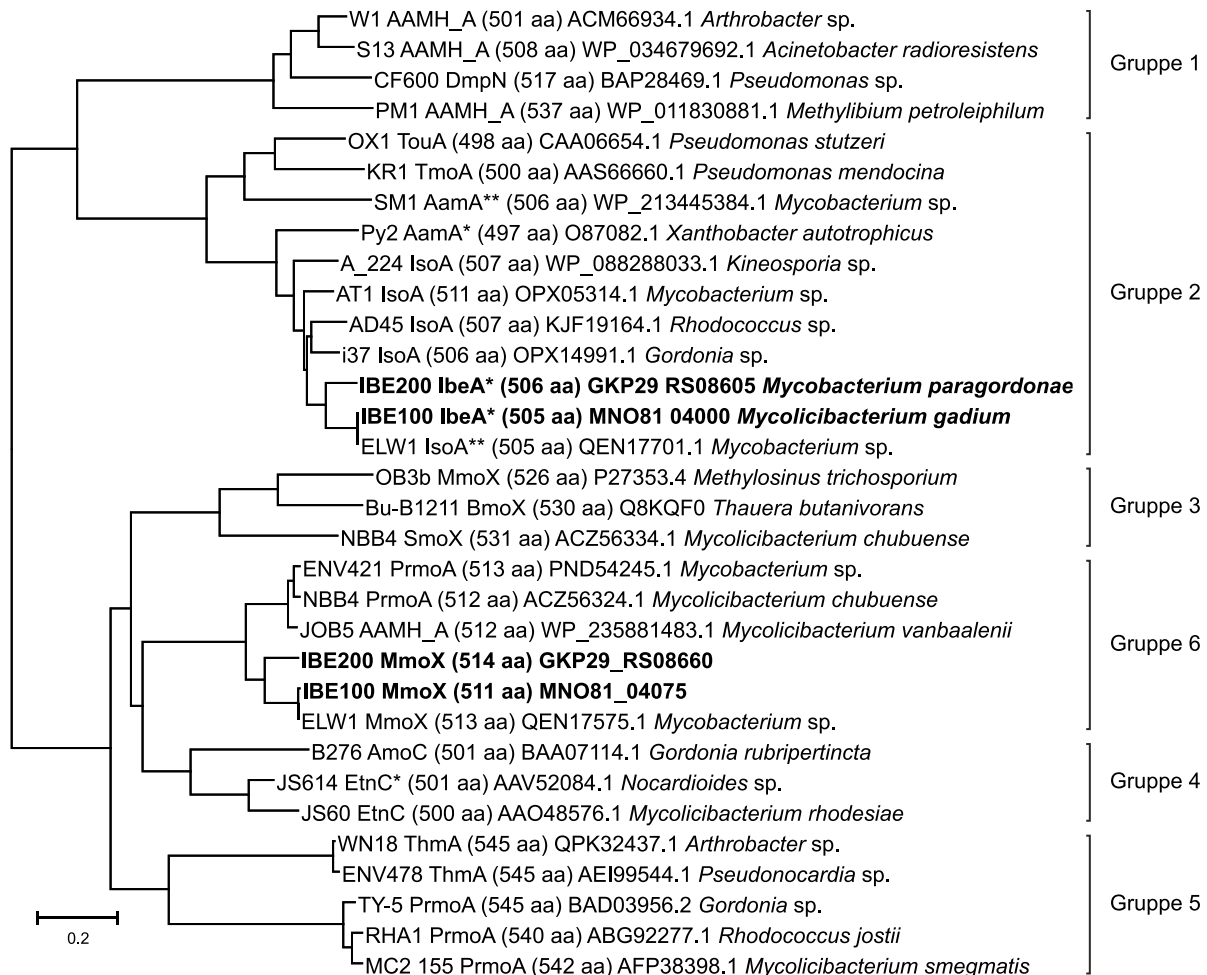


Abbildung 3-13 Evolutionäre Beziehungen zwischen α -Untereinheiten von SDMs

Evolutionäre Beziehungen zwischen ausgewählten α -Untereinheiten löslicher di-Eisen-Monooxygenasen. Die Gruppierungen spiegeln die Substratspezifität wieder: Phenol (1), Aromaten/Alken/Isopren (2), Methan (3), Alken (4), 2-Propan/Tetrahydrofuran (5) und 1-Propan (6) - Monooxygenasen. * bestätigte und ** postulierte Epoxidierung von MP.

zu den Methan-Monooxygenasen auf, insbesondere zu denjenigen, die an der Propanoxidation beteiligt sind (Abbildung 3-13 Gruppe 7).

Ein mögliches Produkt der terminalen Oxidation von MP wäre 2-Methylprop-2-en-1-ol, das weiter zur Methacrylsäure oxidiert und über den unteren *L*-Valin-Abbauweg in den zentralen Metabolismus geleitet werden könnte (Abbildung 2-1).

Upstream von *mmoXYBR* ist eine zweite SDM codiert. Gemäß ihrer Sechs-Komponenten-Operon-Struktur und Aminosäuresequenz ist sie eng mit Isopren-Monooxygenasen verwandt (Abbildung 3-13 Gruppe 2). Im Folgenden wird sie als *ibeABCDEF* bezeichnet. Sie besteht aus einer Monooxygenase- α -Untereinheit IbeA (505 aa; 506 aa), einer γ -Untereinheit IbeB (92 aa; 92 aa), einem Ferredoxin vom Rieske-Typ IbeC (113 aa; 113 aa), einem Kopplungsprotein IbeD (108 aa; 109 aa), einer β -Untereinheit IbeE (316 aa; 342 aa), und einer flavinhaltigen NAD(P)H-Reduktase IbeF (319 aa; 339 aa). Weitergehende Sequenzanalysen der α -Untereinheiten IbeA sind in Abschnitt 3.8.1 dargestellt.

Durch Oxidation der C=C-Bindung würde 1,2-Epoxy-2-methylpropan entstehen (Abbildung 3-22, Reaktion 1).

3.4.2 Epoxid-Hydrolase (EPH)

Eine Suche in den Genomen nach Genen, die für ähnliche Proteine wie die Epoxyalkan-Coenzym M-Transferase (Q56837.1) aus der CoM-abhängigen Spaltung von Propenoxid in *Xanthobacter* sp. Py2, Glutathion-S-Transferase Isol (KJF19166.1) aus der GSH-abhängigen Isoprenoxid-Spaltung in *Rhodococcus* sp. AD45 und Epoxid-Hydrolase 1EHY (1EHY_A) aus der Cofaktor-unabhängigen Spaltung von Epichlorhydrin in *Agrobacterium tumefaciens* AD1 codieren, ergaben Epoxid-Hydrolasen mit 70 % bzw. 72 % Identität. Entsprechende Gene befanden sich upstream von *mmoXYBR* in Stamm IBE100 (MNO81_04050) und upstream von den Cobalamin-Synthesegenen in Stamm IBE200 (GKP29_RS08420).

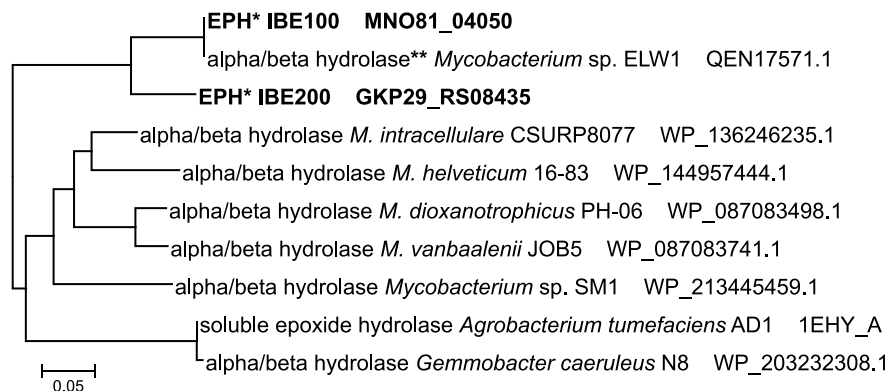


Abbildung 3-14 Evolutionäre Beziehungen zwischen Epoxid-Hydrolasen (EPH)

* bestätigte und ** postulierte Hydrolyse von 1,2-Epoxy-2-Methylpropan.

Ergebnisse

Die entsprechenden codierten Enzyme (303 aa; 304 aa) werden folglich mit EPH bezeichnet, und ihre Strukturen sind in Abschnitt 3.8.2 weiter analysiert. Evolutionäre Beziehungen nah verwandter Hydrolasen sind in Abbildung 3-14 dargestellt.

Die hydrolytische Spaltung des postulierten Zwischenprodukts 1,2-Epoxy-2-methylpropan durch EPH führt wahrscheinlich zu 2-Methylpropan-1,2-diol (Abbildung 3-22, Reaktion 2).

3.4.3 Alkohol-Dehydrogenase (MdpB) und Aldehyd-Dehydrogenase (MdpC)

Es wird davon ausgegangen, dass die bei der Hydrolyse von Epoxiden entstehenden Dirole zu den entsprechenden terminalen Säuren oxidiert werden. Die *tert*-Butanol oxidierenden Stämme *Aquicola tertiaricarbonis* L108 (Rohwerder et al. 2006), *Mycolicibacterium austroafricanum* IFP 2012 (Ferreira et al. 2006) und *Methylibium petroleiphilum* PM1 (Hristova et al. 2007) sowie der 2-Methylpropan-1,2-diol-abbauende Stamm *Actinomycetospora chiangmaiensis* DSM 45062 (Rohwerder et al. 2020) verwenden für diese Schritte spezifische Alkohol-Dehydrogenasen und Aldehyd-Dehydrogenasen. Diese sind jedoch nicht näher verwandt.

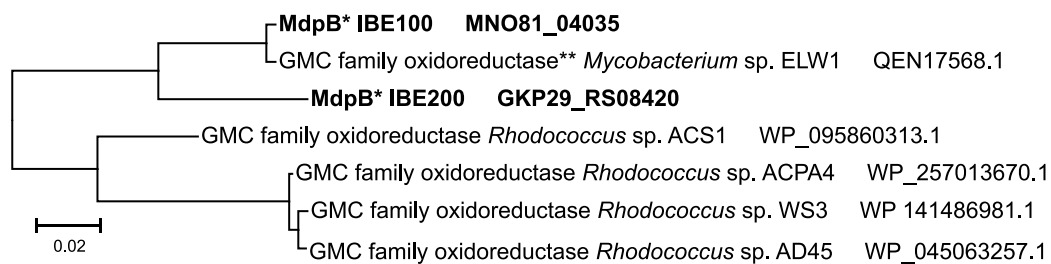


Abbildung 3-15 Evolutionäre Beziehungen zwischen Alkohol-Dehydrogenasen (MdpB)

* bestätigte und ** postulierte Dehydrogenierung von 2-Methylpropan-1,2-diol.

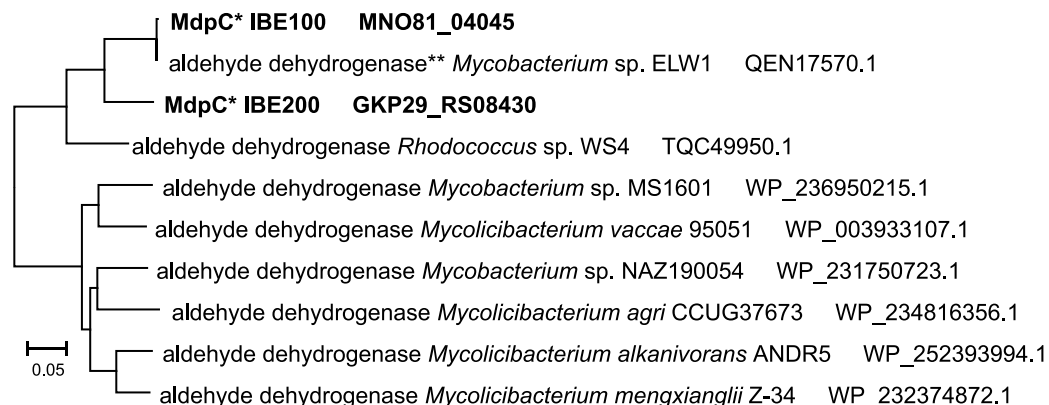


Abbildung 3-16 Evolutionäre Beziehungen zwischen Aldehyd-Dehydrogenasen (MdpC)

* bestätigte und ** postulierte Dehydrogenierung von 2-Hydroxyisobutyraldehyd.

Ergebnisse

Gene, die für Enzyme mit diesen Funktionen codieren, die Alkohol-Dehydrogenase aus der Familie der GMC-Oxidoreduktasen MdpB (MNO81_04035, 545 aa; GKP29_RS08420, 545 aa) und die Aldehyd-Dehydrogenase MdpC (MNO81_04045, 484 aa; GKP29_RS08430, 484 aa), konnten in beiden Clustern identifiziert werden. Die evolutionären Beziehungen zu nah verwandten Dehydrogenasen sind in Abbildung 3-15 und Abbildung 3-16 aufgezeigt.

Die entsprechenden Oxidationsprodukte wären 2-Hydroxyisobutyraldehyd und 2-Hydroxyisobuttersäure (Abbildung 3-22, Reaktionen 3 und 4).

3.4.4 CoA-Ligase (HCL), Mutase (HCM) und zugehöriges Chaperon (MeaH)

Verzweigtkettige Säuren, z. B. Methylmalonsäure, Ethylmalonsäure, Isobuttersäure und 2-Hydroxyisobuttersäure (2-HIBA), unterliegen in der Regel einer Umlagerung des Kohlenstoffskelettes, wie für die Methylmalonyl-CoA-Mutase MCM, Ethylmalonyl-CoA-Mutase ECM, Isobutyryl-CoA-Mutase ICM und Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase HCM gezeigt werden konnte (Abschnitt 2.4.3). Diese Umlagerung erfordert eine vorherige CoA-Aktivierung durch eine CoA-Ligase (Zahn et al. 2019).

Sequenzen, die für Enzyme mit homologer Funktion zur Hydroxyisobutyryl-CoA-Ligase aus *Aquicola tertiaricarbonis* (AFK77666.1) codieren, konnten in beiden Stämmen gefunden werden. Eine CoA-Ligase mit 56 % Identität (472 aa) in Stamm IBE100 (MNO81_03935) und 56 % Identität (473 aa) in Stamm IBE200 (GKP29_RS08445) wurde jeweils in den postulierten Clustern lokalisiert. Bei diesen Enzymen aus der Gruppe der Phenylacetat-CoA-Ligasen handelt es sich wahrscheinlich um Hydroxyisobutyryl-CoA-Ligasen. Weitere evolutionäre Beziehungen nahe verwandter Enzyme sind in Abbildung 3-17 dargestellt.

Das Reaktionsprodukt der Ligase wäre 2-Hydroxyisobutyryl-CoA (Abbildung 3-22, Reaktion 5).

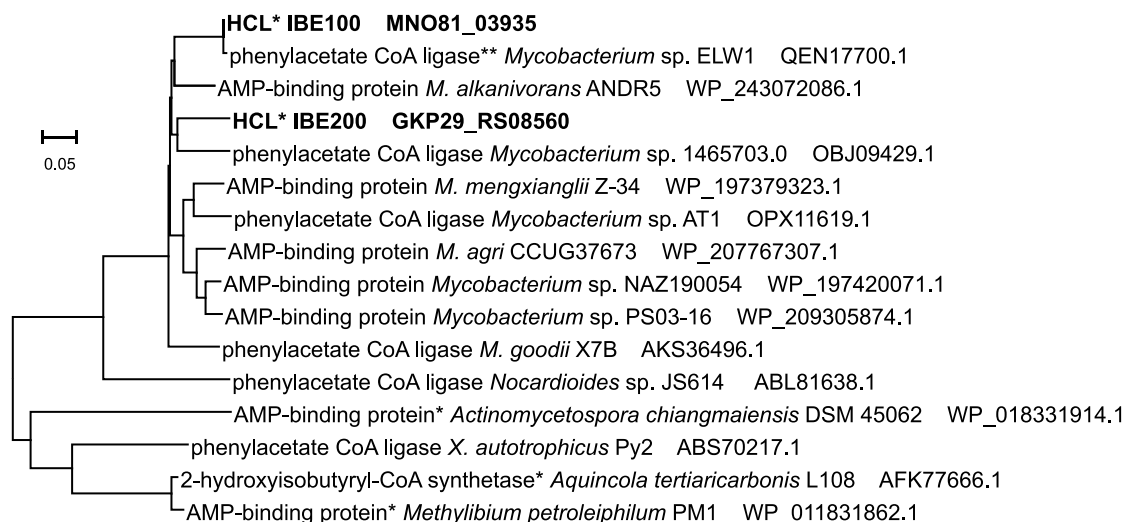


Abbildung 3-17 Evolutionäre Beziehungen zwischen 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Ligasen

* bestätigte und ** postulierte CoA-Ligierung von 2-Hydroxyisobuttersäure.

Ergebnisse

Die Gene, die für die 2-HIBA-CoA-Ligase HCL codieren, sind von Genen umgeben, die wiederum für eine mögliche Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase HcmAB und deren Chaperon MeaH codieren. Die Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase HCM ist ein Vitamin B12-abhängiges radikalisiertes Enzym (Abschnitt 2.4.3) und besteht aus einer Substrat-koordinierenden großen Untereinheit HcmA (MNO81_03945, 575 aa; GKP29_RS08570, 573 aa) und einer Cofaktor-koordinierenden kleinen Untereinheit HcmB (MNO81_03930, 140 aa; GKP29_RS08555, 140 aa). Beide Strukturen werden in Abschnitt 3.8.3 näher analysiert. Evolutionäre Beziehungen nahe verwandter großer Untereinheiten sind in Abbildung 3-18 aufgezeigt.

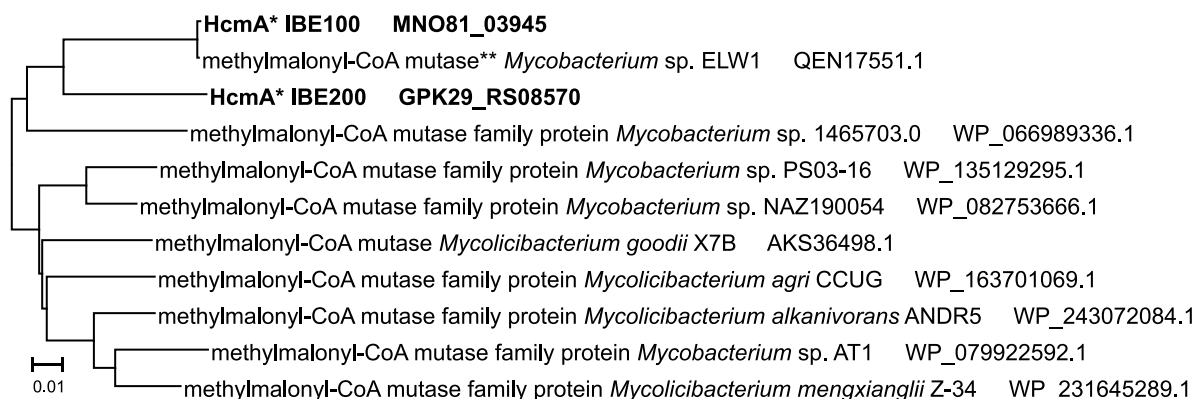


Abbildung 3-18 Evolutionäre Beziehungen zwischen 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutasen

* bestätigte und ** postulierte Linearisierung von 2-Hydroxyisobutyryl-CoA.

Das mutmaßliche Chaperon MeaH (MNO81_03940, 329 aa; GKP29_RS08565, 331 aa) ist in beiden Stämmen als eigenständiges Protein codiert (Abbildung 3-12) und nicht wie bei der Isobutyryl-CoA Mutase IcmF mit der großen Untereinheit fusioniert (Cracan et al. 2010). Es dient u.a. zum Schutz der Mutase vor oxidativer Inaktivierung während der radikalischen Katalyse (Abschnitt 2.4.3).

Die Linearisierung von 2-HIBA-CoA würde 3-Hydroxybutyryl-CoA erzeugen (Abbildung 3-22, Reaktion 6).

3.4.5 Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (FadB) und Acetyltransferase (PhaA)

Das nach der Umlagerung des Kohlenstoffskeletts gebildete 3-Hydroxybutyryl-CoA kann durch Dehydrierung zu 3-Acetoacetyl-CoA (Abbildung 3-22, Reaktion 7) und anschließender Spaltung in den zentralen Stoffwechsel gelangen. Verschiedene Gene, die für Enzyme codieren, die der 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase FadB (QNF04532.1) aus *M. tuberculosis* H37Rv ähnlich sind, konnten in beiden Genomen gefunden werden (MNO81_03965, 288 aa; GKP29_RS08585, 287 aa). Hierbei liegt *fadB* zwischen den Genen, die für die Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase sowie die lösliche di-Eisen-Monooxygenasen *ibeABCDEF* codieren (Abbildung 3-12).

Ergebnisse

Die thiolytische Spaltung in zwei Acetyl-CoA (Abbildung 3-22, Reaktion 8) wird möglicherweise von den Acetyl-CoA C-Acetyltransferasen MNO81_03915 (403 aa) in Stamm IBE100 und GKP29_RS08439 (393 aa) in Stamm IBE200 katalysiert, die sich innerhalb der Cobalamin-Synthese-Gencluster befinden (Abbildung 3-12).

3.4.6 Cobalamin-Synthese

Adenosylcobalamin (AdoCbl) wird als Coenzym für die Umwandlung von 2-HIBA zu 3-HBA benötigt, die durch die 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase katalysiert wird (Abbildung 3-22, Reaktion 6).

Tabelle 3-7 Mit der Synthese von Adenosylcobalamin assoziierte Gene

Beschreibung/prognostizierte Funktion	Gen	Locus tag	Locus tag	Ähnlichkeit
		IBE100 MNO81	IBE200 GKP29_RS	
Glutamyl-tRNA-Reduktase	<i>hemA</i>	22775	23190	88,0 %
δ-Aminolaevulinsäure-Dehydratase	<i>hemB</i>	22760	23175	87,5 %
Porphobilinogen-Deaminase	<i>hemC</i>	22770	23185	90,8 %
Uroporphyrinogen-III-Synthase	<i>hemD</i>	22765	21380	90,5 %
Glutamat-1-semialdehyd-Aminotransferase	<i>hemL</i>	22695	23100	89,4 %
Glutamat-tRNA-Ligase	<i>gltX</i>	12240	00160	88,6 %
Cobalt-Transporter	<i>cbtA</i>	03860	08545	41,1 %
Cobalt-Transporter	<i>cbtB</i>	03865	08550	62,0 %
Uroporphyrinogen-III C-Methyltransferase	<i>cobA</i>	03925	08540	78,2 %
Hydrogenobyrinsäure a,c-diamid-Synthase	<i>cobB</i>	03870	08485	80,5 %
Adenosylcobinamidphosphat-Synthase	<i>cobC</i>	04330	25095	78,9 %
Threoninphosphat-Decarboxylase	<i>cobD</i>	03840	08460	75,6 %
Precorrin-6A-Synthase	<i>cobF</i>	03825	08445	83,7 %
Precorrin-3B-Synthase	<i>cobG</i>	*)	08525	36,6 %
Precorrin-8X-Methylmutase	<i>cobH</i>	03910	08520	88,9 %
Precorrin-2-C20-Methyltransferase	<i>cobI</i>	15825	17590	91,3 %
Precorrin-3B-C17-Methyltransferase	<i>cobJ</i>	03905	08515	87,3 %
Precorrin-6A-Reduktase	<i>cobK</i>	03835	08455	75,5 %
Precorrin-6Y-C5,15-Methyltransferase	<i>cobL</i>	03890	08500	82,5 %
Precorrin-4-C11-Methyltransferase	<i>cobM</i>	03900	08510	81,9 %
Cobalt-Chelatase, α-Untereinheit	<i>cobN</i>	03820	08440	90,0 %
Cob(I)yrinsäure a,c-diamid- Adenosyltransferase	<i>cobO1</i> <i>cobO2</i>	03875 03920	08490 08535	89,2 % 91,1 %
Adenosylcobyrinsäure-Synthase	<i>cobQ</i>	03830	08450	86,4 %
Cob(II)yrinsäure a,c-diamid-Reduktase	<i>cobR</i>	–	–	–
Cobalt-Chelatase, β-Untereinheit	<i>cobS</i>	03880	08495	81,7 %
Cobalt-Chelatase, γ-Untereinheit	<i>cobT</i>	03855	08480	81,2 %
Adenosylcobinamid-Kinase	<i>cobU</i>	03845	08465	73,7 %
Adenosylcobinamid-GDP-Ribazoltransferase	<i>cobV</i>	03850	–	–
5,6-Dimethylbenzimidazol-Synthase	<i>bluB</i>	03895	08505	85,1 %

Die Ähnlichkeiten der übersetzten Aminosäuren zwischen den Enzymen der gleichen prognostizierten Funktion sind angegeben. Das Inkrement der Locus tags beträgt 5. *) Designierte Precorrin-3B-Synthase CobG (Nukleotide 47.817–48.899, minus strand, contig 3).

In den Stämmen IBE100 und IBE200 sind neben Genen, die für Enzyme für den Transport von Cobalt-Ionen codieren, auch jene für die aerobe *de novo*-Synthese – sowohl ausgehend vom C4- als auch vom C5-Weg – in den Genomen vorhanden (Tabelle 3-7). Die Gene des

unteren Syntheseweges befinden sich hauptsächlich downstream des Mutase-codierenden Gens *hcmB* (Abbildung 3-12). Die Gene des C4- und C5-Weges sind nicht Bestandteile der Cluster.

Die Stämme IBE100 und IBE200 besitzen beide keine Gene, die für die Cob(II)yrinsäure α , γ -diamid-Reduktase CobR codieren. Diese Oxidoreduktase reduziert das Co(II)- zum Co(I)-Ion unter Zuhilfenahme von Flavinmononukleotid als Vorbereitung für die kovalente Bindung des Adenosyl-Liganden durch Cob(I)yrinsäure α , γ -diamid-Adenosyltransferase CobO (Abbildung 2-14). Hiervon besitzen beide Stämme jeweils zwei Gene (*cobO1* und *cobO2*), die laut Annotation für dieses Enzym codieren. CobO1 und CobO2 sind jedoch nicht homolog zueinander. In den Datenbanken sind bisher nur wenige Sequenzen für CobR hinterlegt bzw. es existieren keine aus mycobacteriellen Isolaten. Gegebenenfalls ist entweder CobO1 oder CobO2 eine solche Oxidoreduktase vom CobR-Typ. Alternativ kann auch aus Ermangelung an CobR freies Flavinmononukleotid die Reduktase-Funktion übernehmen (Fang et al. 2017).

Das Enzym Adenosylcobinamid-GDP-Ribazoltransferase CobV katalysiert die Bindung des α -Ribazol-5'-phosphat Moleküls mit dem Adenosylcobinamid-GDP. Stamm IBE200 besitzt kein Gen, welches für dieses Enzym codiert. Es ist jedoch möglich, dass die Cobalt-Chelatase β -Untereinheit diese Funktion übernehmen kann (Fang et al. 2017).

Stamm IBE100 besaß nach Annotierung durch RASTtk sowie PGAP kein Gen, welches für die Precorrin-3B-Synthase CobG codiert. Über den tblastn-Algorithmus konnte ein orf (Nukleotide 47.817–48.899, minus strand, contig 3) zwischen *cobH* und *phaA* ermittelt werden, dessen Translationsprodukt eine 36,6 %-ige Ähnlichkeit zu CobG von Stamm IBE200 aufweist. Aus Mangel an Homologen mit höherer Ähnlichkeit im Genom wird diesem orf die entsprechende Funktion zugewiesen.

3.4.7 Andere offene Leserahmen

Es befinden sich insgesamt 18 offene Leserahmen im Degradationscluster von Stamm IBE100 und 15 im Cluster von Stamm IBE200 (Tabelle 3-8), die nicht mit dem Stoffwechselweg von MP in Verbindung gebracht werden konnten. Jeweils zehn dieser codierten Proteine weisen ähnliche Sequenzen und relative Positionen in den jeweiligen Clustern auf, was auf evolutionäre Bezüge hindeuten kann.

Das hypothetical protein MNO81_04040/GKP29_RS08425 ist zu 82,2 % identisch. Homologe hierzu sind in mehreren Destruenten verzweigten Alkene zu finden, z. B. in *Mycobacterium* sp. ELW1 und den Isoprenabbauern *Rhodococcus* sp. AD45, WS3, ACPA4 und ACS1; es konnte jedoch keine Funktion vorhergesagt werden. Es kommt in Stämmen mit Epoxid-Hydrolase- und GSH-Weg vor, nicht aber in Stämmen mit EaCoMT-Weg. Es ist immer mit einer Alkohol-Dehydrogenase aus der Familie der GMC-Oxidoreduktasen geclustert.

Ergebnisse

Tabelle 3-8 Mit dem Abbau von MP nicht assoziierte Gene in den Clustern

Beschreibung/prognostizierte Funktion	Locus tag IBE100 MNO81_0	Locus tag IBE200 GKP29_RS0	Ähnlich- keit	Farb- code
Protein der Xaa-Pro-Peptidase-Familie	–	8470		
Transporter der B-4DMT-Familie	–	8475		
Transposase der IS110-Familie	3885	–		
Ketol-Säure-Reduktoisomerase	3955	8580	82,7 %	
MFS Transporter der MHS-Familie	3960	–		
Hypothetisches Protein	3970	–		
Protein der Histidin-Phosphatase-Familie	–	8590		
Acetolactat-Synthase, große Untereinheit, Thiaminpyrophosphat-Bindeprotein	3975	8595	92,3 %	
Hypothetisches Protein	–	8600		
Transposase	3980	–		
Rekombinase/Integrase vom Tyrosin-Typ	3985	–		
Rekombinase/Integrase vom Tyrosin-Typ	3990	–		
Transposase der IS256-Familie	3995	–		
Protein der Aldehyd-Dehydrogenasen- Familie	4030	8635	73,5 %	
Hypothetisches Protein	4040	8425	91,8 %	
Protein der PPE-Familie	–	8640		
Transposase der IS1634-Familie	4055	–		

Die Ähnlichkeiten der übersetzten Aminosäuren zwischen den Enzymen der gleichen prognostizierten Funktion oder Position im Cluster sind angegeben. Das Inkrement der Locus tags beträgt 5. Der Farbcode bezieht sich auf Abbildung 3-12.

MNO81_03955/GKP29_RS08580 (88,2 % Identität), eine Ketolsäure-Reduktoisomerase, und MNO81_03975/GKP29_RS08595 (86,5 % Identität), eine Acetolactat-Synthase, konnten dem Stoffwechsel der verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin zugeordnet werden. Downstream von *ibeF* liegt eine Aldehyd-Dehydrogenase (MNO81_04030/GKP29_RS08635, 60,9 % Identität). Diese Clusterung ist häufig mit Alken-Monooxygenasen zu beobachten. Proteine mit Identitäten von 60 bis 30 % finden sich unter anderem in den Alkenabbauern *Rhodococcus* sp. AD45 (WP_088288037.1), *Rhodococcus opacus* PD630 (UDH00368.1), *Mycobacterium* sp. AT1 (OPX05309.1), *Mycobacterium* sp. ELW1 (QEN17567.1), *Gordonia* sp. i37 (OPX15009.1) und *X. autotrophicus* Py2 (WP_011992978.1), jedoch konnte keine Funktion im Zusammenhang mit dem Alkenabbau identifiziert werden (McGenity et al. 2018). MNO81_03885, _03980, _03985, _03990, _03995 und _04055, die nur im Stamm IBE100 gefunden wurden, sind Transposase-assoziierte Proteine. Dies weist darauf hin, dass der Cluster teilweise oder in Gänze durch horizontalen Gentransfer erworben wurde.

3.5 Differenzielle SDS-PAGE und Peptidanalyse in Stamm IBE100

Stamm IBE100 war im Gegensatz zu Stamm IBE200 in der Lage, potenzielle Metabolite von MP als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Dies ermöglichte den Ansatz einer

Ergebnisse

differenziellen SDS-PAGE. Jedoch konnte nur die Mutase-Untereinheit HcmA mit diesem Ansatz visuell eingegrenzt werden (Abbildung 3-19, Bande 7). Folglich wurden alle Banden aus der Bahn des Zellextrakts von auf MP gewachsenen Zellen ausgeschnitten und weiterverarbeitet. Mittels Peptidmassen Fingerprint ermittelte Peptidsequenzen konnten gegen die aus den Genomsequenzen abgeleiteten Proteomsequenzen abgeglichen werden.

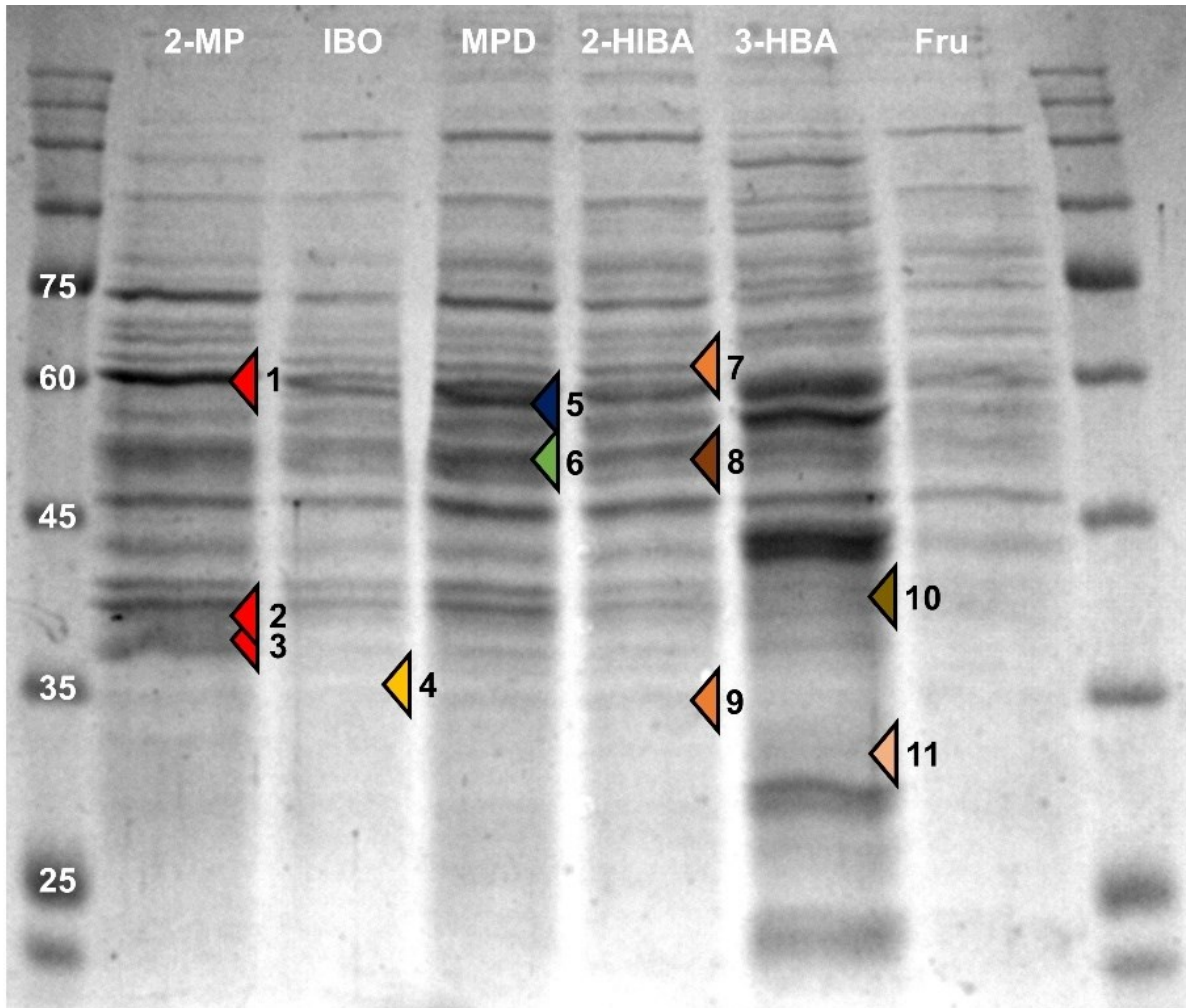


Abbildung 3-19 Differenzielle SDS-PAGE von Stamm IBE100










Coomassie-gefärbtes Acrylamid-Gel mit den löslichen Anteilen der Zellextrakte mit verschiedenen Substraten (MP, IBO: Isobutylenoxid, MPD: 2-Methylpropan-1,2-diol, 2-HIBA, 3-HBA und Fru: Fructose) induzierter Zellen von Stamm IBE100. IBO, MPD, 2-HIBA und 3-HBA sind postulierte Metabolite von MP. Die entsprechenden Zellextrakte sind in der Abbaureihenfolge von rechts nach links aufgetragen. Das Extrakt mit Fructose induzierter Zellen diente als Negativkontrolle. Die farbigen Dreiecke markieren die erwartete Position der Enzyme, die in der Folgereaktion nicht mehr exprimiert sein sollten. Der Farbcode entspricht dem aus Tabelle 3-6 und Abbildung 3-12; die Nummerierung der Banden entspricht der aus Tabelle 3-9. Die Massen der Referenzbanden in den äußeren Bahnen sind in kDa angegeben.

Verschiedene Enzyme, codiert durch Gene aus dem postulierten Cluster (Abbildung 3-12), konnten mittels einzigartiger Peptidsequenzen (unique peptides) identifiziert und mit Übereinstimmungen von 24–95 % der jeweiligen Gesamtsequenz verifiziert werden (Tabelle 3-9). Alle identifizierten Proteine waren größer als 30 kDa und umfassten u.a. die IbeA-, IbeE-

Ergebnisse

und IbeF-Untereinheiten der Isobuten-Monooxygenase, während Methan-Monooxygenase-Untereinheiten (MmoX, MmoY und MmoR mit vorhergesagten Massen von 59,6, 40,9 bzw. 37,9 kDa) nicht identifiziert werden konnten. Weitere Enzyme aus dem Cluster, Epoxid-Hydrolase EPH, Alkohol- (MdpB) und Aldehyd- (MdpC) Dehydrogenase, 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Ligase HCL, 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase HcmA sowie deren Chaperon MeaH, 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase FadB und Acetyl-CoA C-Acetyltransferase PhaA waren exprimiert. Nur die Untereinheiten IbeB, IbeC, IbeD der Isobuten-Monooxygenase und HcmB der Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase waren aufgrund ihrer geringen Größe (10,2, 12,5, 12,3 bzw. 15,3 kDa) mit diesem Ansatz nicht nachweisbar.

Tabelle 3-9 Peptidmassen Fingerprint von Stamm IBE100

Banden-Nr.	Protein	Übereinstimmung	unique peptides	erwartete Masse (kDa)	Farbe-code
1	IbeA	278/505 aa (55 %)	29	58,1	
2	IbeE	205/340 aa (60 %)	16	38,3	
3	IbeF	109/340 aa (32 %)	7	36,3	
4	EPH	182/303 aa (60 %)	11	34,6	
5	MdpB	516/545 aa (95 %)	41	59,8	
6	MdpC	392/484 aa (81 %)	32	52,2	
7	HcmA	342/575 aa (59 %)	29	64,0	
8	HCL	193/472 aa (41 %)	17	53,1	
9	MeaH	106/329 aa (32 %)	7	34,8	
10	FadB	101/288 aa (35 %)	8	30,6	
11	PhaA	98/403 aa (24 %)	5	41,7	

Massenspektrometrische Identifizierung von aus dem Gel ausgeschnittenen Proteinbanden, von denen angenommen wird, dass sie am Abbau von MP in *M. gadium* IBE100 beteiligt sind.

3.6 Transkriptomanalyse in Stamm IBE200

Um die Beteiligung der vom MP-Gencluster codierten Genprodukte in Stamm IBE200 zu überprüfen, wurde eine Genexpressionsanalyse mit auf MP gewachsenen Zellen im Vergleich zu auf 1-Hexanol gewachsenen Zellen durchgeführt. Hexanol wurde als Negativkontrolle gewählt, da keine Überschneidungen zwischen den beiden Abbauwegen zu erwarten waren und weil die Zellmasse und die Wachstumsrate im Vergleich zu auf MP gewachsenen Zellen ähnlich sind. Die RNA-Sequenzen sind bei GenBank unter dem BioProject PRJNA590116 einsehbar.

Gene wurden als signifikant differenziell reguliert angesehen, sofern der angepasste p -Wert (FDR) kleiner als 0,05 und der Betrag des fold change (angegeben als $\log_2|FC|$) größer als 1 waren. Die Analyse ergab, dass 936 von 6.292 Genen differenziell exprimiert wurden, wobei 817 Gene hochreguliert (Abbildung 3-20 blaue Punkte) und 119 Gene herunterreguliert (Abbildung 3-20 rote Punkte) waren. Dabei gehörten die Gene aus dem postulierten Degradationscluster (Tabelle 3-6) zu denjenigen mit den höchsten Expressionsniveaus (Abbildung 3-20 große Symbole). Diese lagen zwischen 17,4- und 71,5-facher Hochregulierung und somit deutlich über dem Signifikanz-Schwellenwert. Das Maß der

Ergebnisse

Regulierung im hochregulierten Induktionszustand ($\log_2|FC|$) der einzelnen Gene des Clusters ist in Abbildung 3-21 verdeutlicht.

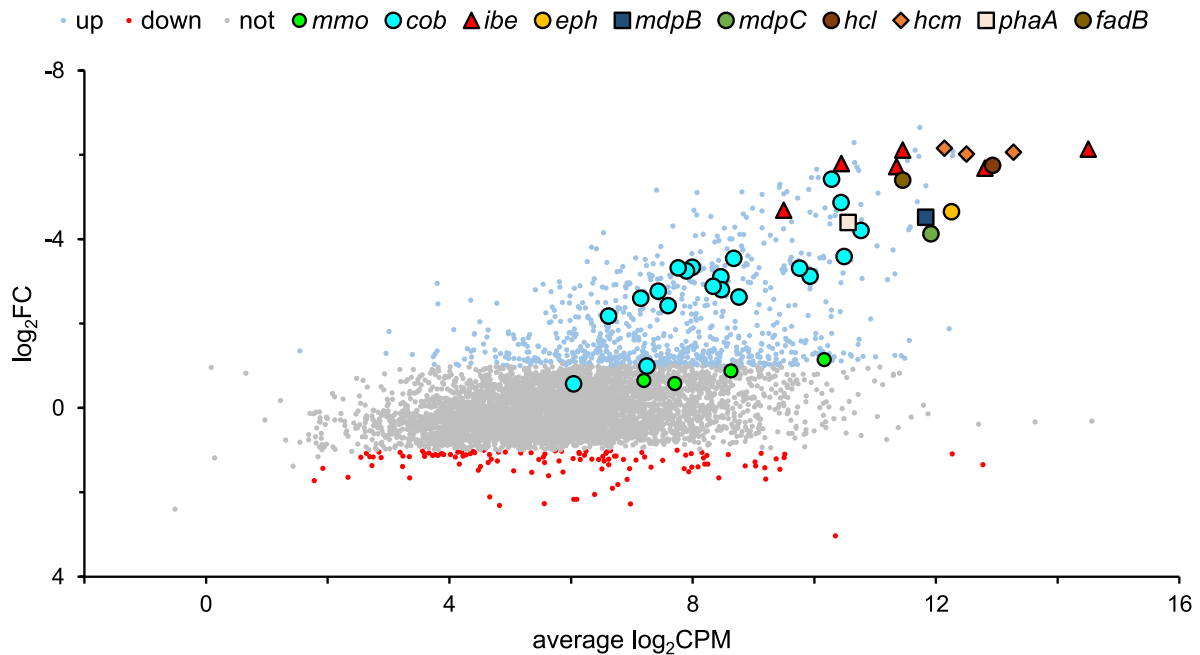


Abbildung 3-20 Genexpressionsmuster von Stamm IBE200

Exprimierte Gene bei Wachstum auf MP im Vergleich zu Wachstum auf 1-Hexanol, aufgetragen als Maß der Regulierung im jeweiligen Induktionszustand (\log_2FC) über das generelle Expressionsniveau des Durchschnitts beider Induktionszustände (\log_2CPM). Dabei waren 119 Gene herunterreguliert (rot), 5.354 Gene nicht reguliert (grau) und 817 Gene hochreguliert (blau). Gene aus dem Cluster sind durch größere Symbole hervorgehoben; der Farbcode bezieht sich auf Abbildung 3-12.

Die höchsten Niveaus wurden bei denjenigen Genen festgestellt, die für das G Protein Chaperon MeaH der Mutase und die α -Untereinheit IbeA der mutmaßlichen Isobuten-Monooxygenase codieren, mit Änderungen um das 71,5-fache bzw. 70,1-fache. Zudem waren die Expressionsniveaus der zugehörigen Gene der Mutase (66,8–64,7-fach) und Monooxygenase (25,7–69,3-fach) sehr hoch, gefolgt von der CoA-Ligase HCL (53,9-fach), der Acetyl-CoA Acetyltransferase PhaA (42,2-fach), Epoxid-Hydrolase EPH (25,1-fach), Alkohol-Dehydrogenase MdpB (22,9-fach), 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase FadB (21,1-fach) und Aldehyd-Dehydrogenase MdpC (17,4-fach). Im Gegensatz dazu wiesen die Gene, die für Untereinheiten der Methan-Monooxygenase codieren, keine Veränderungen in der Expression oder nur leicht erhöhte Expressionsniveaus auf (bis zu 2,2-fach). Dies deutet eindeutig darauf hin, dass die Sechs-Komponenten-SDM für die initiale Oxidation von MP im Stamm IBE200 verantwortlich ist. Das hohe Induktionsniveau aller vorgeschlagenen Gene für den nachfolgenden Abbauweg macht den postulierten Abbauweg sehr wahrscheinlich.

Weiterhin waren Gene für die aerobe Cobalamin-Synthese, einschließlich eines Cobalttransporters, mindestens 4,5-fach hochreguliert, was ihre Rolle beim MP-Abbau unterstreicht.

Ergebnisse

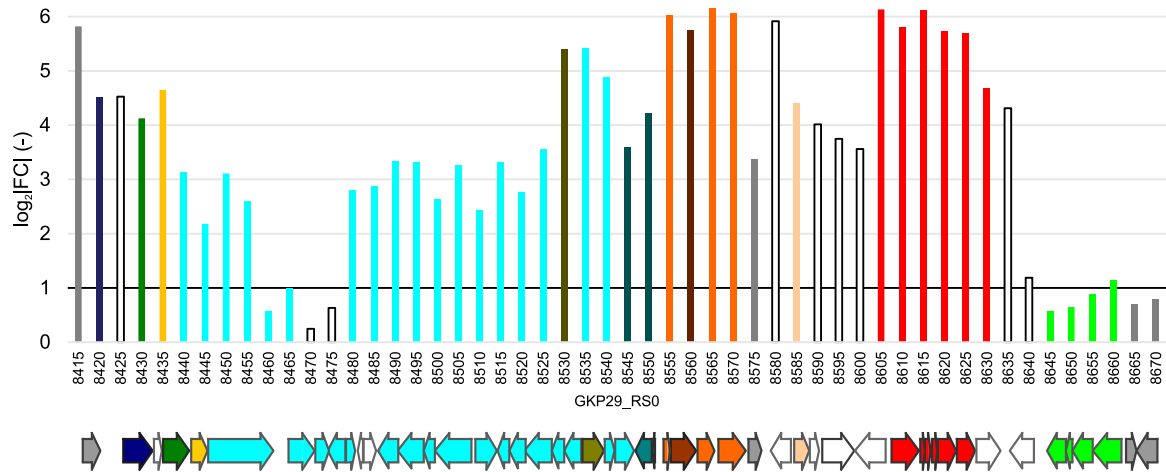


Abbildung 3-21 Expressionsniveaus der Abbau-Gene in *M. paragordoniae* IBE200

Die Expressionsniveaus der postulierten Abbau-Gene liegen deutlich über dem Signifikanz-Schwellenwert (schwarzer Balken). Gene, die für die Methan-Monooxygenase (GKP29_RS08845-8660) codieren, erreichen den Schwellenwert nur knapp oder gar nicht. Der Farbcode bezieht sich auf Abbildung 3-12, der Locus tag auf Tabelle 3-6.

Mehrere Gene außerhalb des Clusters waren ebenfalls signifikant induziert (bis zu 100-fach hochreguliert). Diese konnten den Funktionen der Stressreaktion (General-stress-response-Proteine und Universal-stress-Proteine: GKP29_RS00725, GKP29_RS15305, GKP29_RS16350, GKP29_RS05175, GKP29_RS05200, GKP29_RS05210, GKP29_RS17825, GKP29_RS17835, GKP29_RS12250, GKP29_RS30685, GKP29_RS24825, GKP29_RS31615), der bei *Mycobacteriaceae* üblichen Zellwandmodifikation (Trehalose-Phosphatase und Vorprodukt-Synthese durch Gluconeogenese, Teichonsäure-Synthese: GKP29_RS02900, GKP29_RS05205, GKP29_RS05215, GKP29_RS05255, GKP29_RS19895, GKP29_RS19900), der Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren (Ketol-Säure-Reduktoisomerase, Acetolactat-Synthase, Methylmalonylsemialdehyd-Dehydrogenase: GKP29_RS08580, GKP29_RS08595, GKP29_RS29280, GKP29_RS29285), Lantibiotika-Produktion (Lantipeptidase: GKP29_RS05445, GKP29_RS05450, GKP29_RS05460, GKP29_RS05465) und Fettsäure- sowie Polyketid- und Lipid-Synthese (Branched-chain alpha-keto acid-Dehydrogenase Komplex, Acyl-Carrier-Proteine, Phosphopantethein-Bindeprotein: GKP29_RS14595, GKP29_RS16365, GKP29_RS05180, GKP29_RS05185, GKP29_RS05190, GKP29_RS05195, GKP29_RS05230, GKP29_RS05235, GKP29_RS05240, GKP29_RS05245, GKP29_RS05250, GKP29_RS29650, GKP29_RS29655, GKP29_RS30705) zugeschrieben werden. Dies deutet darauf hin, dass das Wachstum auf MP als wasserunlösliche, niedermolekulare Verbindung für die Zellen ein Stressfaktor darstellt.

3.7 Postulierung des Abbauweges von Methylpropen

Aus den gewonnenen Erkenntnissen konnte ein Abbauweg postuliert und für die Stämme IBE100 und IBE200 gleichermaßen verifiziert werden (Abbildung 3-22).

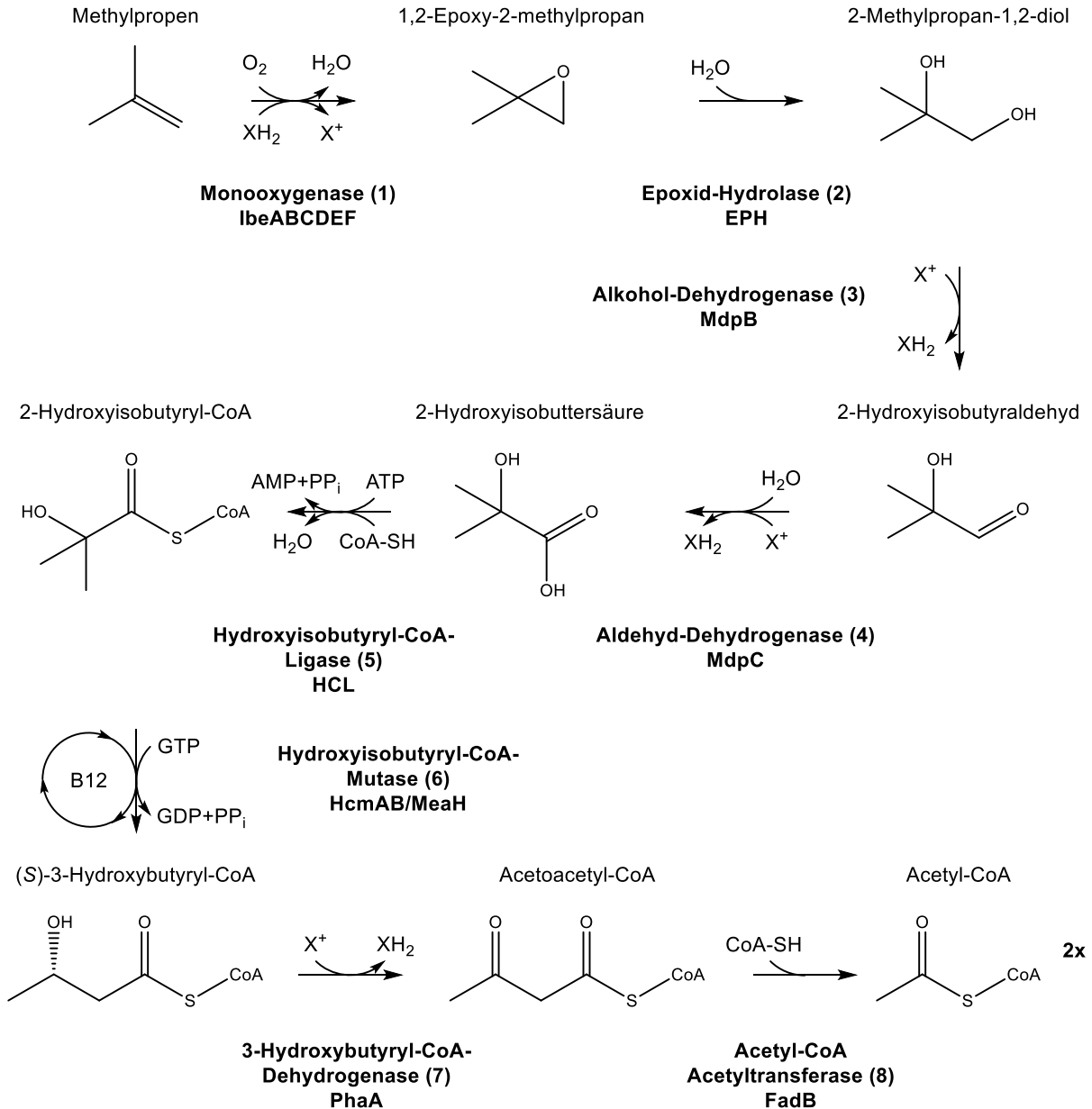


Abbildung 3-22 Der Abbauweg von Methylpropen in den Stämmen IBE100 und IBE200

Verifizierter Abbauweg von Methylpropen in den Stämmen IBE100 und IBE200. Die Oxidation von Methylpropen zu Acetyl-CoA erfolgt dabei über acht Enzyme bzw. Enzymkomplexe. Schlüsselreaktionen hierbei sind die initiale Epoxidierung des Alkens, die hydrolytische Spaltung des entstehenden Epoxids und die radikalische Linearisierung der verzweigten Säure. X: NAD⁺ oder NADP⁺.

Die Alken-Monooxygenase IbeABCDEF des Typs Isopren-Monooxygenase epoxidiert (1) MP zu 1,2-Epoxy-2-methylpropan. Das Epoxid wird mittels der Cofaktor-unabhängigen Hydrolase EPH zu 2-Methylpropan-1,2-diol gespalten (2). Die Dehydrogenierung des Diols (3) wird durch die NADP-abhängige Alkoholdehydrogenase MdpB aus der Familie der GMC-

Oxidoreduktasen katalysiert. Das entstehende 2-Hydroxyisobutyraldehyd wird anschließend mittels der Aldehyd-Dehydrogenase MdpC zur korrespondierenden Säure oxidiert (4), welche von der 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Ligase HCL mittels Coenzym A aktiviert wird (5). 2-Hydroxyisobutyryl-CoA erfährt anschließend eine radikalische, Adenosylcobalamin-abhängige Umlagerung (6) zu 3-Hydroxybutyryl-CoA, katalysiert durch die 2-Hydroxyisobutyryl-CoA Mutase HcmAB und ihr Chaperon MeaH. Die 3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase FadB oxidiert (7) die subterminale Hydroxylgruppe zur Ketogruppe. In einer finalen Reaktion wird Acetoacetyl-CoA thiolytisch durch die Acetyl-CoA C-Acetyltransferase PhaA in zwei Acetyl-CoA gespalten (8), deren Produkte in den zentralen Metabolismus eingehen können.

3.8 Primärstrukturanalysen und Homologiemodelle der Schlüsselenzyme

Basierend auf den Aminosäuresequenzen wurden *in silico* Analysen zur weiteren Charakterisierung der Schlüsselenzyme des Abbauwegs, der Isobuten- bzw. Isopren-Monooxygenase Oxygenase α -Untereinheit jeweils aus den Stämmen IBE100, IBE200 (je IbeA) und *Rhodococcus* sp. AD45 (IsoA), der Epoxid-Hydrolase EPH und der Mutase HcmAB, jeweils aus Stamm IBE200, durchgeführt. Hierbei konnten jeweils das aktive Zentrum, die bei der Katalyse beteiligten Aminosäurereste sowie der Substrattunnel bzw. der Zugang zum aktiven Zentrum identifiziert werden. Die Substrat-koordinierenden Reste können unter Umständen Hinweise auf die Substrataffinität geben, die Durchmesser der Substrattunnel auf die Selektivität. Tertiärstrukturen wurden mittels Homologiemodellen visualisiert.

3.8.1 Strukturanalyse von IbeA

IbeABCDEF ist eine lösliche di-Eisen-Monooxygenase (SDM) aus der Gruppe der Aromaten-/Alken-/Isopren-Monooxygenasen (Abschnitt 3.4.1). Aus dieser Gruppe existieren zwei Enzyme mit bekannter Kristallstruktur, die Toluol-Monooxygenasen TmoABCDEF aus *Ps. mendocina* KR1 (McClay et al. 2000) und TouABCDEF *Ps. stutzeri* OX1 (Sazinsky et al. 2004). Neben der *para*-Hydroxylierung von Toluol sind sie in der Lage, kurzkettige Alkene zu epoxidieren, darunter 1- und 2-Buten sowie Butadien (Tabelle 4-1). Als Referenz für die Isobuten-Monooxygenase dient im Folgenden die Monooxygenase aus Stamm OX1. Das katalytisch aktive di-Eisen-Zentrum ist in der α -Untereinheit PsTouA (pdb: 3rnf, 498 aa, 57,7 kDa) lokalisiert.

Ergebnisse

Gruppe	100		104		137			162			
	Substrat-	Fe-Koordination	Fe-Koordination		Substrate-Koordination						
TouA_OX1	L H F G A	T A L E E	Y A A S T	109	M D E N R	H G Q I Q L	142	W A H K A	I H T N E W	167	
TmoA_KR1	S H Y G A	I A V G E	Y A A V T	109	M D E L R	H G Q L Q L	142	W A W R A	Y H S N E W	167	
IbeA_IBE100 *	L H M G G	T C M V E	Q M A V T	108	L D E T R	H A Q L D L	141	W A Q K A	F H T N E W	166	
IbeA_IBE200 *	2	F H M G A	I T G V E	H M A V T	108	L D E T R	H T Q L N L	141	W A Q K A	F H T N E W	166
IbeA_ELW1 *	L H M G G	T C M V E	Q M A V T	108	L D E T R	H A Q L D L	141	W A Q K A	F H T N E W	166	
IsoA_AD45	L H M G T	T C M V E	H M A V T	108	L D E T R	H T Q L D L	141	W S Q R A	F H T N E W	166	
AamA_Py2 *	L H M G T	I T M V E	H M A V T	109	L D E T R	H T Q L D L	142	W S Q R A	F H T D E W	167	
EtnC_JS614 *	F A V P A	L T D A E	Y Q A V C	101	L D E V R	H A Q L E I	134	I G Q I A	L G N H P I	162	
AmoC_B-276	4	I M V P Q	L T N A E	Y Q A V A	100	L D E V R	H A Q L E M	133	I G Q R G	L Y Q H P A	161
EtnC_JS60	F G I P S	F T D A E	Y Q A T C	101	L D E V R	H T Q I E V	134	I G Q I G	L G N H P I	162	

Gruppe	176		180		231		234		
	Substrat-Koordination	Fe-Koordination	Fe-Koordination						
TouA_OX1	A A R S F	F D D M	M T R D S	185	S I Q T D	E S R H	A A Q Q G G	239	
TmoA_KR1	A A K H F	F D D I	I T G R D A	185	S I Q T D	E S R H	A A Q Q G G	239	
IbeA_IBE100 *	A V K N F	F D D A	M L N A D C	184	S I Q T D	E A R H	A A Q Q G F	238	
IbeA_IBE200 *	2	A V K N F	F D D I	M L N A D C	184	S T Q T D	E A R H	A A Q T G F	238
IbeA_ELW1 *	A V K N F	F D D A	M L N A D C	184	S I Q T D	E A R H	A A Q Q G F	238	
IsoA_AD45	A V K N F	F D D A	M L N A D C	184	S I Q T D	E A R H	A A Q Q G F	238	
AamA_Py2 *	A T R N L	F D D I	M L N A D C	185	S I Q T D	E A R H	A A Q L G F	239	
EtnC_JS614 *	A R A S F	G P - -	F N T G D P	178	S I Q S D	E S R H	M A N G Y	232	
AmoC_B-276	4	S I G E F	G H - -	F N T G D P	177	S I Q S D	E A R H	M A N G Y	231
EtnC_JS60	A R A S F	G S - -	F N T G D P	178	S I Q S D	E S R H	M A N G Y	232	

Abbildung 3-23 Sequenzvergleich von α -Untereinheiten ausgewählter SDMs

Sequenzvergleich ausgewählter α -Untereinheiten von Monooxygenasen mit Epoxidase-Aktivität gegenüber Alkenen. TouA_OX1: Toluol-4-Monooxygenase aus *Ps. stutzeri* OX1, TmoA_KR1: Toluol-4-Monooxygenase aus *Ps. mendocina* KR1, IbeA_ELW1: Isobuten-Monooxygenase aus *Mycobacterium* sp. ELW1, IsoA_AD45: Isopren-Monooxygenase aus *Rhodococcus* sp. AD45, AamA_Py2: Propen-Monooxygenase aus *X. autotrophicus* Py2, EtnC_JS614: Ethen-Monooxygenase aus *Nocardioides* sp. JS614, AmoC_B-276: Alken-Monooxygenase aus *Gordonia rubripertincta* B-276, EtnC_JS60: Ethen-Monooxygenase aus *M. rhodesiae* JS60. Substrat und di-Eisen-Zentrum koordinierende Reste sind eingerahmt. * markierte SDMs epoxidieren MP.

Ein Sequenzvergleich an den und um die entsprechenden Positionen der Reste für die Eisen- sowie potenzielle Substrat-Koordination zeigt beteiligte Aminosäuren in anderen SDMs mit Epoxidaseaktivität gegenüber Alkenen auf (Abbildung 3-23). Das für die SDMs typische EXXH-Motiv (231 bis 234) sowie Histidin und Glutamat an äquivalenten Positionen zu 137 und 104 koordinieren die beiden Eisenatome im aktiven Zentrum und sind in allen betrachteten SDMs hoch konserviert. Hingegen kann bei den Substrat-koordinierenden Resten 100, 103, 162, 176 und 180 eine Variabilität festgestellt werden, auch innerhalb der gleichen Gruppe (vgl. Abbildung 3-13).

Die Modellierung der Monomere der α -Untereinheiten aus den Stämmen IBE100 (Abbildung 3-26), IBE200 (Abbildung 3-25) und *Rhodococcus* sp. AD45 (Abbildung 3-26) wurde mit SwissModel durchgeführt. Die α -Untereinheit der entsprechenden SDM von Stamm ELW1 unterscheidet sich in nur einer Aminosäure von derjenigen aus Stamm IBE100 (T191N), welche nicht das aktive Zentrum oder einen Substrattunnel mit aufspannt. Somit können bei der Betrachtung der SDM aus Stamm IBE100 die Erkenntnisse auf die von Stamm ELW1 übertragen werden. Die Volumina der aktiven Zentren sowie die Längen und Durchmesser der

Ergebnisse

vermuteten Substrattunnel sind in Tabelle 3-10 zusammengefasst. Der Substrattunnel ist gegabelt, eine Aufteilung in Ein- (grün) und Ausgang (blau) ist zu vermuten (Bailey et al. 2008b). Demnach kollabiert der Eingang während der Katalyse durch eine vom Effektorprotein des Enzymkomplexes induzierte Konformationsänderung. Somit kann neues Substrat erst nachrücken, wenn das Produkt das aktive Zentrum verlassen hat.

Tabelle 3-10 Daten der Homologiemodelle ausgewählter SDMs

Stamm		IBE100 (ELW1)	IBE200	AD45
Identität/Ähnlichkeit zu TouA	%	51,7 / 67,7	51,0 / 66,9	50,4 / 67,1
Volumen aktives Zentrum	Å ³	295,0	347,0	542,0
Länge Eingang	Å	30,0	28,5	20,0
Minimaler Durchmesser Eingang	Å	2,6	2,6	2,0
Maximaler Durchmesser Eingang	Å	5,8	5,6	5,4
Länge Ausgang	Å	31,5	31,0	26,0
Minimaler Durchmesser Ausgang	Å	3,2	3,2	2,8
Maximaler Durchmesser Ausgang	Å	5,8	5,6	5,6

Länge der Tunnel gemessen vom aktiven Zentrum aus. TouA: 3RNF_A (OX1), IbeA: MNO81_04000 (IBE100), IbeA: GKP29_RS08605 (IBE200), IsoA: KJF19164.1 (AD45).

Ergebnisse

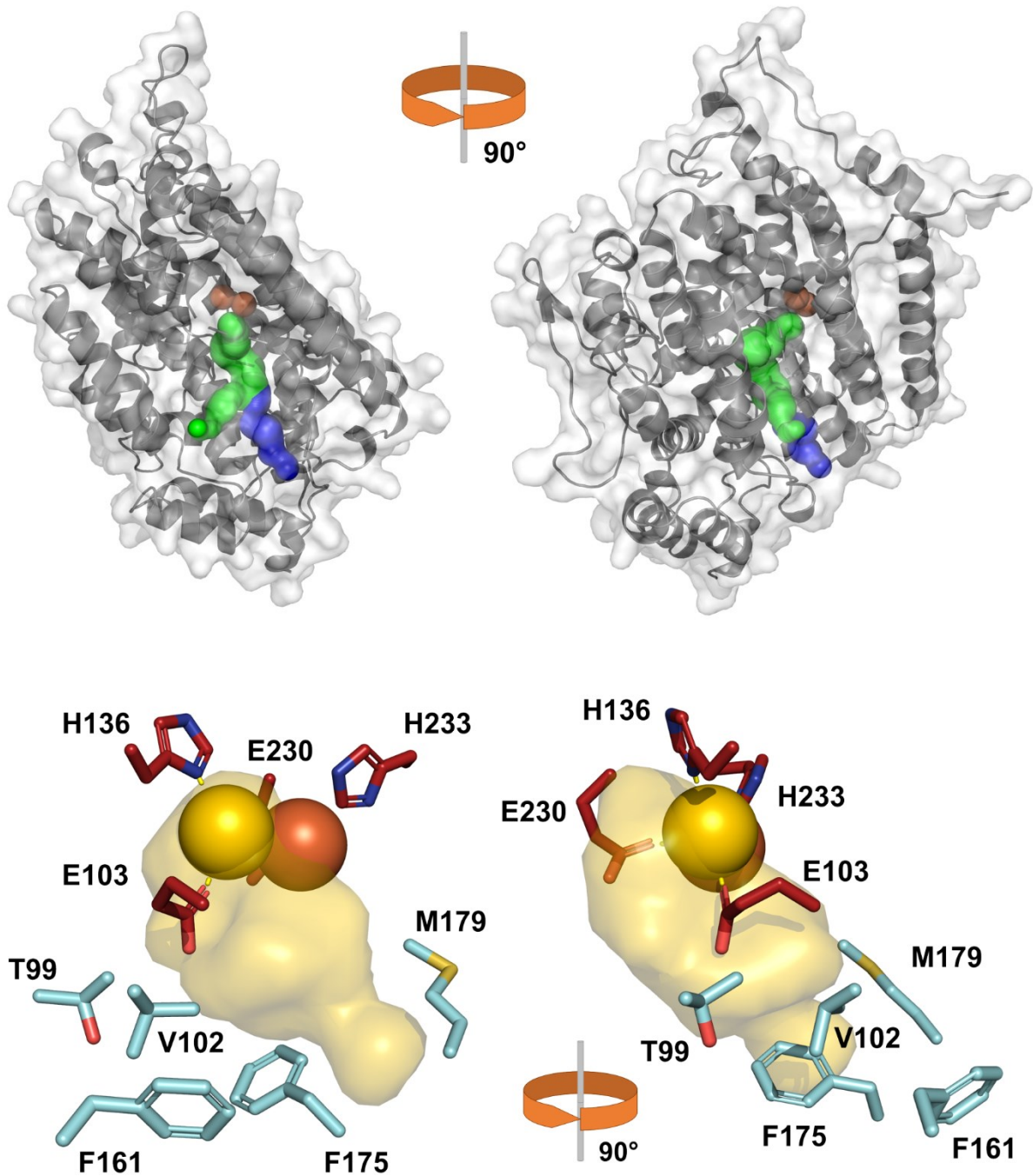


Abbildung 3-24 Homologiemodell von IbeA aus Stamm IBE100

Oben: Monomer der α -Untereinheit der SDM. Di-Eisen-Zentrum in rot, Substrattunnel Eingang in grün, Substrattunnel Ausgang in blau.

Unten: Aktives Zentrum der α -Untereinheit der SDM in gold. Eisen-koordinierende Reste in rot, potenziell Substrat-koordinierende Reste in cyan.

Die Modellierung erfolgte mit SwissModel.

Ergebnisse

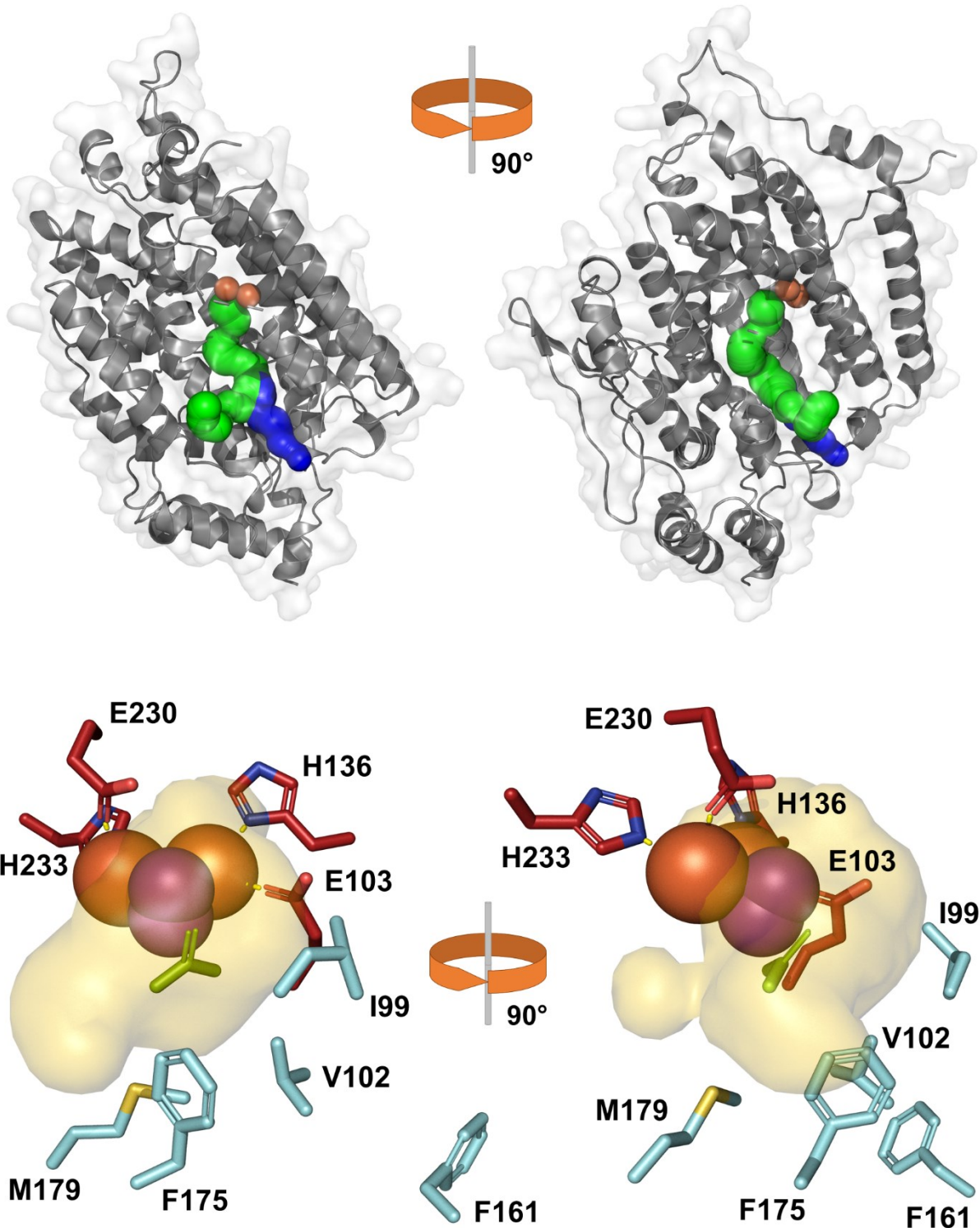


Abbildung 3-25 Homologiemodell von IbeA aus Stamm IBE200

Oben: Monomer der α -Untereinheit der SDM. Di-Eisen-Zentrum in rot, Substrattunnel Eingang in grün, Substrattunnel Ausgang in blau.

Unten: Aktives Zentrum der α -Untereinheit der SDM in gold. Eisen-kordinierende Reste in rot, potenziell Substrat-kordinierende Reste in cyan.

Substrat in spalterbsengrün, Sauerstoff in magenta. MP ist manuell gedockt, ohne Einbeziehen der Bindeenergien. Die Ausrichtung des Moleküls erfolgte nach in der Literatur beschriebenem Muster für TouA (Acheson et al. 2017) unter Anpassung an die Geometrie des erzeugten Modells.

Die Modellierung erfolgte mit SwissModel.

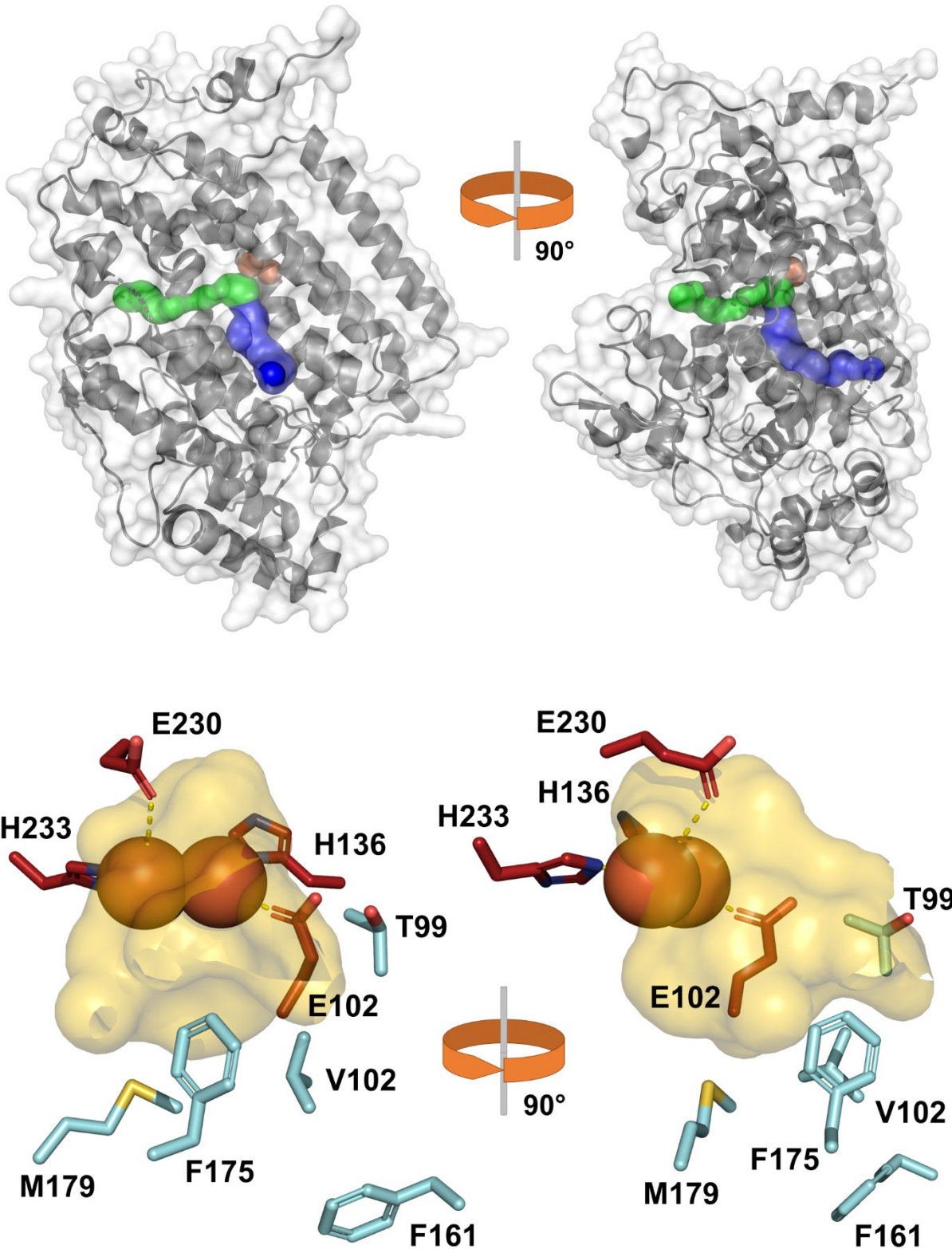


Abbildung 3-26 Homologiemodell von IsoA aus *Rhodococcus* sp. AD45.

Oben: Monomer der α -Untereinheit der SDM. Di-Eisen-Zentrum in rot, Substrattunnel Eingang in grün, Substrattunnel Ausgang in blau.

Unten: Aktives Zentrum der α -Untereinheit der SDM in gold. Eisen-kordinierende Reste in rot, potenziell Substrat-kordinierende Reste in cyan.

Die Modellierung erfolgte mit SwissModel.

3.8.2 Strukturanalyse der EPH

Sequenz- (Abschnitt 3.4.2) und Sekundärstrukturanalysen gruppieren die Epoxid-Hydrolasen aus den Stämmen IBE100 (*Mg*EPH) und IBE200 (*Mp*EPH) zur Familie der α/β -fold Hydrolasen. Das am nächsten verwandte Enzym mit gelöster Kristallstruktur ist die Epichlorhydrinhydrolase *AtuEchA* (pdb: 1ehy, 294 aa, 34 kDa) aus *Agrobacterium tumefaciens* AD1, welche die Ringöffnung von 2-(Chlormethyl)oxiran zu 3-Chlorpropan-1,2-diol katalysiert. Zwischen den Enzymen besteht eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von 84,7 % (*Mg*EPH, 912 aa, 34,6 kDa) bzw. 86,4 % (*Mp*EPH, 915 aa, 34,6 kDa) bei einer Sequenzidentität von 70,4 % (*Mg*EPH) bzw. 72,0 % (*Mp*EPH) zu *AtuEchA*. Die für die Enzymfamilie typischen Substrat-koordinierenden Tyrosin-Reste, die katalytische Triade Asp–His–Asp sowie das den Enzym-Substrat-Komplex-stabilisierende HGWP-Motiv sind in den designierten Epoxid-Hydrolasen der MP-mineralisierenden Stämmen präsent. Ein Sequenzvergleich zeigt die identischen Reste an den entsprechenden Positionen (Abbildung 3-27).

		38			107			152		
EchA_AD1	T L L L L	H G W P	G F W W E	44	Y V V G H	D F A A I V	112	V H E S W	Y S Q F H Q 157	
EPH_IBE100	P L L L L	H G W P	G F W W E	54	Y V V G H	D Y A A I I	122	V S E S W	Y S Q F H Q 167	
EPH_IBE200	P L L L L	H G W P	G F W W E	55	Y I V G H	D Y A A I I	123	V S E S W	Y S Q F H Q 168	
EPH_ELW1	P L L L L	H G W P	G F W W E	54	Y V V G H	D Y A A I I	122	V S E S W	Y S Q F H Q 167	
		Stabilisierung			katalytische Triade - Nu			Substrat-Koordination		
				215			246		275	
EchA_AD1	G G F N Y	Y R A N I R	220	I W G L G	D T C V P Y	251	I E D C G	H F L M V E	280	
EPH_IBE100	G G F N Y	Y R A N L S	230	L W G Q G	D T V V P S	261	V E D A G	H F M M V E	289	
EPH_IBE200	G G F N Y	Y R A N L S	231	L W G Q G	D T V V P S	262	I E D G G	H F M M V E	290	
EPH_ELW1	G G F N Y	Y R A N L S	230	L W G Q G	D T V V P S	261	V E D A G	H F M M V E	289	
		Substrat-Koordination			katalytische Triade - H ₂ O			katalytische Triade - H ₂ O		

Abbildung 3-27 Sequenzvergleich ausgewählter Epoxid-Hydrolasen

EchA_AD1: Epichlorhydrin-Hydrolase aus *Agrobacterium tumefaciens* AD1, EPH_IBE100: Epoxid-Hydrolase aus *M. gadium* IBE100, EPH_IBE200: Epoxid-Hydrolase aus *M. paragordoniae* IBE200, EPH_ELW1: Epoxid-Hydrolase aus *Mycobacterium* sp. ELW1. An der Reaktion beteiligte Reste sind eingerahmt.

Die Modellierung des Monomers von *Mp*EPH wurde mit I-TASSER durchgeführt. Das aktive Zentrum (Abbildung 3-28 b) liegt zwischen core und cap domain, mit direkter Verbindung zum umgebenden Medium (Abbildung 3-28 a). Der Durchbruch hat einen Durchmesser von ca. 3 Å, das aktive Zentrum ein Volumen von 560 Å³.

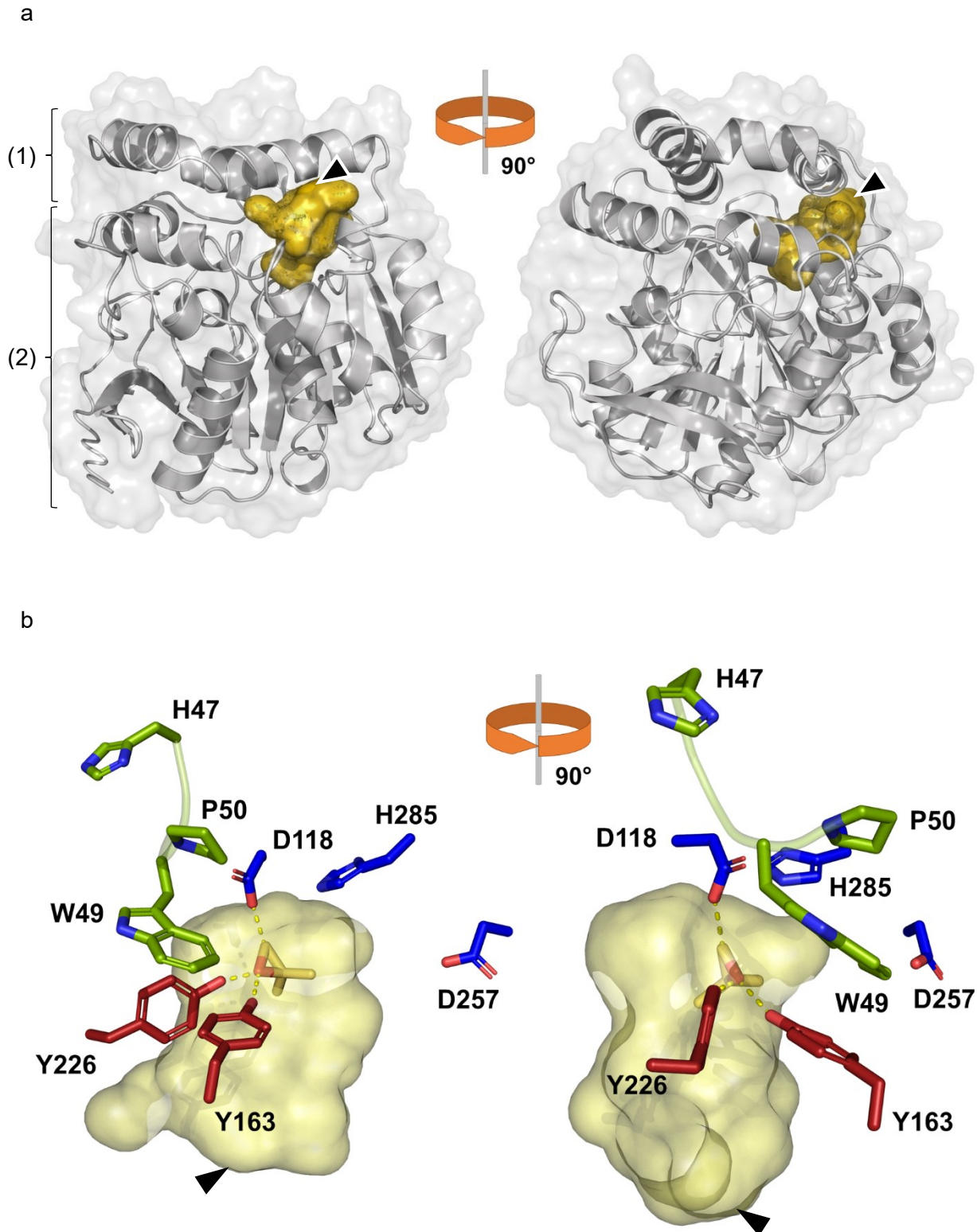


Abbildung 3-28 Homologiemodell der Epoxid-Hydrolase *MpEPH* aus Stamm IBE200

a. Monomer der Epoxid-Hydrolase. (1) cap domain (2) core domain. Aktives Zentrum in gold. Der schwarze Pfeil markiert die Öffnung zum aktiven Zentrum.

b. Aktives Zentrum der EPH. Rot: Substrat-koordinierende Tyrosin-Reste, blau: Asp–His–Asp Triade, grün: Substrat-Enzym-Komplex-stabilisierendes HGWP-Motiv, gelb: Wasserstoffbrücken zwischen den koordinierenden Resten und dem Liganden. 1,2-Epoxy-2-methylpropan wurde manuell gedockt, ohne die Bindeenergien zu betrachten. Die Ausrichtung des Moleküls erfolgte nach in der Literatur beschriebenem Muster (Nardini et al. 1999) unter Einbeziehung der Geometrie des erzeugten Modells. Die Modellierung erfolgte mit I-TASSER.

3.8.3 Strukturanalyse von HcmA

Das mit den Mutasen aus *M. gadium* IBE100 (*MgHcm*) und *M. paragordoniae* IBE200 (*MpHcm*) am nächsten verwandte Enzym mit gelöster Kristallstruktur ist die 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase *AteHcm* (pdb: 4r3u) aus *Aquicola tertiaricarbonis* L108, welches die Umlagerung von 2-HIBA-CoA zu *S*-3-HBA-CoA katalysiert. Zwischen den großen Untereinheiten besteht eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von 79,2 % (*MgHcmA*, 575 aa, 64,0 kDa) bzw. 81,1 % (*MpHcmA*, 573 aa, 63,8 kDa) bei einer Sequenzidentität von 63,3 % (*MgHcmA*) bzw. 65,6 % (*MpHcmA*) zu *AteHcmA* (584 aa, 65,9 kDa). Zwischen den kleinen Untereinheiten besteht eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen von 79,2 % (*MgHcmB*, 140 aa, 15,1 kDa) bzw. 78,7 % (*MpHcmB*, 140 aa, 15,1 kDa) bei einer Sequenzidentität von 60,8 % (*MgHcmB*) bzw. 63,0 % (*MpHcmB*) zu *AteHcmB* (158 aa, 17,0 kDa). Der Sequenzvergleich (Abbildung 3-29) zeigt, dass die Reste für die Koordination des Substrats – 90I, 117D, 198Q und 245H – aus *AteHcmA* in den Untereinheiten der MP-mineralisierenden *Mycobacteria* identisch sind (Abbildung 3-30 b). Daraus kann geschlossen werden, dass 2-Hydroxyisobutyryl-CoA als Substrat fungiert. Der die Stereospezifität bestimmende Rest an Position 117 ist in den Enzymen der *Mycobacteria* eine Asparaginsäure; somit ist *S*-3-HBA-CoA das wahrscheinliche Produkt in den Stämmen IBE100 und IBE200 (Kurteva-Yaneva et al. 2015; Weichler et al. 2015).

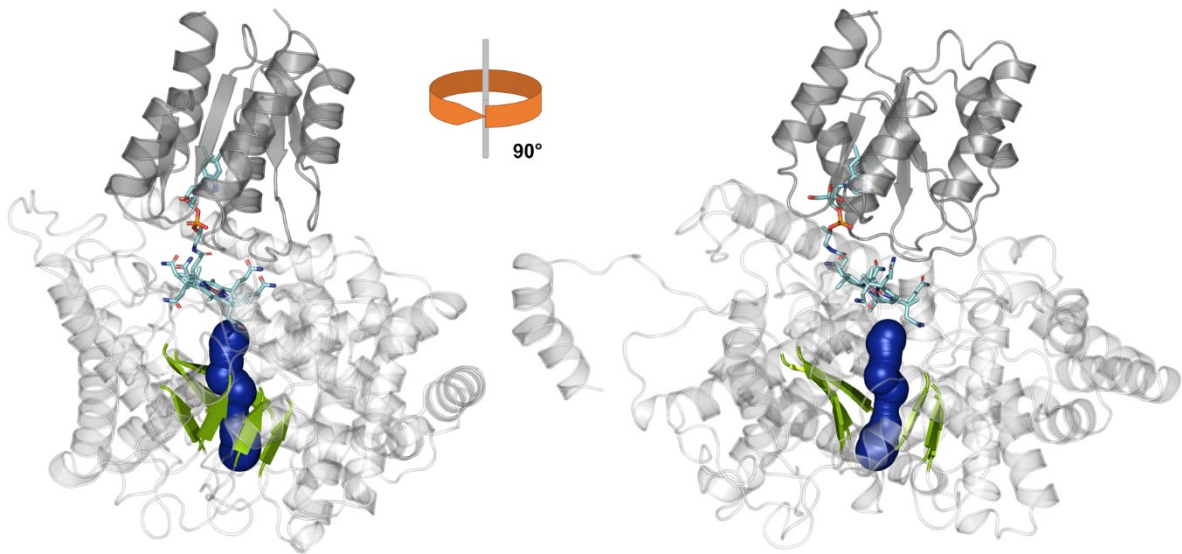
HcmA_L108	W T M R Q I A G F G T 95	T G I S T D F D M P T 122	L S G T V Q A D I L K 203	N I S G Y H I S E A G 250
HcmA_IBE100	W T M R Q I A G F G Q 108	T G L S V D F D M P T 135	L S G T Q N D I L K 216	N I S G Y H I S E A G 263
HcmA_IBE200	W T M R Q I A G F G Q 106	T G L S V D F D M P T 133	L S G T Q N D I L K 214	N I S G Y H I S E A G 261
HcmA_ELW1	W T M R Q I A G F G Q 108	T G L S V D F D M P T 135	L S G T Q N D I L K 216	N I S G Y H I S E A G 263
HcmA_K.tus	F T I R Q I A G F G T 95	T G T S V V L D L P T 122	L S G T N N D F L M 205	S Y N G Y N L R E A G 253
IcmA_S.cinn	W T I R Q F A G F G N 85	G G L S V A F D M P T 112	L N G T L Q T D I F K 193	S V S G Y H I R E A G 240
Ecm_R.sphaer	W L F R T Y A G H S T 18	T G L S V A F D L P T 45	L Q G T V Q N D L M K 126	N V C S Y H L Q E A G 173
	Hydroxyl-Bindungsstelle 1	Hydroxyl-Bindungsstelle 2	Carbonyl-Bindungsstelle 1	Carbonyl-Bindungsstelle 2

Abbildung 3-29 Sequenzvergleich ausgewählter Acyl-CoA-Mutasen

Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutasen aus *Aquicola tertiaricarbonis* L108 (HcmA_L108), *M. gadium* IBE100 (HcmA_IBE100), *M. paragordoniae* IBE200 (HcmA_IBE200), *Mycobacterium* sp. ELW1 (HcmA_ELW1), *RcmA_K.tus*: Hcm mit *R*-Präferenz aus *Kyrpidia tusciae* DSM 2912, *IcmA_S.cinn*: Isobutyryl-CoA-Mutase *IcmA* aus *Streptomyces cinnamonensis*, *Ecm_R.sphaer*: Ethylmalonyl-CoA-Mutase ECM aus *Rhodococcus sphaeroides*. Substrat-kordinierende Reste sind eingerahmt.

Die Modellierung des Monomers von *MpHcmAB* wurde mit SwissModel durchgeführt. Das aktive Zentrum (Abbildung 3-30 b) liegt in der großen Untereinheit HcmA und wird durch den von HcmB koordinierten Corrin-Ring gedeckelt. Der Substrattunnel durchzieht die gesamte große Untereinheit und ist hauptsächlich durch die β -Stränge einer TIM barrel Struktur eingefasst (Abbildung 3-30 a). Er hat eine Länge von ca. 17,5 Å bei einem minimalen Durchmesser von 1,6 Å und einem maximalen Durchmesser von 2,5 Å. Das Substrat füllt den Tunnel der Länge nach aus, wobei der Säurerest bis an den Corrin-Ring heranreicht und die Adenosin-Gruppe des CoA-Restes auf der anderen Seite am Tunneleingang aus dem Enzym herausragt.

a



b

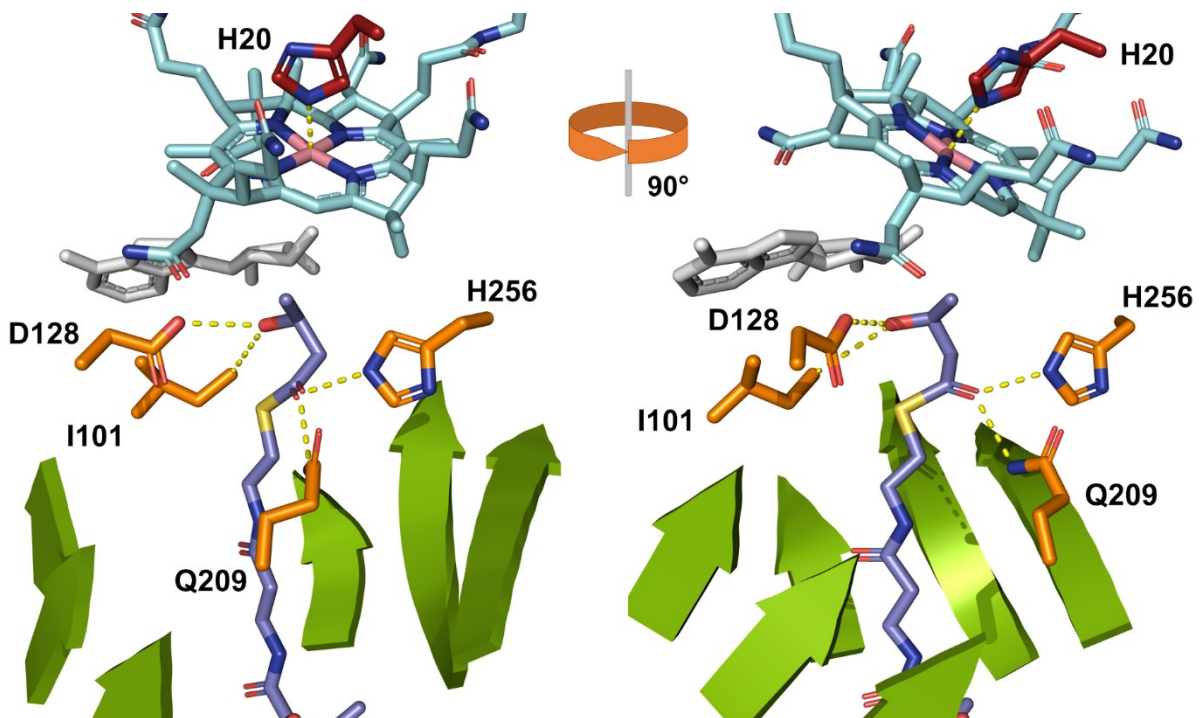


Abbildung 3-30 Homologiemodell der Mutase *MpHcmAB* aus Stamm IBE200

a. α/β -Heterodimer der Mutase. HcmA in hellgrau, HcmB in dunkelgrau, Adenosylcobalamin in türkis, TIM barrel Struktur in grün, Subtrattunnel in blau.

b. Aktives Zentrum der Mutase. Rot: Corrin-Ring. (türkis): koordinierender Histidin-Rest der kleinen Untereinheit HcmB, weiß: Adenosyl-Rest, grün: S-3-HBA-CoA. (blau): koordinierende Reste der großen Untereinheit HcmA, gelb: Wasserstoffbrücken zwischen den koordinierenden Resten und den Liganden. Das Docking von 3-HBA-CoA wurde von der Vorlage des erzeugten Modells übernommen.

Die Modellierung erfolgte mit SwissModel.

3.9 Heterologe Expression von *Mplbe*ABCDEF+*MpEPH*

3.9.1 Expressionswirt- und Vektorauswahl

Für die Konstruktion eines Expressionssystems für die lösliche di-Eisen-Monooxygenase (*Mplbe*ABCDEF) und EPH (*MpEPH*) aus Stamm IBE200 konnte auf den Standard-Expressionswirt für Mycobakterien, *M. smegmatis* MC2 155, aufgrund von dessen Eingruppierung in die Risikogruppe 2 nicht zurückgegriffen werden. Stattdessen wurden Kombinationen aus sieben Wirten und vier Vektoren erzeugt und getestet: pT7-7: *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* JM109; pCOM10/pUS250¹: *Ps. taiwanensis* VLB120, *Ps. putida* mt-2 KT2440, *Ps. veronii* MEK700; pST-K: *M. austroafricanum* TBA100, *M. fluoranthenorans* BUT6.

Die per PCR vervielfältigten Genabschnitte der Monooxygenase und Epoxid-Hydrolase wurden mittels Restriktionsklonierung in den entsprechenden Vektor integriert und zunächst per heat shock in den chemisch kompetenten Zwischenwirt *E. coli* DH5α transformiert. Nach der Selektion von Klonen mit korrekten Inserts wurden die Plasmide isoliert und mittels Elektroporation in den Expressionswirt eingebracht.

Mit Ausnahme des Paares *M. austroafricanum* und pST-K konnten alle Wirt-Vektor-Kombinationen erstellt werden. Mit dem Paar aus dem Wirt *M. fluoranthenorans* BUT6 und dem Vektor pST-K gelang als einziges die Expression (Abschnitt 3.9.2) der Monooxygenase inklusive Substratumsatz (Abschnitt 3.9.3).

M. fluoranthenorans BUT6 wird hier erstmals als Expressionswirt dargestellt. Dieser Stamm wurde auf *n*-Butan als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle isoliert (Helbich 2011); ein Übergang des zu oxidierenden Substrats MP über die Zellwand ist somit wahrscheinlich. Der Wildtyp BUT6 oxidiert und wächst nicht auf MP sowie den postulierten Metaboliten 1,2-Epoxy-2-methylpropan, 2-Methylpropan-1,2-diol und 2-HIBA. Wachstum auf *DL*-3-HBA als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle ist möglich. Der Stamm ist Kanamycin-sensitiv.

3.9.2 Nachweis der Expression mittels Peptidmassen Fingerprint

Der Nachweis der Expression der auf dem Vektor codierten Gene *Mpibe*ABCDEF und *Mpeph* durch Stamm BUT6 wurde mittels Peptidmassen Fingerprint (PMF) mit dem löslichen Anteil des Zellextraktes durchgeführt. Entgegen dem Vorgehen in Abschnitt 3.5, der differentiellen SDS-PAGE mit Zellextrakt von Stamm IBE100, bei der die Auflösung möglichst vieler Massenfraktionen zur visuellen Identifikation erzielt werden sollte, war hier der Nachweis von Peptiden kleiner 15 kDa erforderlich. Demzufolge wurde die Elektrophorese nur so lange betrieben, wie die Proteinfront 0,5–1,0 cm an Laufstrecke im Trenngel zurückgelegt hatte. Die

¹ pUS250, ein Expressionsvektor für *Pseudomonas putida* und Mycobacteria, war eine großzügige Spende von Nicholas V. Coleman, School of Life and Environmental Sciences, University of Sydney, Australia (bisher unveröffentlicht).

Ergebnisse

so gereinigte Probe, also der lösliche Anteil des Gesamtproteoms, wurde ausgeschnitten, verdaut und analysiert.

Tabelle 3-11 Mittels PMF nachgewiesene Peptide in BUT6 pST-K-ibeABCDEF-eph

		30 °C			21 °C
		4 Tage			4 Tage
Protein	erwartete Größe/Masse (aa / kDa)	Übereinstimmung	unique peptides	Übereinstimmung	unique peptides
IbeA	506 / 58,1	16 % / 83 aa	6	40 % / 202 aa	15
IbeB	92 / 10,1	26 % / 24 aa	1	82 % / 75 aa	5
IbeC	47 / 12,4	19 % / 21 aa	2	42 % / 47 aa	3
IbeD	88 / 12,4	50 % / 55 aa	3	81 % / 88 aa	5
IbeE	193 / 38,5	27 % / 94 aa	9	56 % / 193 aa	17
IbeF	339 / 36,5	ND	–	ND	–
EPH	304 / 34,6	ND	–	ND	–
KanR	264 / 29,0	11 % / 29 aa	2	ND	–

Mittels PMF nachgewiesene Peptide des Expressionssystems bei 30 °C und 21 °C Inkubationstemperatur der zugrundeliegenden Flüssigkultur. ND: Nicht detektierte Proteine.

Die Untereinheiten IbeA bis IbeE konnten im Zellextrakt von bei 30 °C gewachsenen Zellen detektiert werden (Tabelle 3-11), jedoch von geringer Qualität (unique peptides 1–9, Übereinstimmung 16–50 %). Ein erneuter Ansatz mit reduzierter Inkubationstemperatur von 21 °C bei gleicher Inkubationsdauer konnte die Nachweisqualität für diese Untereinheiten erhöhen (unique peptides 3–17, Übereinstimmung 40–82 %). Die Untereinheit der Monooxygenase IbeF sowie die Epoxid-Hydrolase EPH konnten bei beiden Inkubationstemperaturen nicht detektiert werden.

3.9.3 Ruhezellen-Ansatz des Expressionssystems

Mittels PMF konnte die Expression der Oxygenase IbeABE, des Ferredoxins IbeC und des Kopplungsproteins IbeD gezeigt werden. Trotz nicht detektierbarer Reduktase-Untereinheit IbeF sowie Epoxid-Hydrolase EPH wurde im Ruhezellen-Ansatz die Transformation von MP zu 1,2-Epoxy-2-methylpropan (IBO) getestet (Abbildung 3-31). Den Aliquots einer Ruhezellensuspension wurden definierte Konzentrationen an MP zugegeben und die Zellen über unterschiedlich lange Zeitdauern hinweg inkubiert. Die Konzentration des Produktes in einem Aliquot wurde am Ende eines Intervalles mittels NBP-Assay bestimmt. Aliquots mit gleichen initialen Substratkonzentrationen bilden somit eine Zeitreihe. Zur Kontrolle diente der Wildtyp von Stamm BUT6, bei dem keine Produktbildung messbar war (Ergebnisse nicht dargestellt).

Ergebnisse

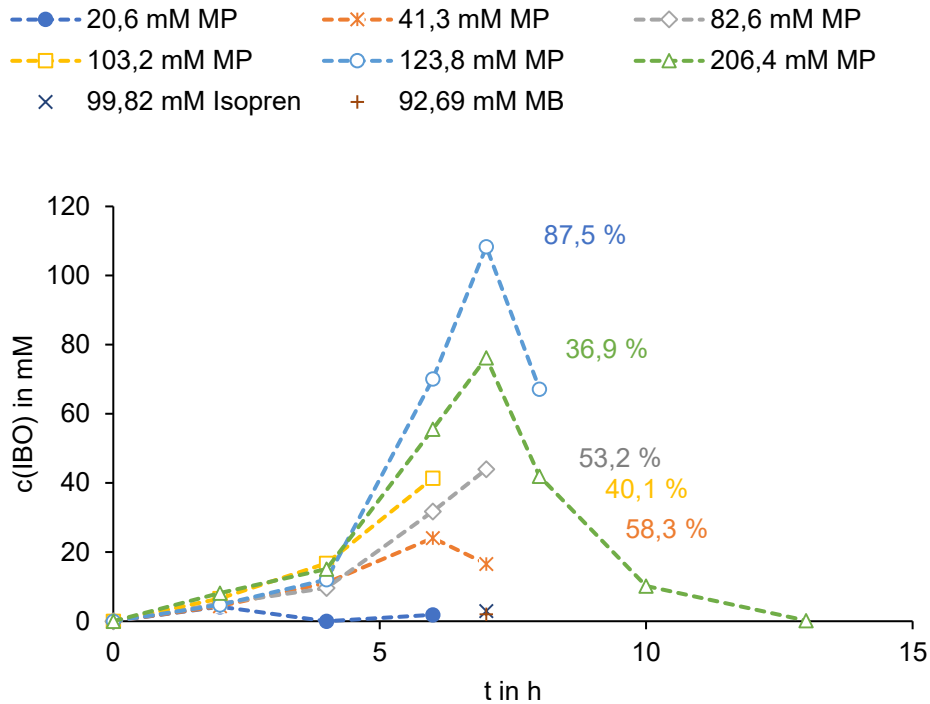


Abbildung 3-31 Zunahme von 1,2-Epoxy-2-methylpropan im Ruhezellen-Ansatz

Eine Zeitreihe besteht aus Aliquots einer Ruhezellensuspension mit gleicher initialer Substratkonzentration. Jeder Punkt repräsentiert ein Aliquot, welches für eine bestimmte Dauer inkubiert und an deren Ende die Produktkonzentration gemessen wurde. Die maximale Konversion ist als Verhältnis von maximaler Produktkonzentration zu initialer Substratkonzentration angegeben.

Nach zwei Stunden Inkubation konnte 1,2-Epoxy-2-methylpropan in den Ansätzen nachgewiesen werden. Das Epoxid akkumulierte bis zu einer Inkubationsdauer von sechs bis sieben Stunden; seine Konzentration nahm danach wieder ab. Bezogen auf die initiale Substratkonzentration konnten maximale Umsätze von 40,1 % bei 103,2 mM MP bis 58,3 % bei 41,3 mM MP beobachtet werden.

Bei einer initialen Substratkonzentration von 123,8 mM MP wurden die höchste absolute 1,2-Epoxy-2-methylpropan-Konzentration und der höchste prozentuale Umsatz gemessen.

Für den Zeitraum zwischen vier und sechs Stunden wurde die Epoxidierungsgeschwindigkeit bezogen auf die initiale Substratkonzentration berechnet (Abbildung 3-33). Es konnten die Michaelis-Menten-Konstante $K_M = 270,664 \text{ mM}$ und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max} = 46,411 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$ berechnet werden.

Zur weiteren Aufklärung der Substrataffinität der Monooxygenase wurden Ruhezellenansätze mit den Substraten 2-Methylbut-1-en und Isopren durchgeführt. In beiden Fällen konnten nach sechs Stunden Inkubationsdauer Epoxidkonzentrationen von ca. 2 bzw. 3 mM gemessen werden (Abbildung 3-31).

Ergebnisse

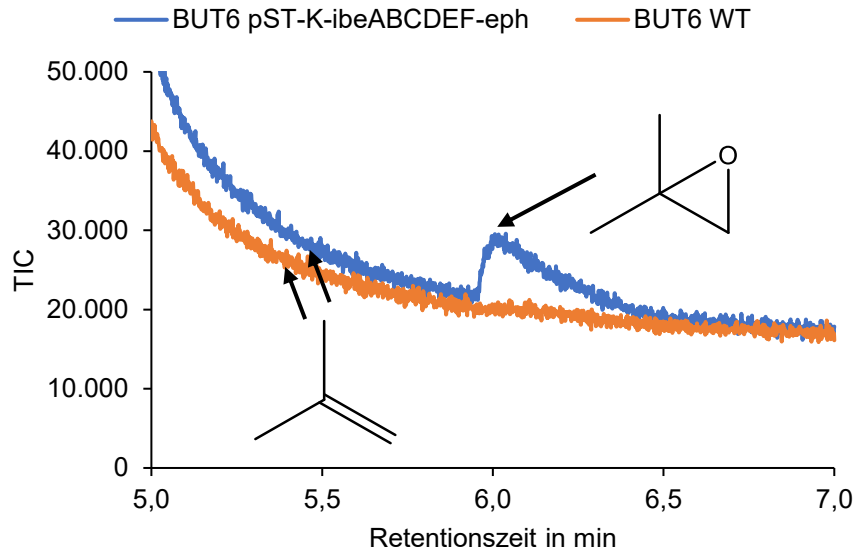


Abbildung 3-32 Nachweis von 1,2-Epoxy-2-methylpropan im Gasraum

Nachweis von 1,2-Epoxy-2-methylpropan im Gasraum des Ruhezellenansatzes des Expressionssystems und des Wildtyps mittels GC-MS.

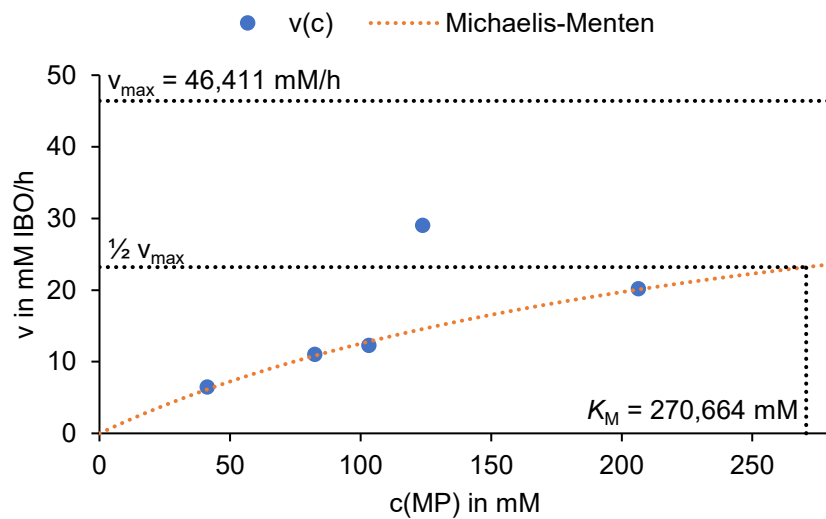


Abbildung 3-33 Epoxidierungsgeschwindigkeit von IbeABCDE im Ruhezellenansatz

Epoxidierungsgeschwindigkeit im Zeitraum von vier bis sechs Stunden bezogen auf die initiale Substratkonzentration. Es konnte die Michaelis-Menten-Konstante $K_M = 270,664 \text{ mM}$ und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max} = 46,411 \text{ mM} \cdot \text{h}^{-1}$ berechnet werden.

Zum stofflichen Nachweis wurde der Gasraum von Ruhezellenansätzen des Expressionssystems und des Wildtyps beprobt. Nach gaschromatographischer Auftrennung der Probe wurde 1,2-Epoxy-2-methylpropan per Retentionszeit-Vergleich mit einem Standard (Abbildung 3-32) und per Massenspektrum verifiziert. Die für die Trennung von Substrat und Produkt sowie Substrat und Luft-Peak notwendige Heizkurve des Gaschromatographen bei der verfügbaren Säule erzeugt bei beiden Stoffen ein starkes Tailing und machte eine Quantifizierung über diese Methode unmöglich.

Ergebnisse

Gemäß dem Peptidmassen Fingerprint wurde die Epoxid-Hydrolase EPH nicht exprimiert. Nach sieben Stunden Inkubationszeit erfolgte in den Ansätzen eine Abnahme der 1,2-Epoxy-2-methylpropan-Konzentration, was entweder auf eine chemische Zerfallsreaktion oder eine native Fähigkeit des Wildtyps zur Epoxid-Elimination hindeutet. Hierzu wurde die Konzentrationsabnahme an 1,2-Epoxy-2-methylpropan im Ruhezellenansatz über die Zeit im zellfreien Reaktionsansatz, im Ansatz mit dem Wildtyp sowie dem Expressionssystem, durchgeführt (Abbildung 3-34). Während das Epoxid im zellfreien System stabil war, wurden in den Ansätzen mit Zellen 100 mM 1,2-Epoxy-2-methylpropan innerhalb von zwei Stunden gleichermaßen eliminiert.

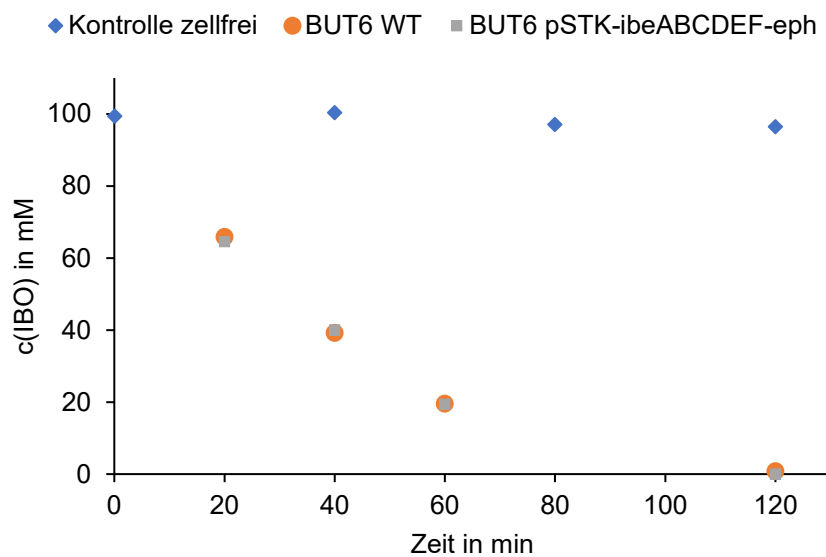


Abbildung 3-34 1,2-Epoxy-2-methylpropan-Abnahme im Ruhezellenansatz

Vergleich der Konzentrationsabnahme an 1,2-Epoxy-2-methylpropan über die Zeit im zellfreien Reaktionsansatz, im Ansatz mit dem Wildtyp sowie dem Expressionssystem.

4 Diskussion

4.1 Methylpropen-abbauende Mycobacterien und metabolische Vielfalt in der Familie

Es konnten zwei Reinstämme aus Belebtschlamm aus einer Kläranlage in Basel isoliert werden, die Methylpropen (MP) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können. Diese Isolate, *Mycolicibacterium gadium* IBE100 und *Mycobacterium paragordoniae* IBE200, wie auch der einzige bisher bekannte MP-Abbauer *Mycobacterium* sp. ELW1 (Kottegoda et al. 2015), gehören der Familie der *Mycobacteriaceae* an. Mycobacterien sind aerob und nicht motil sowie säurefest, hydrophob, resistent gegen viele Antibiotika, Austrocknung sowie – dank ihrer Lipid- und Mycolsäure-haltigen Zellwand – das Immunsystem von Wirtsorganismen (Batt et al. 2020). Durch diese Eigenschaften können sie eine Vielzahl an Umweltkompartimenten und Wirtsorganismen besiedeln. Sie erlangten ihre Bekanntheit durch die in der Risikogruppe 3 angesiedelten, daher latent gesundheitsgefährdenden Vertreter des *M. tuberculosis* Komplexes, wie z. B. *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. bovis* und *M. africanum*. In den letzten 20 Jahren starben beispielsweise durchschnittlich ca. 1,92 Millionen Menschen jährlich an den Folgen einer Tuberkulose. Diese Krankheit steht auf Platz 13 der häufigsten Todesursachen weltweit und war bis kurz vor Ende der COVID-19-Pandemie die häufigste Infektionskrankheit mit Todesfolge (World Health Organization 2022).

Neben diesen hoch-pathogenen Spezies gibt es eine Vielzahl nicht-pathogener Mycobacterien, zum Teil mit umwelttechnischer Relevanz. Sie sind in der Lage, aromatische, heterozyklische, aliphatische, nitrierte und halogenierte Verbindungen zu oxidieren oder als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen, so beispielsweise: *M. vanbaalenii* PYR-1^T: Biphenyl, Naphthalin, Fluoren, Acenaphthen, Acenaphthylen, Anthracen, 1-Nitropyren, Phenanthren, Pyren, Fluoranthen, Benzo[a]pyren, Benzo[a]anthracen, 7,12-Dimethylbenzo[a]anthracen, Dibenzothiophen, Dodecan, Hexadecan (Heitkamp und Cerniglia 1988; Kim et al. 2005b); *M. vaccae* JOB5: Trichlorethylen, C₂-C₄₀ Aliphaten, monoaromatische Kohlenwasserstoffe, Methylbutan, MTBE, *tert*-Butanol (Ooyama und Foster 1965; Wackett et al. 1989; Vanderberg et al. 1995; Johnson et al. 2004); *M. chlorophenicum* PCP-1^T: Pentachlorphenol und andere polychlorierte Phenole (Coschigano et al. 1994); *Mycobacterium* sp. HL 4-NT-1: Nitrotoluol, 6-Amino-*m*-Cresol, Nitrobenzol, Nitrophenol (Spiess et al. 1998); *M. austroafricanum* IFP2173: Toluol, *m*-Xylol, *p*-Xylol, *n*-Alkane, methyl-substituierte Isoalkane (Solano-Serena et al. 2000); *M. fortuitum* NF4 / *M. ratisbonense* SD4: Squalan, cis-1,4-Polyisopren (Berekaa und Steinbüchel 2000; Linos et al. 2000); *Mycobacterium* sp. ESD: Endosulfan (Sutherland et al. 2002); *Mycobacterium* sp. JS14/JS19b1: Phenanthren, Fluoranthen, Temephos, Diazinon (Seo et al. 2007); *M. austroafricanum* IFP 2012: MTBE (Ferreira et al. 2006); *M. chubuense* NBB4: *n*- und cyclo-Alkene, Styrol, Dihydropyran,

Allylalkohol, Inden (Cheung et al. 2013); *Mycobacterium* sp. AT1: Isopren (Johnston et al. 2017).

In dieses Portfolio metabolischer Vielfalt reihen sich nun zwei weitere Stämme der Familie, *M. gadium* IBE100 und *M. paragordoniae* IBE200, ein. Auffällig ist, dass bisher nur Vertreter dieses Genus mit der Fähigkeit der Mineralisierung von MP isoliert wurden. Obwohl solide Hinweise zum Abbauweg basierend auf Metabolitenuntersuchungen und davon abgeleiteten enzymatischen Reaktionen bestanden (Kottegoda et al. 2015), waren genetische Grundlagen bisher gänzlich unbekannt.

4.2 Wachstum auf Methylpropen

Mycobakterien sind bekannt für ihre Neigung zur Zellklumpenbildung. Diese Eigenschaft ist auf die Beschaffenheit ihrer Zellwand zurückzuführen. Auf der Peptidoglycanschicht von Mycobakterien und anderen Vertretern aus der Ordnung der Actinomycetales (Rhodococcen, Nocardien, Corynebakterien) ist eine Arabinogalactan-Schicht verankert, auf der wiederum Mykolsäuren anheften. Diese namensgebenden Fettsäuren bestehen aus zwei unterschiedlich langen Seitenketten von 60–90 Kohlenstoffatomen mit Keto-, Methoxy- und Cyclopropan-Gruppen, die den Zellen eine besonders wachsartige Eigenschaft verleihen (Batt et al. 2020). Die Klumpung bietet den Zellen Schutz; so können sie beispielsweise nach Phagozytose in Makrophagen überleben, wachsen und sie gar schädigen (Brambilla et al. 2016). Sie reduziert zudem die Effektivität einer Hitzeinaktivierung (Klijn et al. 2001) und einer Inaktivierung durch UV-Strahlen (Song et al. 2023), oder erschwert grundlegende Charakterisierungen wie die Aufnahme von Wachstumsparametern. Falsch-negative Ergebnisse bei der Auszählung der Zellzahl sowie der Aufnahme der optischen Dichte, oder schlicht Fehler bei der Probenahme durch Adhäsion der Zellen an Gefäßwand und Pipettenspitzen sind die Folge. Alternativen – wie z. B. die Erfassung der Trockensubstanz – leiden unter der gleichen Problematik, da hier viel Zellmasse an der Glaswand des Inkubationsgefäßes verbleibt, bzw. nur mit großen, nachfolgend schwer einzudampfenden Volumina an Wasser ausgespült werden können. Zur Minderung der Klumpenbildung werden für gewöhnlich den Flüssigkulturen Detergenzien zugegeben, wie z. B. Tween 80. Manche Mycobakterien (z. B. *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. gastri*) sind in der Lage, dieses mittels einer Lipase zu *cis*-9-Octadecensäure sowie polyoxyethyliertem Sorbitol zu hydrolysieren (Cox et al. 1978; Bhalla et al. 2018). Hier kann alternativ Triton X-100 als Detergenz verwendet werden, wie auch in dieser Arbeit geschehen. Weiter wurde mit gerührten anstatt geschüttelten Kulturen gearbeitet, um zusätzlich die Scherkräfte der Rührfische zur Zerreibung auftretender Zellklumpen zu nutzen. Trotz dieser Maßnahmen gelang die homogene Dispergierung von Zellen des Stammes

IBE100 nur mäßig, wohingegen Zellen des Stammes IBE200 in der Regel gut in Flüssigkultur dispergierten.

Wachstumskurven bei 30 °C Inkubationstemperatur konnten für die Stämme aufgezeichnet werden und ließen einen Vergleich mit dem Stamm ELW1 zu. Stamm IBE100 erreichte nach 72 h eine $OD_{600} = 0,484$ mit einer maximalen Wachstumskonstante μ_{max} von $0,018 \text{ h}^{-1}$ ($t_d = 38,5 \text{ h}$), Stamm IBE200 im gleichen Zeitraum eine $OD_{600} = 0,596$ mit $\mu_{max} = 0,025 \text{ h}^{-1}$ ($t_d = 27,7 \text{ h}$), beide bei 8,4 mM MP als Substrat. Stamm ELW1 wächst schneller und erreichte ausgehend von einer Start- $OD_{600} = 0,02$ (vgl. IBE-Isolate $\sim 0,2$) nach einer lag-Phase von 3 Tagen bei 8,3 mM Substrat nach 144 h eine $OD_{600} = 0,6$ mit einer maximalen Wachstumskonstante μ_{max} von $0,050 \text{ h}^{-1}$ ($t_d = 13,9 \text{ h}$). Von einer Klumpenbildung bei diesem Stamm wurde nicht berichtet (Kottegoda et al. 2015).

Damit gehören die Isolate zu den schnell wachsenden Mycobacterien (RGM). Interessanterweise wurde *M. paragordoniae* 49061^T rein aufgrund der phylogenetischen Einordnung zu den langsam wachsenden Mycobacterien gruppiert (Kim et al. 2014). Dies konnte *in vivo* mit Stamm IBE200 widerlegt werden.

4.3 Keine Hinweise auf den Abbauweg mangels Metabolitenausscheidung

In *Mycobacterium* sp. ELW1 konnten in Flüssigkultur mit MP als Kohlenstoffquelle gaschromatographisch keine Metabolite detektiert werden. Hingegen war es in Hoch-OD Ruhezellen-Ansätzen möglich, Metabolitenausscheidung zu erzwingen und in der Flüssigphase nachzuweisen (Kottegoda et al. 2015). Hierbei konnten die Produktion und der Verbrauch von je 2-Methylpropan-1,2-diol und 2-Hydroxyisobuttersäure sowie der Verbrauch von Epoxymethylpropan über die Zeit verfolgt werden, nicht aber von 2-Hydroxyisobutyraldehyd.

Auch bei den Stämmen IBE100 und IBE200 waren in Flüssigkultur von auf MP gewachsenen Zellen weder im Gasraum noch in der Flüssigphase potenzielle Metabolite mittels nasschemischen oder gaschromatographischen Analysemethoden detektierbar. Gleiches galt für entsprechende Ruhezellen-Ansätze. Dies könnte mit den Unterschieden in den Generationszeiten der Stämme begründet sein. Wie in Abschnitt 4.2 dargelegt, hat Stamm ELW1 eine 64 bzw. 50 %ig schnellere Generationszeit als die Stämme IBE100 bzw. IBE200. Eine langsamere Metabolisierungsrate verhindert womöglich die Sättigung einzelner Enzyme der Abbaukette und somit die Akkumulation von Metaboliten. Was aus Sicht der Aufklärung des Abbauweges nachteilig ist, stellt für die Bakterien einen verlustfreien und effizienten Metabolismus dar.

4.4 Vollständige und partielle Substratverwertung

Den Stämmen wurden gesättigte und ungesättigte, verzweigte und lineare Aliphaten, Alkohole, Diole, Carbonsäuren, Aromaten und Zucker jeweils als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle oder im Comemetabolismus sowie Vollmedien angeboten. Die Verwertung bestimmter Substrate konnte erste Hinweise über den Abbauweg, oder deren Oxidation den Hinweis auf die Anwesenheit bestimmter Enzyme liefern.

Stamm ELW1 kann auf dem terminalen Hydroxylierungsprodukt von MP, 2-Methylprop-2-en-1-ol wachsen (Kottegoda et al. 2015). Die weitere terminale Oxidation würde das korrespondierende Aldehyd und schließlich Methacrylsäure liefern. Die Säure ist ein Zwischenprodukt des *L*-Valin-Abbaus (Abschnitt 2.4.5.2), die terminale Oxidation von MP könnte somit darüber in den zentralen Metabolismus münden. Diese Hypothese wurde für die Stämme IBE100 und IBE200 untersucht. Obwohl Stamm IBE100 auf *L*-Valin wachsen kann, können weder Stamm IBE100 noch IBE200 auf dem Allylalkohol oder Methacrylsäure wachsen. Ein derartiger Abbauweg erscheint damit für die Isolate unwahrscheinlich.

Analog zum postulierten Abbauweg für MP in Stamm ELW1 wurden die Substrate 1,2-Epoxy-2-methylpropan, 2-Methylpropan-1,2-diol, 2-Hydroxyisobuttersäure und 3-Hydroxybuttersäure getestet. Nur Stamm IBE100 war in der Lage, auf diesen Substraten zu wachsen. Überraschenderweise waren jedoch bei auf MP gewachsenen Zellen des Stammes IBE200 nach Zugabe dieser Substrate Sauerstoffzehrungsraten deutlich über der Ruheatmung zu verzeichnen. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gefunden werden. Umgekehrt war die Zellatmung nach Zugabe von *n*-Hexan nicht von der Ruheatmung unterscheidbar, obwohl dieses Substrat nachweislich eine Kohlenstoffquelle für den Stamm darstellt. Die dafür verantwortliche Monooxygenase scheint nicht konstitutiv exprimiert zu sein. Zudem war im Zellextrakt von durch 1-Hexanol induzierten Zellen von Stamm IBE200 nach der Zugabe von je 1-Propanol und 1-Butanol keine Regeneration von NAD messbar, obwohl er auf diesen Substraten wachsen konnte. Hochspezifische Alkoholdehydrogenasen für diese Alkohole, die nicht durch 1-Hexanol induziert werden, scheinen unwahrscheinlich. Eine Nichtverwertung potenzieller Metabolite geht demnach nicht mit der Falsifizierung der Abbauweg-Hypothese einher. Folglich resultierte diese Erkenntnis in einer Reevaluation der *L*-Valin-Hypothese (Abschnitt 4.5.1).

Eine weitere Besonderheit stellt das ausbleibende Wachstum von Stamm IBE200 auf den getesteten Vollmedien LB, NB und TB, sowie auf den Kohlenstoffquellen Citrat und Glycerol der klassischen Mycobacteria-Medien Middlebrook 7H9 bzw. 7H10 sowie Löwenstein-Jensen dar. *M. paragordoniae* 49061^T hingegen wächst auf Middlebrook 7H10-Agar (Kim et al. 2014), ein weiteres Beispiel für die metabolische Vielfalt von Prokaryoten innerhalb der gleichen Spezies. Glucose und Fructose waren ebenfalls keine verwertbaren Kohlenstoffquellen für das Isolat.

Der Indol-Test wird zum kolorimetrischen Nachweis von Monooxygenasen verwendet. Dabei wird das farblose Indol je nach Enzym entweder in 3-Position zu Indoxyl, in 2,3-Position zu Isatin, oder in 6- bzw. 7-Position zum entsprechenden Hydroxyindol hydroxyliert. Die unterschiedlichen Reaktionen können von Toluol- und Naphthalin-Dioxygenasen, Phenol-, Toluol-2-, Toluol-4- und P450-Monooxygenasen katalysiert werden. Indoxyl steht im tautomeren Verhältnis zu 3-Oxindol. In Anwesenheit von Sauerstoff dimerisieren diese Stoffe abiotisch zu Indigo (Abbildung 3-9). Indoxyl und Isatin dimerisieren zu Indirubin (purpur). Die Oxidationsprodukte in 6- und 7-Stellung weisen jeweils eine rot-braune Färbung auf (McClay et al. 2005). Auf MP gewachsene und mit Indol inkubierte Zellen der Stämme IBE100 und IBE200 wiesen einen grünen Farbton auf, was auf eine Indigo-Bildung und die damit einhergehende subtraktive Farbmischung mit den gelb-pigmentierten Zellen rückschließen lässt. Somit wird Indol durch Monooxygenasen aus den Stämmen IBE100 und IBE200 in 3-Position zu Indoxyl hydroxyliert. Auf 1-Hexanol gewachsene Zellen der Stämme zeigten nach gleicher Behandlung mit Indol keinen Farbumschlag. Dies lässt die Schlüsse zu, dass (a) die Monooxygenasen, die Indol oxidieren auch MP oxidieren und (b) diese nicht konstitutiv exprimiert, sondern durch die Anwesenheit von MP induziert werden.

In einem Co-Oxidationsversuch mit MP als Kohlenstoff- und Energiequelle konnte die subterminale Oxidation von *n*-Butan zu 2-Butanol in den Stämmen IBE100 und IBE200 nachgewiesen werden. Wurde MP durch 1-Hexanol ersetzt, konnte keine Entstehung von 2-Butanol gezeigt werden. Somit ist die für die Oxidation von MP zuständige Monooxygenase ebenfalls für die subterminale Oxidation von *n*-Butan verantwortlich.

2-Butanol und sein Oxidationsprodukt Butanon können von den Isolaten nicht als Kohlenstoffquelle genutzt werden. Für die Oxidation von Butanon ist eine Baeyer-Villiger Monooxygenase erforderlich, wie z. B. MekA (ABI15711.1) aus *Ps. veronii* MEK700 (Onaca et al. 2007; Völker et al. 2008). Homologe zu diesem Enzym sind in den Stämmen IBE100 und IBE200 nicht vorhanden.

4.5 Genom, Transkriptom und Proteom offenbaren den Abbauweg von Methylpropen

Der kombinierte Ansatz aus einer Genomanalyse in beiden Stämmen, der Proteomanalyse in Stamm IBE100 und der Transkriptomanalyse in Stamm IBE200 ermöglichte die Identifizierung ähnlicher Cluster und verifizierte die Beteiligung der Gene bzw. der codierten Proteine am Abbau von MP. Im Folgenden werden die einzelnen Reaktionsschritte diskutiert. Der Grad der Konservierung der Clusterung der Gene sowie der Aminosäuresequenzen der codierten Proteine inspirierte zu einer *in silico* Datenbank-Analyse mit dem Ziel der Identifikation von Bakterien mit potenzieller Fähigkeit zum Abbau verzweigter, kurzkettiger Aliphaten.

4.5.1 Initiale Oxidation von MP

Die Stämme IBE100 und IBE200 codieren jeweils zwei lösliche di-Eisen-Monooxygenasen (SDMs) mit den Bezeichnungen MmoXYBR und IbeABCDEF. Die phylogenetische Analyse der α -Untereinheiten gruppierte MmoXYBR zu den Propan-Monooxygenasen (Abbildung 3-13). Ursprünglich wurde angenommen, dass MmoXYBR MP zu 2-Methylprop-2-en-1-ol hydroxyliert, eine Reaktion, die mit der heterolog exprimierten Cumen-Dioxygenase gezeigt wurde (Takami et al. 1999). Der Allylalkohol könnte dann weiter zu Methacrylsäure (Abbildung 2-1 linke Seite) oxidiert und nach CoA-Aktivierung über den unteren *L*-Valin-Abbauweg in den zentralen Stoffwechsel geschleust werden (Massey et al. 1976). Kottegoda und Kollegen nahmen an, dass dieser erste Schritt eine untergeordnete Nebenreaktion parallel zur Epoxidierung darstellt, da Stamm ELW1 langsam auf dem Allylalkohol wachsen kann (Kottegoda et al. 2015). Obwohl Stamm IBE100 auf *L*-Valin wachsen kann, können aber weder der Stamm IBE100 noch IBE200 auf 2-Methylprop-2-en-1-ol oder Methacrylat (Metabolit beim Valinabbau, Abbildung 2-15) wachsen. Transkriptom- und Proteomanalysen zeigten, dass MmoXYBR nach dem Wachstum auf MP nicht hochreguliert oder auf einem messbaren Niveau exprimiert wurde, was die Hypothese widerlegt. Die ursprüngliche Funktion dieser mutmaßlichen Propan-Monooxygenase gilt es noch zu ermitteln.

Zahlreiche lösliche di-Eisen-Monooxygenasen weisen eine Epoxidase-Aktivität gegenüber Alkenen auf. Dies konnte mit Zellen, die auf den entsprechenden Substraten gewachsen sind (Furuhashi et al. 1981; Kottegoda et al. 2015; Johnston et al. 2017), Ruhezellen (Ono und Okura 1990; van Hylckama Vlieg et al. 1998; McClay et al. 2000; Coleman und Spain 2003a, 2003b; Owens et al. 2009; Cheung et al. 2013) und Zellextrakten (Patel et al. 1982; Hou et al. 1983) gezeigt werden. Die Epoxidierung von MP wurde jedoch nur in Ruhezellen von *X. autotrophicus* Py2 (Ensign 1996) und *Nocardioides* sp. JS614 (Owens et al. 2009), mit der heterolog exprimierten Dimethylsulfid-Monooxygenase (Takami et al. 1999) sowie in Zellextrakten von *Methylobacterium* sp. CRL-26 (Patel et al. 1982) und *Brevibacterium* sp. CRL56 (Hou et al. 1983) nachgewiesen. Obwohl 1,2-Epoxy-2-methylpropan in wachsenden und Ruhezellen des Stammes ELW1 nicht detektiert wurde (Kottegoda et al. 2015), deuten die vorgelegten Daten stark auf eine Epoxidierung von MP in diesem Stamm hin.

IbeABCDEF ist eine SDM des Aromaten-/Alken-/Isopren-Typs (Abbildung 3-13), die MP zu 1,2-Epoxy-2-methylpropan oxidiert. Ihre Induzierbarkeit durch MP konnte über Indigobildung, transkriptomische und proteomische Analysen nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Gruppe von SDMs wurden die Untereinheiten IbeA der Stämme IBE100, IBE200 und ELW1 neben den Isopren-Monooxygenasen, aber auf einem separaten Unterzweig, angeordnet. Die Stämme IBE100 und IBE200 sind in der Lage, auf MP zu wachsen, aber nicht auf den Strukturhomologen Isopren, 2-Methyl-1-buten oder 2-Methyl-2-buten. Dies konnte gleichermaßen im Stamm ELW1 beobachtet werden. Entgegengesetzt dazu gibt es bisher

keine Berichte über Isopren-epoxidierende SDMs oder Isopren-mineralisierende Stämme, die MP oxidieren können². Eine evolutionäre Anpassung dieser nah verwandten Monooxygenasen muss hier erfolgt sein.

4.5.2 Öffnung des Epoxids

Epoxide sind häufig Metabolite des bakteriellen Alkenabbaus und müssen aufgrund ihrer reaktiven Natur schnell metabolisiert werden. Hierfür sind drei Mechanismen beschrieben, die Coenzym-M-Konjugation beim Abbau von kurzkettigen Alkenen (Allen und Ensign 1998; Allen et al. 1999; Mattes et al. 2005; Krishnakumar et al. 2008), die Glutathion-Konjugation beim Abbau von Isopren und Styrol (van Hylckama Vlieg et al. 1998; Johnston et al. 2017; Heine et al. 2018; Larke-Mejía et al. 2019) sowie die Hydrolyse beim Abbau von Epoxyalkanen, Alkenen und Terpenen (de Bont et al. 1982; van den Wijngaard et al. 1989; Nakamura et al. 1992; van der Werf et al. 1998; Kottegoda et al. 2015).

Supplementierungen mit dem für die Epoxyalkan-CoM-Transferase EaCoMT essenziellen Cofaktor Zink, mit Coenzym M oder mit Glutathion für die GSH-Transferase führten in Wachstumsversuchen auf MP nicht zu Veränderungen gegenüber der Kontrolle ohne Supplemente. Zudem sind Homologe zu den Enzymen EaCoMT und GSH-Transferase in den Stämmen IBE100 und IBE200 nicht vorhanden. Jedoch konnte von den drei vorgestellten Mechanismen der Cofaktor-unabhängige in den Stämmen IBE100 und IBE200 genetisch nachgewiesen werden: Gene, die für Epoxid-Hydrolasen codieren, befinden sich im postulierten Cluster, und ihre Beteiligung wurde durch Transkriptomanalyse und Peptidmassen Fingerprint bestätigt. Die Verwendung einer Epoxid-Hydrolase beim MP-Abbau stellt einen wesentlichen Unterschied zu den Abbauwegen von Isopren (Abbildung 2-19) und von kurzkettigen Alkenen (Abbildung 2-17) dar. Das Enzym katalysiert die Ringöffnung von 1,2-Epoxy-2-methylpropan zu 2-Methylpropan-1,2-diol. Bei der phylogenetischen Analyse wurden beide Enzyme mit der alpha/beta-Hydrolase des MP-Abbauers *Mycobacterium* sp. ELW1 (100 % und 88,4 % Identität) sowie mutmaßlichen alpha/beta-Hydrolasen mit unbekannter Funktion aus anderen *Mycobacteriaceae* (70 bis 77 % Identität) geclustert (Abbildung 3-14).

4.5.3 Oxidation des Alkohols

2-Methylpropan-1,2-diol, das durch die Epoxidhydrolyse entsteht, wird weiter zu 2-Hydroxyisobutyraldehyd und 2-Hydroxyisobuttersäure oxidiert, gefolgt von einer für Fettsäuren typischen CoA-Aktivierung zu 2-Hydroxyisobutyryl-CoA. Es handelt sich bei den Enzymen, die diese Reaktionen in den Stämmen IBE100 und IBE200 katalysieren, um die

² Persönliche Mitteilung aus dem Schriftverkehr mit Andrew T. Crombie und Colin J. Murrell, School of Environmental Sciences, University of East Anglia, UK (Email vom 31.05.2023).

Diskussion

Oxidoreduktase MdpB aus der Familie der GMC-Oxidoreduktasen, die Aldehyd-Dehydrogenase MdpC und die 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Ligase HCL, wie durch Transkriptomanalyse und Peptidmassen Fingerprint bestätigt wurde.

Die Gene, die für MdpB und MdpC codieren, wurden in auf 1-Hexanol gewachsenen Zellen nicht hochreguliert, was darauf hindeutet, dass sie die Oxidation von 1-Hexanol nicht katalysieren. Im Zellextrakt konnte bestätigt werden, dass es sich um unterschiedliche Enzyme handelt, da Extrakt aus auf 1-Hexanol-gewachsenen Zellen keine Diol-induzierte Aktivität zeigte.

Wie auch bei den vorangegangenen Enzymen des Abbauwegs ist der engste Verwandte von MdpB eine Dehydrogenase aus der Familie der GMC-Oxidoreduktasen aus *Mycobacterium* sp. ELW1, die wahrscheinlich die gleiche Funktion übernimmt (Abbildung 3-15). Mehrere Isopren-abbauende Rhodococci besitzen ähnliche Enzyme (83,5 % bis 86,0 % Identität); bei ihnen wurde jedoch keine Verbindung zu einer Stoffwechselfunktion nachgewiesen. Im Gegensatz dazu sind funktionelle Homologe des 2-Methylpropan-1,2-diol-abbauenden *A. chiangmaiensis* DSM 45062 und des *tert*-Butanol-abbauenden *M. austroafricanum* IFP 2012, bei denen die Dehydrierung des Diols nachgewiesen wurde, nur entfernt verwandt (40,2 % und 41,5 % Identität). Darüber hinaus gehört die designierte MdpB (ABM97329.1) aus dem MTBE-abbauenden *Methylibium petroleiphilum* PM1 zu einer anderen Enzymklasse und ist nicht verwandt.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Beziehungen der Aldehyd-Dehydrogenasen MdpC (Abbildung 3-16) und 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Ligasen HCL (Abbildung 3-17): Mehrere eng verwandte Enzyme ohne zugewiesene Funktion und offensichtlich ohne Beteiligung am MP-Abbau wurden in anderen Stämmen gefunden, während Enzyme mit bestätigter identischer katalytischer Funktion aus 2-Methylpropan-1,2-diol- und *tert*-Butanol-abbauenden Stämmen nicht als Homologe gelten (MdpC: *A. chiangmaiensis* DSM 45062 (66,2 %, WP_018331915.1), *M. austroafricanum* IFP 2012 (70,6 %, WP_011827962.1), *Methylibium petroleiphilum* PM1 (36 %, WP_011827962.1), HCL: *A. tertiaricarbonis* L108 (55,9 %, AFK77666.1), *Methylibium petroleiphilum* PM1 (55,5 %, WP_011831862.1), *A. chiangmaiensis* DSM 45062 (53,2 %, WP_018331914.1)).

MdpB wurde bisher als Alkohol-Dehydrogenase mit NAD-Abhängigkeit beschrieben, ohne allerdings einen Beweis dafür zu liefern (Ferreira et al. 2006; Rohwerder et al. 2006; Hristova et al. 2007; Rohwerder et al. 2020). Die Sequenzanalyse zeigt, dass im Enzym sowohl eine N-terminale Flavin-Bindedomäne (GXGX₂G) für kovalent gebundenes FAD, eine [Fe₃S₄]-Bindedomäne (CX₅CX₃C) als auch eine C-terminale NAD(P)-Bindedomäne (TGX₅G) vorhanden sind (Hua et al. 2014; Yoshida et al. 2019). Umsatzversuche mit dem Rohextrakt von auf MP gewachsenen Zellen des Stammes IBE200 zeigten eine um 66 % schnellere

Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms mit NADP gegenüber NAD auf 2-Methylpropan-1,2-diol. Zudem wurden strukturanaloge Diole mit NADP umgesetzt, die im Ansatz mit NAD keine Regeneration des Reduktionsäquivalents hervorriefen. Hiernach wird dieses Enzym als NADP-abhängig postuliert.

Direkt downstream von *mdpB* befindet sich in den Genomen der Stämme IBE100 (MNO81_04040), IBE200 (GKP29_RS08425) und ELW1 (QEN17569.1) ein orf, annotiert als hypothetical protein/Gluconat 2-Dehydrogenase Untereinheit 3, welches für ein Peptid von etwa 16 kDa Masse codiert. Peptide an gleicher relativer Position, jedoch von geringer Ähnlichkeit und mit berechneten Massen von ca. 24 kDa, konnten jeweils in *tert*-Butanol-Abbauer *M. austroafricanum* IFP 2012 (AAZ78236.1), 2-Methylpropan-1,2-diol-Abbauer *A. chiangmaiensis* DSM 45062 (WP_018331916.1) und den in Abschnitt 4.5.7 diskutierten Stämmen *Mycobacterium* sp. NAZ190054 (WP_067953591.1), *Mycolicibacterium alkanivorans* ANDR5 (WP_243072111.1) und *Mycobacterium* sp. SM1 (WP_213445455.1) (Abbildung 4-1) sowie in den Isopren-Abbauern *Rhodococcus* sp. AD45 (WP_045063255.1), WS3 (WP_141486982.1), ACP4 (WP_095888854.1), ACS1 (WP_095860314.1) und weiteren Stämmen unbekanntes Abbaupotenzial identifiziert werden. In Stamm IFP 2012 konnte das Peptid im Zellextrakt von auf MTBE gewachsenen, nicht aber von auf Glucose gewachsenen Zellen detektiert werden (Ferreira et al. 2006). In Stamm IBE200 war das dafür codierende Gen beim Wachstum auf MP gleichermaßen wie *mdpB* hochreguliert. Eine Beziehung mit MdpB scheint wahrscheinlich, eine Funktion konnte jedoch bisher nicht zugeordnet werden und bedarf weiterer Aufklärung.

4.5.4 Linearisierung der verzweigten Säure

2-Hydroxyisobutyryl-CoA kann entweder durch eine Thiaminpyrophosphat (TPP)-abhängige Lyase (Rohwerder et al. 2020) zu Aceton und Formyl-CoA gespalten werden oder einer Cobalamin-abhängigen Mutasereaktion unterliegen (Rohwerder et al. 2006; Hristova et al. 2007; Kottegoda et al. 2015). Alternativ dazu wurde für die Stämme *M. austroafricanum* IFP 2012 und *M. vaccae* JOB5 eine Decarboxylierungsreaktion von 2-HIBA-CoA zu 2-Propanol/Aceton vorgeschlagen (Ferreira et al. 2006; Steffan et al. 1997). Für diese Reaktionen sind jedoch weder die relevanten Metaboliten noch die Enzymaktivitäten eindeutig nachgewiesen worden.

Eine TPP-abhängige Spaltung, wie sie für *A. chiangmaiensis* DSM 45062 berichtet wurde, kann für die Stämme IBE100 und IBE200 ausgeschlossen werden, da weder die durch diese Reaktion produzierten Metabolite als Wachstumssubstrat dienen, noch Gene, welche die für diesen Weg notwendigen Enzyme (TPP-Lyase, Aceton-Monooxygenase und Formiat-Dehydrogenase) codieren, in den Genomen gefunden wurden.

Stattdessen wurde eine Konvergenz mit dem Abbauweg von *tert*-Butanol (Rohwerder et al. 2006; Hristova et al. 2007) nachgewiesen. Die für ihr Substrat hochspezifische 2-Hydroxyisobutyryl-CoA-Mutase HcmAB und ihr Chaperon MeaH lösen die Verzweigung des Substrats in einer radikalischen, Adenosylcobalamin-abhängigen Reaktion zu dem linearen Produkt 3-Hydroxybutyryl-CoA auf. Dies stellt gewissermaßen eine Verkürzung der β -Oxidation dar, da die Hydroxylgruppe durch die Mutasereaktion an das β -Kohlenstoffatom der Fettsäure positioniert wird. Eine Oxidation mit anschließender Hydratisierung wie bei gesättigten, unsubstituierten Aliphaten konnte somit eingespart werden.

In den funktional homologen Enzymen aus *Aquicola tertiarycarbonis* L108 und *Kyrpidia tusciae* DSM 2912 konnten die Aminosäurereste identifiziert werden, welche für die Stereoisomerie des Produkts verantwortlich sind (Yaneva et al. 2012; Weichler et al. 2015; Kurteva-Yaneva et al. 2015). Ein Sequenzvergleich mit den Peptiden aus den Stämmen IBE100 und IBE200 ergab, dass diese Enzyme demnach vorzugsweise das *S*-Enantiomer bilden. *In vitro*-Untersuchungen zu HcmAB aus Stamm L108 ergaben, dass ein Enantiomergemisch im Verhältnis 80 zu 20 produziert wird (Yaneva et al. 2012). In den Metabolitanalysen (Abschnitt 4.3) konnte keines der Enantiomere detektiert werden. Würde – wie im Fall von Stamm L108 – ebenfalls ein solches Gemisch produziert, so würde somit auch das *R*-Enantiomer metabolisiert, da ansonsten eine Akkumulation des Metaboliten im Medium erfolgen müsste. Dafür in Frage käme eine 3-Hydroxybutyryl-CoA-Epimerase, welche das *R*- in das *S*-Enantiomer umwandelt, oder eine Acetoacetyl-CoA-Reduktase, die das *R*-Enantiomer zu Acetoacetyl-CoA dehydrogeniert. Entsprechende Enzyme sind in den Stämmen IBE100 (MNO81_RS08985, GKP29_RS08780) und IBE200 (MNO81_RS18660, GKP29_RS04670) codiert; Transkriptomanalyse und Peptidmassen Fingerprint waren diesbezüglich jedoch nicht aussagekräftig.

Die Klonierung des Mutase-Operons (*hcmB*, *hcl*, *meaH*, *hcmA*) in verschiedene Expressionssysteme (KT2440 pCom10-hcm, MEK700 pCom10-hcm, BUT6 pST-K-hcm) erfolgte; ein Umsatz konnte jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Mutase wird vermutlich über einen Transkriptionsfaktor aus der GntR-Familie reguliert (MNO81_03950, GKP29_RS08575), der direkt upstream von *hcmA* codiert ist. Die Transkriptomanalyse von Stamm IBE200 zeigte eine deutliche Hochregulierung des Faktors. Die Paarung aus Transkriptionsfaktor und Mutase ist verbreitet und liegt ebenfalls in *Mycobacterium* sp. AT1, *Mycobacterium* sp. ELW1, *Nocardioides* sp. JS614, *Mycobacterium* sp. SM1, *Mycobacterium* sp. NAZ190054 und *Mycobacterium* sp. CCUG37676 (Abbildung 4-1) vor. Die Reihenfolge und der Abstand zum Operon scheinen aber variabel. In *X. autotrophicus* Py2 und *M. petroleiphilum* PM1 liegt der Transkriptionsfaktor

downstream *hcmB*, in *Mycolicibacterium alkanivorans* ANDR5 sind zwischen *hcmA* und *gntR* drei offene Leserahmen lokalisiert.

4.5.5 Substratspezifische, verkürzte β -Oxidation

Die Enzyme 3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase FadB sowie Acetyl-CoA C-Acetyltransferase PhaA katalysieren in den Stämmen IBE100 und IBE200 die Bildung von Acetyl-CoA aus 3-Hydroxybutyryl-CoA. Ähnliche Enzyme finden sich im Stamm ELW1 (Abbildung 4-1). Diese letzten beiden enzymatischen Schritte des Abbauweges wurden bisher für den *tert*-Butanol- sowie MP-Abbau in den Stämmen *A. tertiaricarbonis* L108 und *Mycobacterium* sp. ELW1 nur auf Basis der Transkriptomanalyse im *tert*-Butanol-Abbauer *Methylibium petroleiphilum* PM1 postuliert, ohne jedoch eigene Beweise zu erbringen. Die Transkriptomanalyse in Stamm IBE200 und der Peptidmassen Fingerprint in Stamm IBE100 zeigen die Involvierung der Enzyme im MP-Abbau und bestätigen die Ergebnisse aus *Methylibium petroleiphilum* PM1.

Gene, die für FadB und PhaA im Stamm IBE200 codieren, wurden in auf 1-Hexanol gewachsenen Zellen nicht hochreguliert. Dies weist auf ihre spezifische Rolle beim Abbau von MP hin. Die Erzeugung von Acetyl-CoA aus Alkansäuren katalysieren demnach andere Enzyme, die aus der Transkriptomanalyse nicht eindeutig hervorgingen.

4.5.6 *tert*-Butanol ist keine Kohlenstoffquelle

Trotz der weitreichenden Überschneidung in den unteren Abschnitten der Abbauwege von MP und *tert*-Butanol ab dem Metaboliten 2-Methylpropan-1,2-diol konnte *tert*-Butanol selbst von den Stämmen IBE100 und IBE200 nicht als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden. Gleiches gilt für Stamm ELW1 (Kottegoda et al. 2015). Die für die Umwandlung in 2-Methylpropan-1,2-diol erforderlichen Oxygenasen wurden als *tert*-Butanol-spezifisches Oxygenase-Reduktase-System vom MdpJK-Typ (Schäfer et al. 2007; Hristova et al. 2007; Schuster et al. 2012) oder als Oxygenase vom AlkB-Typ (Lopes Ferreira et al. 2007) identifiziert.

Die *tert*-Butanol-Oxygenasen vom MdpJK-Typ aus den Stämmen *A. tertiaricarbonis* L108 und *Methylibium petroleiphilum* PM1 ähneln stark den Phthalat-4,5-Dioxygenasen, die der Gruppe der Rieske Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen angehören. Diese Typ I Dioxygenasen bestehen aus einem Oxygenase- und einem Reduktase-Teil.

Die *tert*-Butanol-Oxygenase vom AlkB-Typ aus dem Stamm *M. austrofricanum* IFP 2012 ist verwandt mit Nicht-Häm-di-Eisen-Oxygenasen. Hierbei handelt es sich um integrale Membranproteine, die mit der Hydroxylierung von mittel- bis langkettigen *n*-Alkanen assoziiert sind. AlkB bildet ein Elektronentransfersystem mit dem Rubredoxin AlkG und der Reduktase AlkT.

Zwar wurden Enzyme des AlkB-Typs mit Ähnlichkeit zur Teilsequenz aus Stamm IFP 2012 (ABB13506.2, 114 aa) in Stamm IBE100 (MNO81_RS03470, 405 aa, 95,6 %) und Stamm IBE200 (GKP29_RS14140, 406 aa, 88,6 %; GKP29_RS12070, 411 aa, 86,4 %) gefunden, aber offensichtlich sind sie nicht zur *tert*-Butanol-Oxidation befähigt.

4.5.7 Cluster-Vergleich zur Identifikation anderer Alken-Abbauer

Die Blast-Recherche bezüglich homologer Enzyme aus den Genclustern der Stämme IBE100 und IBE200 zeigte Verwandte in einer Vielzahl an Bakterien auf, wobei eine Häufung an Treffern in der Familie der *Mycobacteriaceae* ersichtlich wurde. Daraus ergab sich die Frage, welche Stämme potenziell MP abbauen könnten. Ein Vergleich der Cluster der Stämme IBE100 und IBE200 offenbarte auffallende Ähnlichkeiten in Größe, Zusammensetzung und Reihenfolge der Gene. Darüber hinaus befindet sich eine nahezu identische Kopie des gesamten Clusters von Stamm IBE100 auf dem Plasmid pELW1-1 (CP032156.1) von *Mycobacterium* sp. ELW1, dem bisher einzigen anderen bekannten Stamm, der auf MP wächst. Die Identität erstreckt sich sogar bis auf die Nukleotidebene hinunter, mit zwei Abschnitten von 40.754 (Identitäten: 40.566, Lücken: 22) und 35.773 Nukleotiden (Identitäten: 35.513, Lücken: 36), flankiert und unterbrochen von Transposon-Elementen (Abbildung 4-1), blau hinterlegte Bereiche). Dies deutet stark auf einen horizontalen Gentransfer hin.

Angesichts der offensichtlichen Konservierungsmuster wurde eine *in silico* Analyse an den verfügbaren Gesamtgenomen der in den phylogenetischen Bäumen aus Abbildung 3-13 bis Abbildung 3-18 vertretenen Stämme durchgeführt. In keinem der untersuchten Genome wurde eine ähnliche Clusterung gefunden. Jedoch konnten in drei Stämmen Homologe identifiziert werden, deren mögliches Zusammenspiel jeweils einen Abbauweg konstituieren könnte.

Mycobacterium sp. NAZ190054 (Abbildung 4-1) beherbergt die Dehydrogenasen (MdpB: WP_067953590.1, MdpC: WP_231750723.1), den CoA-Lyase/Mutase Subcluster (HCL: WP_197420071.1, HcmAB/MeaH: WP_082753666.1, WP_067953579.1, WP_067953577.1) sowie FadB (WP_067953589.1) und PhaA (KWX57522.1), mit Sequenz-Ähnlichkeiten von 55–95 %. Eine Umwandlung von 2-Methylpropan-1,2-diol in Acetyl-CoA erscheint möglich. Aufgrund des Fehlens von Homologen zu einer Epoxid-Hydrolase und einer löslichen di-Eisen-Monooxygenase (SDM) ist ein Abbau von MP in diesem Stamm allerdings unwahrscheinlich. Stattdessen codiert der Stamm für eine Oxygenase vom AlkB-Typ (KWX69091.1) mit 96 % Identität zu einer Teilsequenz von AlkB (ABB13506.2) aus *M. austroafricanum* IFP 2012, die an der Hydroxylierung von *tert*-Butanol beteiligt ist (Lopes Ferreira et al. 2007). Daher ist dieses klinische Isolat aus einer abdominalen cerebrospinalen Pseudozyste höchstwahrscheinlich ein *tert*-Butanol-Abbauer.

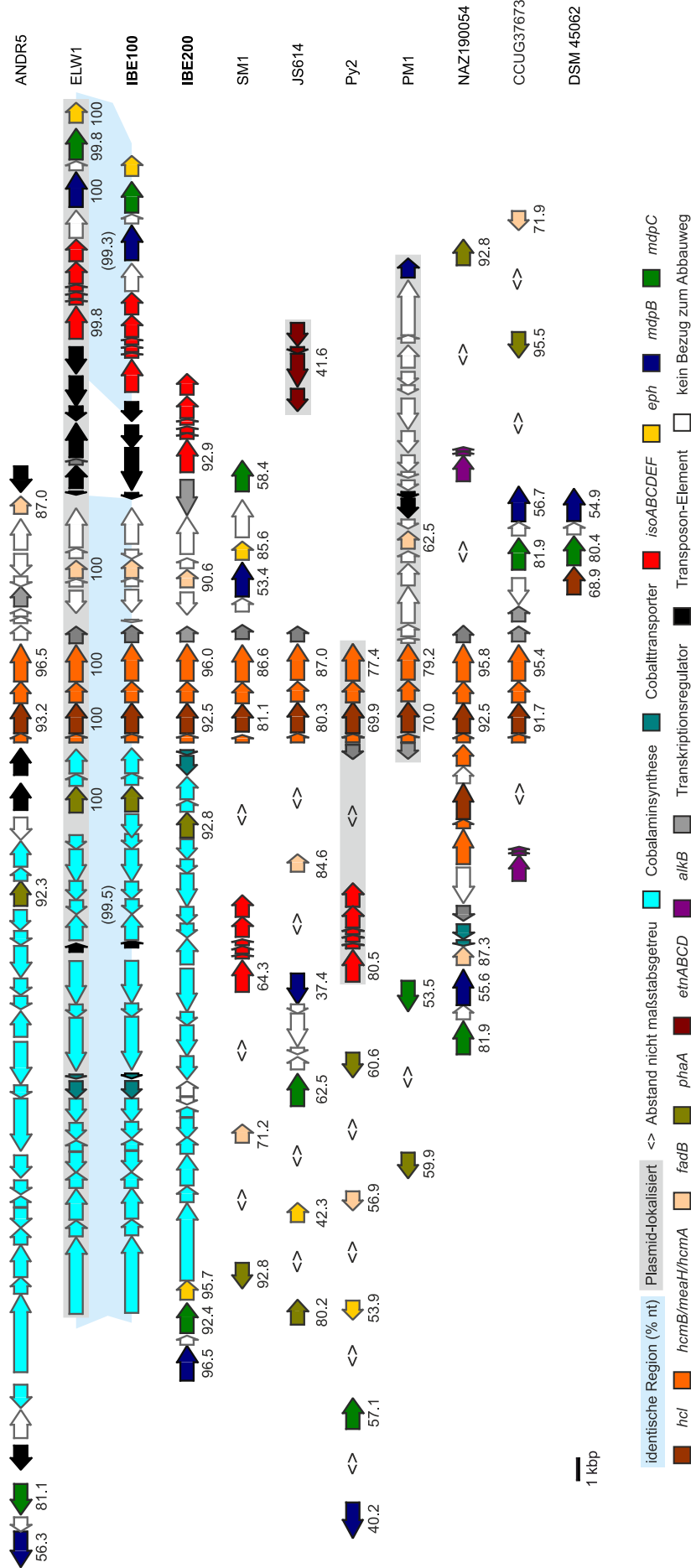


Abbildung 4-1 Vergleich der Gencuster

Vergleich der Gencuster von Stämmen, die homologe Enzyme für den Abbau von MP codieren, die in den phylogenetischen Bäumen von Abbildung 3-13 bis Abbildung 3-18 erscheinen. Prozentuale Ähnlichkeit der mit IBE100 verwandten Peptide unterhalb der CDS. Bestätigte (*Methylibium petroleiphilum* PM1) und postulierte *tert*-Butanol-Abbauer (*Mycobacterium* sp. NAZ190054). Bestätigte (IBE100, IBE200, *Mycobacterium* sp. ELW1) und potentielle MP-Abbauer (*Mycobacterium* sp. SM1). Stämme mit Epoxidaseaktivität gegenüber MP (*Nocardioides* sp. JS614, *X. autotrophicus* Py2).

Accession: *Mycolicibacterium alkanivorans* ANDR5 (NZ_JAIVFL010000000), *Mycobacterium* sp. ELW1 (CP032156), *Mycobacterium* sp. SM1 (JAFLNH010000000), *Nocardioides* sp. JS614 (NC_008697, NC_008699), *Xanthobacter autotrophicus* Py2 (NC_009717, NC_009720), *Methylibium petroleiphilum* PM1 (CP000556, NC_008825), *Mycobacterium* sp. NAZ190054 (NZ_LMVQ000000000), *Mycolicibacterium agri* CCUG37673 N46L48009C37 (NZ_PDCP010000000), *Actinomyces* *chiangmaiensis* DSM 45062 (NZ_ARBI010000000).

Diskussion

Gleichermaßen sind in *Mycobacterium agri* CCUG37673 N15L113659C33 (Abbildung 4-1) mit MdpB (WP_097942234.1), MdpC (WP_234816356.1), HCL (WP_207767307.1), HcmAB/MeaH (WP_163701069.1, WP_097942240.1, WP_207767306.1), FadB (PEG42678.1), PhaA (PEG34786.1) homologe Enzyme – mit Sequenz-Ähnlichkeiten von 56–95 % – für die Oxidation von 2-Methylpropan-1,2-diol codiert. Dieser Stamm besitzt ebenfalls eine Oxygenase vom Typ AlkB (PEG39330.1) mit 83 % Identität zur Teilsequenz von AlkB aus IFP2012, was ihn vermutlich dazu befähigt, *tert*-Butanol als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen zu können.

In ähnlicher Weise besitzt *Mycolicibacterium alkanivorans* ANDR5 (Abbildung 4-1), ein Propan-abbauender Stamm, der aus einem natürlichen Erdgasaustritt isoliert wurde (Farhan UI Haque et al. 2022), Enzyme für den Abbau von 2-Methylpropan-1,2-diol zu Acetyl-CoA, die homolog zu denen der MP-abbauenden Stämme sind (MdpB: WP_252393995.1, MdpC: WP_252393994.1, HCL: WP_243072086.1, HcmAB/MeaH: WP_243072084.1, WP_243072087.1, WP_243072085.1, FadB: WP_252394578.1, PhaA: WP_243072091.1). Die Sequenz-Ähnlichkeiten reichen von 56–96 %. In diesem Stamm fehlen aber Homologe zu AlkB oder MdpJK, so dass ein mutmaßlicher *tert*-Butanol-Abbauweg unwahrscheinlich erscheint. Drei SDMs und vier Epoxid-Hydrolasen mit unbekannter Funktion sind im Genom codiert, aber ob eine von ihnen für den MP-Abbau herangezogen werden könnte, muss noch geklärt werden.

Mycobacterium sp. SM1 (Abbildung 4-1), ein Umweltisolat aus einem Schlammvulkan, besitzt eine SDM vom Aromaten-/Alken-/Isopren-Typ (WP_213445384.1). Sie ist mit den Toluol-4-Monooxygenasen TouA und TmoA aus *Ps. stutzeri* OX1 bzw. *Ps. mendocina* KR1 geclustert (Abbildung 3-13), die Epoxidase-Aktivität gegenüber Alkenen aufweisen (Sazinsky et al. 2004; McClay et al. 2000). Weiterhin sind Homologe zu EPH (WP_213445459.1), MdpB (WP_236057206.1), MdpC (WP_213445463.1), HCL (WP_213445446.1), HcmAB/MeaH (WP_213445451.1, WP_236057202.1, WP_236056917.1), FadB (MBS4728511.1) und PhaA (MBS4727285.1) mit Sequenz-Ähnlichkeiten von 53–92 % im Genom vorhanden, die jeden erforderlichen Reaktionsschritt von 1,2-Epoxy-2-methylpropan zu Acetyl-CoA abdecken. Dieser Stamm codiert jedoch ein Enzym (WP_213441950.1) mit 91 % Ähnlichkeit zur Epoxyalkan-CoM-Transferase EaCoMT aus *Gordonia rubripertincta* B-276. In diesem Stamm fungiert 1,2-Epoxy-2-methylpropan als Induktor und gleichzeitig als irreversibler Inhibitor von EaCoMT (Allen et al. 1999), der das Epoxid abfangen und die Expression der benötigten Epoxid-Hydrolase verhindern könnte. Die Inhibierung konnte auch im MP-epoxidierenden Stamm *X. autotrophicus* Py2 beobachtet werden (Allen und Ensign 1997). Bisher liegen keine Informationen über das Abbaupotenzial des Stammes SM1 vor, obwohl die Fähigkeit, kurzketttige Alkene oder sogar MP zu mineralisieren, möglich zu sein scheint.

Kineosporia sp. A_224 fällt neutrophil Eisen und ist ein Umweltisolat aus einer Flusssäue. Die α -Untereinheit (WP_088288033.1) der codierten SDM weist eine Ähnlichkeit von 87,7 % zu *MglbeA* auf, clustert jedoch näher an den Isopren-Monooxygenasen (Abbildung 3-13). Zudem verfügt der Stamm nicht über Homologe zu den am MP-Abbau beteiligten Enzymen; dafür ist die typische Operonstruktur eines Isopren-Abbauers vorhanden (Abbildung 4-2). Vermutlich kann Stamm A_224 Isopren als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen.

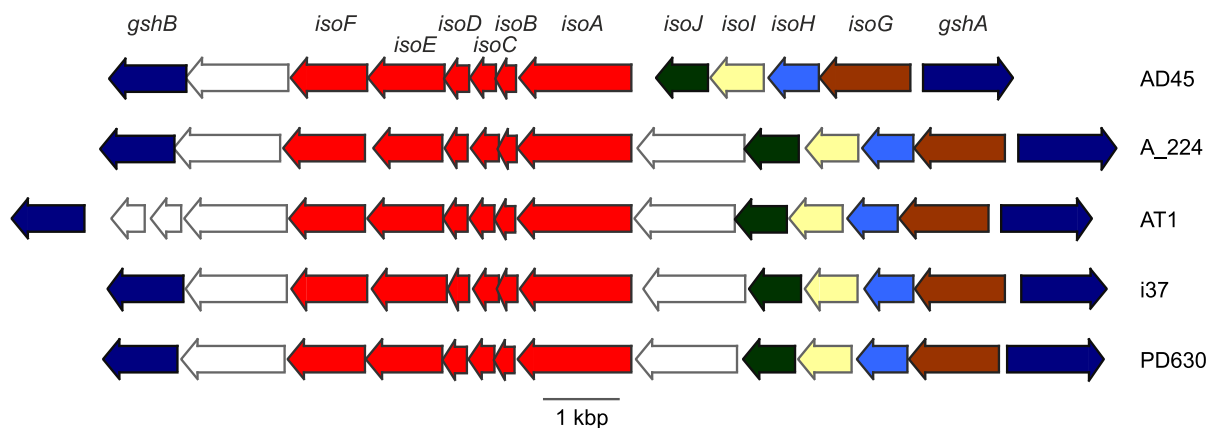


Abbildung 4-2 Vergleich der Operonstruktur des Isopren-Abbaus

Die Operonstruktur von *Kineosporia* sp. A_224 (MWLN01000188) fügt sich in den Kanon der Isopren-abbauenden Stämme *Rhodococcus* sp. AD45 (JYOP01000009), *Mycobacterium* sp. AT1 (MVOC01000096), *Gordonia* sp. i37 (MVPX01000257) und *Rhodococcus opacus* PD630 (CP080954.1) ein. Höchstwahrscheinlich kann Stamm A_224 Isopren als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. *gshAB*: Glutathion-Synthase, *isoABCDEF*: Isopren-Monooxygenase, *isoJ*: unbekannte Funktion, *isoI*: Glutathion-S-Transferase, *isoH*: Dehydrogenase, *isoG*: CoA-Ligase.

4.6 Die Isobuten-Monooxygenase

Die Herausforderung bei der heterologen Expression ist die Auswahl eines geeigneten Expressionssystems. Weithin bewährte Wirte (z. B. *E. coli*) haben sich für Proteine der Actinomycetales wiederholt als ungeeignet herausgestellt (Furuya et al. 2013; McCarl et al. 2018; Sims et al. 2022; Smith et al. 1999) oder liefern nur geringe Aktivität (*Ps. putida* mt-2 KT2440), verglichen mit der Expression in *M. smegmatis* MC2 155 (McCarl et al. 2018), dem Modellwirt für mycobakterielle Genexpression. Aufgrund seiner Einordnung in die Risikogruppe 2 stand der Stamm für diese Arbeit nicht zur Verfügung.

Systeme mit den Wirten *Ps. veronii* MEK700 oder *M. austroafricanum* TBA100 waren von besonderem Interesse, da hier die Funktionalität über das Wachstum der Wirte anstelle der Metabolitendetektion hätte überprüft werden können. Stamm MEK700 wächst auf 2-Butanol, welches durch die Co-Oxidation von MP und *n*-Butan erzeugt worden wäre (siehe Abschnitt 3.3.2). Klonierungen mit den Vektoren pCom10 und pUS250 waren erfolgreich, jedoch blieb das erwartete Wachstum aus. Auch konnte 1,2-Epoxy-2-methylpropan weder im Medium noch im Hoch-OD-Ruhezellenansatz detektiert werden. Stamm TBA100 kann auf *tert*-Butanol bzw.

dem gemeinsamen Metaboliten der Abbauege von *tert*-Butanol und MP, Methylpropan-1,2-diol, wachsen (Abschnitt 2.4.5.5). Die Elektrotransformation des Vektorkonstrukts mit pST-K in Stamm TBA100 gelang trotz Nutzung des gesamten Spannungs- und Kapazitätsregisters des Elektroporators nicht. Stamm TBA100 besitzt, ähnlich wie Stamm IBE100, eine besonders hydrophobe Zellwand, die vermutlich eine Aufnahme des Plasmids verhinderte.

Ein funktionierendes Expressionssystem konnte mit *M. fluoranthenorans* BUT6 und dem Vektor pST-K erzeugt werden. Die erfolgreiche Expression der Untereinheiten IbeABCDE wurde mittels Peptidmassen Fingerprint bestätigt. Hierbei stellte sich heraus, dass eine Inkubationstemperatur von ca. 21 °C im Vergleich zu 30 °C höhere Wiederfindungsraten der Peptide ergab. Auch konnte keine Epoxidase-Aktivität mit Ruhezellenansätzen mit bei der höheren Temperatur inkubierten Zellen erzielt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass bei der niedrigeren Inkubationstemperatur mehr Protein gebildet wird und bei höheren Temperaturen zusätzlich Faltungsschwierigkeiten auftreten.

Die NADH-Reduktaseuntereinheit IbeF der Isobuten-Monooxygenase konnte mittels PMF im Zellextrakt von Stamm IBE200 nachgewiesen werden, nicht jedoch im Expressionssystem. Vergleichbare Befunde ergaben sich bei der heterologen Expression von Toluol-, Propen- und Isopren-Monooxygenasen. Die Reduktase-Untereinheit der Tmo aus *Ps. mendocina* KR1, exprimiert in *E. coli*, resultierte in der Bildung von Inklusionskörpern (Acheson et al. 2015; Yen und Karl 1992). Weiterhin konnte bei der heterologen Expression der FAD-Cofaktor in die Reduktase nicht oder nur unzureichend inkorporiert werden. Nach Zugabe von FAD zu isolierter TmoF konnte ein erhöhter NADH-Umsatz gemessen werden (Pikus et al. 1996). Der Versuch, TouF aus *Ps. stutzeri* OX1 in *E. coli* JM109 zu exprimieren, scheiterte vermutlich aus den genannten Gründen (Bertoni et al. 1996). Ein weiterer Versuch der Expression in BL21DE3 erzeugte erneut inclusion bodies, die jedoch renaturiert werden konnten (Cafaro et al. 2002). XamoF aus *X. autotrophicus* Py2 und IsoF aus *Rhodococcus* sp. AD45 konnten ebenfalls nicht in *E. coli* Rosetta (DE3)(pLysS) exprimiert werden (Champreda et al. 2004; Sims et al. 2022).

TmoF konnte letztlich als Fusionsprodukt mit dem Maltose-Bindeprotein funktional exprimiert werden (Bailey et al. 2008a), ebenso die Reduktase EtnD der Ethen-Monooxygenase aus Stamm B-276 (Smith et al. 1999). Mit den gereinigten Enzymen gelang es, sowohl die Alken-Monooxygenase Xamo aus Stamm Py2 (Champreda et al. 2004), als auch die homolog exprimierte Isopren-Monooxygenase aus Stamm AD45 *in vitro* funktional zu rekonstituieren (Sims et al. 2022).

Das Fehlen der Reduktase im heterologen System stellt nicht zwingend ein Problem dar. Ihre nicht-essenzielle Rolle bei der Synthese der Monooxygenase sowie der Katalyse konnte nachgewiesen werden (Yen und Karl 1992). Jedoch wurde eine deutliche Steigerung der Umsatzrate bei der Co-Expression von *tmoF* erzielt. Es wurde vermutet, dass eine

Diskussion

unspezifische Reduktaseaktivität des Wirts die Elektronen für die Monooxygenase liefern kann. Sowohl im Zellextrakt des BUT6-Wildtyps sowie des Expressionssystems war ohne Substratzugabe jeweils ein starker NADH-Verbrauch messbar, der vermutlich die Elektronen für IbeABCDE lieferte.

Die Funktionalität der von Stamm BUT6 exprimierten Monooxygenase IbeABCDE konnte im Ruhezellenansatz gezeigt werden. Dabei war eine hyperbolische Beziehung zwischen der initialen Substratkonzentration und der Umsatzrate zu erkennen. Für eine gewisse Reaktionszeit akkumulierte stetig das Produkt, dessen Konzentration danach steil abnahm. Eine chemische Abreaktion des Epoxids im zellfreien Medium war jedoch nicht zu beobachten. Die Epoxid-Hydrolase wurde im Expressionssystem mittels Peptidmassen Fingerprint nicht nachgewiesen, was eine katalytische Aktivität dieses Enzyms ebenfalls unwahrscheinlich macht. Im Ruhezellenansatz war mit dem Expressionssystem und dem Wildtyp jeweils eine nahezu identische Konzentrationsabnahme des Epoxids messbar, was auf eine native Fähigkeit des Wildtyps zur Epoxid-Elimination hindeutet. Hier wurde eine geringfügig schnellere Abnahme (2 bzw. 3 Stunden) bei einer leicht höheren Epoxid-Ausgangskonzentration (~100 bzw. ~80 mM) (Abbildung 3-34) im Vergleich zum Ruhezellenansatz mit Epoxidbildung aus MP gemessen (Abbildung 3-31). Geht man davon aus, dass die Epoxid-Bildung noch zeitgleich mit der Epoxid-Elimination stattfindet, ist der gemessene Konzentrationsverlauf plausibel.

Die Substratspezifität eines Enzyms kann durch die Substrat-koordinierenden Aminosäurereste im aktiven Zentrum, dessen Volumen oder den Durchmesser des Substrattunnels definiert sein. SDMs der Gruppe 2 und 4 weisen mitunter ein breites Substratspektrum auf. Neben MP konnte mit Stamm IBE200 und dem Expressionssystem in verschiedenen Versuchen Aktivität auf 2-Methyl-1-buten und Isopren gezeigt werden. Jedoch waren die Aussagen nicht immer übereinstimmend: So lag die Epoxid-Bildung aus je 2-Methyl-1-buten bzw. Isopren durch das Expressionssystem lediglich nahe der Nachweisgrenze. In Stamm IBE200 hingegen konnte eine Sauerstoffzehrung nach Zugabe von Isopren (48 % bezogen auf MP), nicht aber von 2-Methyl-1-buten gemessen werden.

Stellt man einen Sequenzvergleich der Substrat-koordinierenden Aminosäurereste an (Abbildung 3-23), so erkennt man innerhalb der Alken-/Isopren-Zweige der Gruppe 2 eine Variabilität nur an Position 100. Einerseits ist das unpolare Isoleucin, andererseits das polare Threonin vertreten. SDMs mit diesen Resten können sowohl Propen, Buten, MP und Isopren, aber auch Toluol und Styrol epoxidieren bzw. hydroxylieren (Tabelle 4-1). Zwar gibt es bisher keine experimentellen Belege für die SDMs der Stämme AD45, JS60 und B-276; eine Epoxidierung von MP durch diese Enzyme liegt jedoch nahe.

Tabelle 4-1 Substrat-Aktivität ausgewählter SDMs

Stamm	Toluol	MP	Ethen	Propen	Buten *	Butadien	Isopren
OX1 ¹	+	kA	kA	kA	+	+	kA
KR1 ²	+	kA	kA	kA	+	+	kA
IBE100	kA	+	kA	kA	kA	kA	kA
IBE200	kA	+	kA	kA	kA	kA	(+)
ELW1 ³	kA	+	+	+	+	kA	kA
AD45 ⁴	+	(+)	kA	+	kA	kA	+
Py2 ⁵	+	+	+	+	+	kA	+ ⁹
JS614 ⁶	kA	+	+	+	+	kA	kA
B-276 ⁷	kA	(+)	+	+	+	+	kA
JS60 ⁸	kA	(+)	+	kA	kA	kA	kA

Hydroxylierungs- bzw. Epoxidierungsspektrum ausgewählter SDMs. * mindestens eines der Buten-Isomere. kA: keine Angaben. In Klammern: Oxidation wahrscheinlich. ¹ (Sazinsky et al. 2004) ² (McClay et al. 2000) ³ (Kottegoda et al. 2015) ⁴ (van Hylckama Vlieg et al. 1998) ⁵ (Ensign 1996) ⁶ (Owens et al. 2009) ⁷ (Furuhashi et al. 1981) ⁸ (Coleman et al. 2002) ⁹ (Johnston et al. 2017).

Betrachtet man die Substrat-koordinierenden Reste der Toluol-Monooxygenasen, sind Unterschiede zu den Aromaten-/Alken-/Isopren-Monooxygenasen an den Positionen 103, 162 und 180 ersichtlich, aber auch untereinander. An Position 103 sind hier gegenüber einem Valin- (unpolar) sowohl ein Glutaminsäure- (sauer) als auch ein Glycin-Rest (unpolar) vertreten. An Position 162 ist hier anstelle eines Phenylalanin- (unpolar) ein Isoleucin- (unpolar) oder Tryptophan-Rest (unpolar) anhängig. An Position 180 liegt entweder anstatt eines Methionins (unpolar) ein Isoleucin (unpolar) oder keine Veränderung vor. Eine Ableitung eines Zusammenhangs bezüglich der Substratspezifität ist nicht offensichtlich. Folglich lässt sich eine sterische Restriktion für großvolumige Substrate in erster Linie über den Tunneldurchmesser vermuten. Für die Toluol-Monooxygenase aus *Ps. stutzeri* OX1 wurde ein Tunnel zu dem 250 Å³ großen aktiven Zentrum von 30–35 Å Länge bei 6–10 Å Durchmesser beschrieben (Sazinsky et al. 2004; Bailey et al. 2008b), ausreichend groß für monoaromatische Substrate. Die modellierten Tunnel der SDMs der Isolate IBE100 und IBE200 weisen eine vergleichbare Länge auf, jedoch Durchmesser von nur 2,6–5,8 Å, die zu eng für z. B. Toluol oder Styrol sind. Jedoch auch das Modell für IsoA aus *Rhodococcus* sp. AD45 sagt Tunneldurchmesser von nur 2,0–5,6 Å voraus, eindeutig zu schmal für Aromaten, obwohl eine Oxidation von Toluol und Styrol *in vivo* gezeigt werden konnte (van Hylckama Vlieg et al. 1998).

Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte bei den Vorhersagemodellen (z. B. AlphaFold) erzielt wurden, sind *in silico* Homologiemodelle noch von Kristallstrukturen abhängig, wobei das Ergebnis stark von der Sequenzähnlichkeit abhängt. Zudem können Konformationsänderungen ausgelöst durch Protein-Protein-Interaktion, wie beispielsweise der Einfluss des Kopplungsproteins auf die Oxygenase (Acheson et al. 2014) im Modell der Toluol-4-Monooxygenase aus *Ps. mendocina* KR1, nicht dargestellt werden. Vorhersagen zu den Eigenschaften können gemacht werden, müssen aber – wie hier verdeutlicht wurde – experimentell validiert werden.

4.7 Ausblick

Der phylogenetische Stammbaum der löslichen di-Eisen-Monooxygenasen (Abbildung 3-13) suggeriert mit den Monooxygenasen der Stämme IBE100, IBE200 und ELW1 neue Untergruppen sowohl innerhalb der Aromaten-/Alken-/Isopren-Gruppe als auch in Gruppe 6 (terminale Propanoxidation). In der NCBI Datenbank sind derzeit keine weiteren Sequenzen hinterlegt, die auf diesen Zweigen clustern.

Die in den identifizierten Genclustern der drei MP-abbauenden Mycobacterien IBE100, IBE200 und ELW1 codierte SDM MmoXYBR wurde aufgrund der Sequenzähnlichkeit ihrer α -Untereinheit und der Operonstruktur der Gruppe 6 der terminalen Propan-Monooxygenasen zugeordnet. Weder Stamm IBE100 noch IBE200 waren in der Lage, auf Propan, jedoch auf 1-Propanol, Propanal und Propionsäure, zu wachsen. Eine Transportlimitation des Gases über die Zellwand erscheint unwahrscheinlich; dennoch ist es nicht ungewöhnlich, dass ein Stamm auf einem Alkohol, aber nicht auf dem korrespondierenden Alkan wachsen kann (siehe Stämme IBE100 und ELW1 mit Wachstum auf 1-Hexanol und keinem Wachstum auf *n*-Hexan). Aufschluss über die Substrataffinität, mögliche Oxidationsprodukte und ggf. eine mögliche Rolle von MmoXYBR im Gencluster kann eine *in vitro*-Betrachtung des gereinigten Enzyms liefern.

Die MP-epoxidierende SDM IbeABCDEF konnte zwar nur ohne ihre NADH-Reduktaseuntereinheit IbeF, jedoch funktional heterolog, exprimiert werden. Zur Ermittlung des Substratspektrums des isolierten Enzyms können in einem nächsten Schritt die einzelnen Untereinheiten exprimiert, gereinigt und *in vitro* rekonstituiert werden. Substrate könnten dann unter Ausschluss von etwaigen Transportlimitationen durch eine Zellwand im Vergleich mit einer *in vivo* Analyse getestet werden. Hier würde sich zeigen, ob Isopren bzw. 2-Methylbut-1-en, oder gar Aromaten, durch die SDM epoxidiert werden können. Umgekehrt ist ein Test des Umsatzes von MP durch Isopren-Monooxygenasen z. B. aus *Rhodococcus* sp. AD45 oder *Mycobacterium* sp. AT1 anzustreben.

MP, wie auch MTBE und *tert*-Butanol, sind Xenobiotika und global gesehen mengenmäßig Spurenstoffe. Dennoch bestehen in der Natur sehr spezifische, für diese Beispiele sogar in Teilen kongruente Abbauewege. Hier greift die Natur auf das Substrat-Channeling zurück, also das Reduzieren der Komplexität des Abbauproblems durch die Transformation hin zu zentralen Metaboliten. Gleichzeitig leistet die Biologie sich einen immensen Aufwand der enzymatischen Spezialisierung für sehr ähnliche Moleküle (wie gezeigt für die löslichen di-Eisen-Monooxygenasen, Epoxid-Ringöffnung sowie Alkyl-CoA-Mutasen in den Abschnitten 2.4.1 bis 2.4.3). Der Chemiker würde es anders erwarten. Die ursprüngliche Annahme, dass der MP-Abbau in den Valin-Abbau mündet (Seitenketten-Oxidation anstatt Epoxidierung), also der Einstieg in den zentralen Metabolismus über einen ubiquitär vorhandenen

Aminosäurestoffwechsel genutzt wird, lag nahe, wurde aber falsifiziert. Stattdessen wird der thermodynamisch günstigere initiale Schritt der Alken-Oxidation beschritten, mit der folgenden Notwendigkeit des zunächst aufwändiger erscheinenden unteren, sehr spezifischen Abbauwegs (radikalische Linearisierung und „teure“ Vitaminsynthese). Als Alternativen gäbe es die vorgestellten Epoxid-Öffnungsmechanismen, den Coenzym M- und den Glutathion-Weg (Abbildung 2-1 sowie Abschnitte 2.4.5.3 und 2.4.5.4). Der Propen-Abbau zeigt, dass CoM durch die Transferase terminal addiert wird; somit verbliebe die Hydroxylgruppe im Falle von MP am tertiären Kohlenstoff. Eine weitere Oxidation wäre ausgeschlossen, eine anschließende Carboxylierung würde einen C₅-Körper erzeugen (später evtl. entstehendes Propionyl-CoA müsste carboxyliert und mutiert werden) und die Verzweigung des Kohlenstoffgerüsts nicht auflösen. Fraglich ist auch, ob 1,2-Epoxy-2-methylpropan überhaupt von einer Epoxyalkan-CoM-Transferase umgesetzt würde, da das Molekül als Inhibitor dieses Enzyms beschrieben wurde (Allen und Ensign 1997; Allen et al. 1999). Die Glutathion-S-Transferase aus *Rhodococcus* sp. AD45 hat ein erweitertes Substratspektrum und kann neben Isoprenoxid auch Epoxypropan sowie 1,2-Epoxybutan öffnen (van Hylckama Vlieg et al. 1999). Eine Nutzung von 1,2-Epoxy-2-methylpropan scheint möglich zu sein. Die Epoxid-Öffnung über GSH mündet beim postulierten unteren Abbauweg von Isopren in den Isoleucin-Abbau. Analog dazu würde MP in den Reaktionen des Valin-Abbaus münden, aber mit erheblichem Mehraufwand im Vergleich zur beschriebenen Seitenketten-Oxidation in Abschnitt 4.5.1 (Anzahl der Reaktionsschritte/Enzyme/Cofaktoren/Aktivierungsenergie).

Der von der Natur eingeschlagene Abbauweg für MP ist somit die energetisch günstigste Route – Überraschung?! Zumal hier (unabsichtlich) das Kunststück vollzogen wird, dass bei der Mutierung der verzweigten Säure passenderweise die vorhandene Hydroxylgruppe an die neue β -Position „verschoben“ wird, was auf dem Weg zum Acetyl-CoA zwei Reaktionsschritte im Vergleich zur β -Oxidation (von z. B. Buttersäure) einspart.

Könnten umgekehrt Isoprenoxid und Propen-/Ethenoxid über einen hydrolytischen Weg metabolisiert werden? Der aerobe Abbauweg von Ethandiol über Glyoxylsäure ist hinreichend bekannt (Gonzalez et al. 1972). Propan-1,2-diol wird aerob über den 2-Methylcitrat Zyklus I abgebaut (Horswill und Escalante-Semerena 1999). Ausgehend von den entsprechenden Epoxiden wurde bisher nur die Mineralisierung von Propenoxid via Hydrolyse gezeigt (de Bont et al. 1982). Auch ein vollständiger Abbauweg ist bisher unbekannt, scheint aber prinzipiell möglich. 2-Methylbut-3-en-1,2-diol, das Hydrolyseprodukt von Isoprenoxid, könnte nach terminaler Oxidation zur korrespondierenden Säure, der CoA-Aktivierung und der Mutierung zu 3-Hydroxypent-4-enyl-CoA transformiert werden. Nach Abspaltung eines Acetyl-CoA entstünde ein Acrylyl-CoA. Ein Abbauweg für dieses Molekül existiert im Stamm *Halomonas* sp. HTNK1 (Todd et al. 2010). Eine vollständige Mineralisierung wäre somit denkbar.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien, Medien, Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt.

SE1000, Spurenelementlösung, 1.000-fach

H ₃ BO ₃	300 mg/L
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	200 mg/L
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	100 mg/L
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	30 mg/L
NaMoO ₃ · 2 H ₂ O	30 mg/L
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	20 mg/L
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	20 mg/L

SL100, Mineralsalzlösung, 100-fach

(NH ₄) ₂ SO ₄	100 g/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	20 g/L
Fe(III)NH ₄ -Citrat	1 g/L
SE1000	100 mL/L

PP20, Phosphatpuffer, 20-fach

KH ₂ PO ₄	20 g/L
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	70 g/L

Ca1000, Calciumnitratlösung, 1.000-fach

Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	50 g/L
--------------------------------------------------------	--------

Minimalmedium

PP20	50 g/L
SL100	10 g/L
Ca1000	1 g/L
Agar-Agar (bei Festmedien)	15 g/L

Luria Bertani Medium

Trypton	10 g/L
NaCl	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
Agar-Agar (bei Festmedien)	15 g/L

Material und Methoden

SOC, Super Optimal Broth with Carbon Source

Pepton	20,0 g/L
Hefeextrakt	5,00 g/L
NaCl	0,60 g/L
KCl	0,18 g/L
MgCl ₂	2,04 g/L
MgSO ₄	2,46 g/L
Glucose, 1 M	20 mL/L

Saline, 0,9 %

NaCl	9 g/L
------	-------

PBS, Phosphatgepufferte Saline

NaCl	8,00 g/L
KCl	0,20 g/L
Na ₂ HPO ₄	1,42 g/L
KH ₂ PO ₄	0,24 g/L

Lower Tris, pH 8,8

Tris	181,72 g/L
SDS	4,00 g/L
mit HCl auf pH 8,8 titriert	

Upper Tris, pH 6,8

Tris	60,40 g/L
SDS	4,00 g/L
mit HCl auf pH 6,8 titriert	

Tris-Glycin-Puffer

Tris	2,79 g/L
Glycin	14,26 g/L
SDS	1,00 g/L

Bradford-Lösung

Coomassie Brilliantblau G-250	100 mg/L
Ethanol, absolut	50 mL/L
Phosphorsäure, 85 %	100 mL/L

Färbe-/Entfärbelösung

Methanol	400 mL/L
Eisessig	100 mL/L
Coomassie Brilliantblau R-250 (nur bei Färbelösung)	2 g/L

Kanamycin-Lösung

Kanamcyinsulfat	50 µg/mL
-----------------	----------

Material und Methoden

TAE, 50-fach

Tris	242,0 g/L
Eisessig	57,1 mL/L
EDTA	18,6 g/L

Ladepuffer

Glycerol	500,0 g/L
EDTA	33,6 g/L
Bromphenolblau	2,5 g/L
Xylencyanol	2,5 g/L

Indol-Lösung

Indol in Dimethylformamid	50 mM
------------------------------	-------

NBP-Lösung

4-(4-Nitrobenzyl)pyridin in Ethylenglykol	100 mM
----------------------------------------------	--------

Triethylamin-Aceton-Lösung

Triethylamin in Aceton	50 % (v/v)
---------------------------	------------

Phenylborsäure-Lösung

Phenylborsäure in Aceton	10 mM
-----------------------------	-------

5.2 NBP-Assay, Derivatisierung, GC-MS-Analyse, Bradford-Assay

Für den Nachweis von Epoxiden wurde eine modifizierte Methode von Epstein und Kollegen verwendet (Epstein et al. 1955). Dafür wurden 400 μL 4-(4-Nitrobenzyl)pyridin (100 mM in Ethylenglykol) zu 200 μL filtriertem Überstand einer Flüssigkultur gegeben, geschüttelt und 30 Minuten lang bei 90 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 500 μL einer Triethylamin-Aceton-Lösung (1:1) zugegeben und geschüttelt. Bei Vorhandensein von Epoxiden würde sich eine violette Farbe entwickeln, deren Intensität proportional zur Konzentration des Epoxids ist (Abschnitt 7.7.3). Die Absorption kann bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ photometrisch gemessen werden.

Für den Nachweis von 1,2-Diolen wurden 100 μL Phenylborsäure (10 mM in Aceton) zu 500 μL filtriertem Überstand einer Flüssigkultur gegeben, geschüttelt und 30 Minuten lang bei 90 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 200–300 mg trockenes NaCl zugegeben, bis keine Klumpenbildung mehr zu beobachten war. 300 μL eiskaltes *n*-Hexan wurden zugegeben, gevortext und zentrifugiert (18.600x *g*, 4 °C, 5 min). 1 μL der organischen Phase wurde in den GC injiziert.

Für den Nachweis von Carbonsäuren wurden 50 μL Ethanol sowie 3 μL H_2SO_4 zu 500 μL filtriertem Überstand einer Flüssigkultur gegeben, gevortext und 30 Minuten bei 90 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde kalziniertes MgCl_2 zugegeben, bis keine Klumpenbildung mehr zu beobachten war. 300 μL eiskaltes *n*-Hexan wurden zugegeben, gevortext und zentrifugiert (18.600x *g*, 4 °C, 5 min). 1 μL der organischen Phase wurde in den GC injiziert.

Die GC-MS-Analyse wurde mit einem 7890A (GC) + 5975C (MS) Setup (beide Agilent) mit einer VF-5ms, 60 m x 0,25 mm x 0,25 μm Säule (J&W), Helium 5.0 als Trägergas bei 15 mL/min und folgendem Temperaturprogramm durchgeführt: 40 °C halten für 4 min, dann Rampe bis 220 °C bei 10 °C/min.

Die Gesamtproteinkonzentration in Zellextrakten wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt. Dabei wurden 200 μL Zellextrakt zu 800 μL Bradford-Lösung gegeben und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Ansätze wurden bei 595 nm gegen 200 μL Deionat/800 μL Bradford-Lösung photometrisch gemessen. Die Absorption ist proportional zum Proteingehalt, eine Kalibrierung erfolgte mit Bovinem Serum Albumin von 0 bis 100 mg/L in Zehnerschritten (Abschnitt 7.7.5).

5.3 Isolierung Methylpropen-abbauender Stämme

Es wurden Reinstämme, die MP vollständig mineralisieren können, für diese Arbeit isoliert. Flüssiges Minimalmedium wurde mit verschiedenen Inokula versetzt (Belebtschlamm Lehr- und Forschungskläarwerk Büsnau-Stuttgart, Belebtschlamm Industriekläranlage Ludwigshafen, Belebtschlamm Kläranlage Basel, Boden Pfaffenwald Stuttgart), mit MP begast und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Erfolgte eine auf Bakterienwachstum zurückzuführende Trübung, wurde 1 mL Suspension in 100 mL frisches Medium überführt und erneut inkubiert. Nach zwei Transfers wurden Verdünnungen mit Saline auf Minimal-Festmedien ausplattiert und im Exsikkator nach Substratzugabe bei 30 °C inkubiert. Freistehende Kolonien wurden auf frische Platten überimpft und Labornamen zugeordnet. Diese waren zusammengesetzt aus IBE (Isobuten) sowie dreistelliger Nummer, z. B. IBE100. Kandidaten mit sichtbarem Biomassezuwachs wurden erneut in Flüssigmedium auf Wachstum überprüft. Bei positivem Wachstum wurden entsprechende Stämme taxonomisch eingeordnet und mikrobiologisch charakterisiert.

5.4 Nomenklatur

Die Nomenklatur der Isolate erfolgte über den Sequenzabgleich des (partiellen) 16S rRNA-Gens, des jeweiligen Gesamtgenoms sowie der partiellen DNA-Sequenz des Hitzeschockproteins Hsp65 (Weisburg et al. 1991; Frank et al. 2008; Kim et al. 2005a). Die entsprechenden Sequenzabschnitte wurden aus genomischer DNA mittels PCR amplifiziert (Primer Tabelle 5-6), gereinigt und von einer Fachfirma (Microsynth SeqLab GmbH, Göttingen)

sequenziert. Der Sequenzabgleich wurde mit dem basic local alignment tool (NCBI blastn, nucleotide collection) sowie dem Type Strain Genome Server (<https://tygs.dsmz.de/>) durchgeführt (Altschul et al. 1997; Meier-Kolthoff und Göker 2019). Die Einordnung in die Risikogruppen nach BioStoffV erfolgte gemäß den Technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe Blatt 466 (TRBA 466).

5.5 Verwendete Bakterienstämme und Plasmide

Stämme und Plasmide, deren Verwendungszweck sowie Herkunft, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 5-1 Verwendete Stämme

Stamm	Verwendung	Herkunft
<i>Ps. veronii</i> MEK700	Wachstumsversuch	(Onaca et al. 2007)
<i>E. coli</i> DH5 α	Klonierung	NEB Inc.
<i>M. fluoranthenivorans</i> BUT6	Überexpression	(Helbich 2011)
<i>M. gadium</i> IBE100	Untersuchung MP-Abbau	diese Arbeit
<i>M. paragordoniae</i> IBE200	Untersuchung MP-Abbau	diese Arbeit

Tabelle 5-2 Verwendete Plasmide

Plasmid	Verwendung	Herkunft
pST-K (# 44560)	Shuttle-Vector, Überexpression	AddGene (Parikh et al. 2013)

5.6 Kolonie- und Zellmorphologie

Kolonien auf Minimal-Festmedium wurden betrachtet und beschrieben anhand Form, Farbe, Rand, Glanz und Profil. Weiter wurden suspendierte Zellen mikroskopiert und ihre Morphologie erfasst.

5.7 Oxidase-, Aminopeptidase-, KOH-, Katalase-, Indol-Test, Ziehl-Neelsen-Färbung

Bactident™ Oxidase- und Aminopeptidase-Tests (beide Merck KGaA) wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Das Gramverhalten wurde zusätzlich durch die Geschwindigkeit der Zellyse durch 3%ige KOH-Lösung überprüft. In einem auf einem Objektträger aufgetragenen Tropfen KOH-Lösung wurde mittels Impföse frisches Zellmaterial suspendiert und vorsichtig herausgezogen. Fadenbildung innerhalb der ersten 10 Sekunden zeigte einen positiven Test an.

Die Katalaseaktivität wurde mit einer Impföse voller Zellen getestet, die auf einen Objektträger gestrichen und mit einem Tropfen 3%igem H₂O₂ versehen wurden. Eine positive Reaktion wurde durch Blasenbildung angezeigt (Taylor et al. 2010).

Zellen, die auf MM-Platten mit MP gewachsen waren, wurden mit einer 50 mM Indol-Lösung (Dimethylformamid) besprüht, um die Monooxygenase-Aktivität zu testen. Indigobildung zeigte eine positive Reaktion an (Mermod et al. 1986).

Die Säurefestigkeit der Zellen wurde mit der Ziehl-Neelsen-Färbung überprüft. Ein Zellausstrich wurde auf einem Objektträger angefertigt, an der Luft getrocknet und hitzefixiert. Die Zellen wurden mit Tropfen von Carbol-Fuchsin angefärbt und erneut hitzefixiert. Anschließend wurde mit deionisiertem Wasser gewaschen und 2 Minuten lang mit saurem Alkohol (97 % Ethanol, 3 % H₂SO₄) entfärbt. Die Zellen wurden erneut gewaschen und 2 Minuten lang mit Methyleneblau (0,5 %) gegengefärbt. Der Objektträger wurde dann abgespült und an der Luft getrocknet.

5.8 Bestimmung der optischen Dichte

Die Trübung einer homogenen Zellsuspension, oder die optische Dichte (OD), ist ein Maß für die Zellkonzentration im Medium. Die Absorption wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm in einer Polystyrol-Küvette (d = 10 mm) gegen reines Medium als Referenz gemessen. Der lineare Messbereich befindet sich zwischen 0,01 und 0,5.

5.9 Wachstum und Substratverwertung

Wachstumsversuche und die mögliche Substratverwertung einzelner Substanzen wurde in flüssigem Minimalmedium in Batch-Ansätzen ermittelt. Es wurde mit MP-induzierten Zellen inokuliert und eine initiale OD₆₀₀ von 0,1–0,2 eingestellt. Flüssige Substrate wurden in einer Konzentration von 3 mM in das Medium zugegeben, gasförmige Substrate in unterschiedlichen Volumina über eine gasdichte Spritze mit Kanüle durch ein Septum in den Gasraum der Kulturflasche injiziert. Auf Grund der starken Neigung zur Zellagglomeration wurden allen Flüssigkulturen 5 µL/L Triton X-100 als Dispergiermittel hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über eine Woche bei 30 °C im Dunkeln. Zur Ermittlung einer Kinetik wurde die OD₆₀₀ über die Zeit aufgezeichnet, die Wachstumskonstante μ aus den Werten der exponentiellen Phase berechnet. Für eine qualitative Bewertung der Substratverwertung wurde die OD₆₀₀ nach einer Woche erfasst und mit der Start-OD verglichen.

5.10 Sauerstoffelektrode

Für die Erfassung des Sauerstoffverbrauchs bei Zugabe verschiedener Substrate zu MP-induzierten Zellen von Stamm IBE200 wurde der Stamm in 500 mL Minimalmedium angezogen. Vor Erreichen des Endes der exponentiellen Phase wurde die Kultur auf Eis abgekühlt, die Zellen abzentrifugiert (14.000x g, 10 min, 4 °C) und zweimal mit eiskalter PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 15 mL eiskalter PBS suspendiert, die OD₆₀₀ bestimmt und auf Eis gelagert.

PBS als Arbeitsmedium wurde im Wasserbad auf 30 °C temperiert und mit Druckluft Sauerstoff-gesättigt. Die Zweipunkt-Kalibrierung der Sauerstoffelektrode erfolgte mit zellfreier und gesättigter PBS-Lösung sowie mit Natrium-Dithionit übersättigter und somit anoxischer

PBS-Lösung. Die erhaltenen Spannungswerte wurden über einen A/D-Wandler erfasst, mit LabView aufgezeichnet und als Kalibrierkurve in der Software hinterlegt. Somit konnte die Zehrungsrate als Prozent-gelöst-Sauerstoff aufgezeichnet werden, wobei die Steigungen des linearen Bereichs der erhaltenen Kurven den Zehrungsraten entsprach. Bei 30 °C liegt die maximale Löslichkeit von Sauerstoff bei 7,53 mg O₂/L bzw. 235,3 µM, die Raten wurden letztlich auf die Stoffmenge bezogen.

Pro Substrat wurden 200 µL Zellsuspension zu 2,8 mL auf 30 °C temperierte und mit Sauerstoff gesättigte PBS-Lösung in die Messzelle mit Rührer gegeben. Die optische Dichte lag pro Ansatz bei OD₆₀₀ = 2,2–2,4. Die Ruheatmung wurde für mindestens eine Minute aufgezeichnet. Nach Zugabe des jeweiligen Substrats wurde die Atmungsrate für etwa drei Minuten aufgezeichnet.

Die Zugabe von MP erfolgte als Lösung in Isopropylether (10 % w/w, TCI Chemicals), um den Sauerstoff nicht durch die Substratbegasung auszutreiben. Die finale Konzentration betrug 2,2 mM. 2-HIBA und 3-HBA wurden als Lösungen zugegeben, mit Konzentrationen im Reaktionsansatz von 33 mM. Alle anderen Lösemittel wurden direkt flüssig in die Messzelle injiziert, die jeweiligen Konzentrationen in den Reaktionsansätzen können Tabelle 3-4 entnommen werden.

Die Atmungsraten wurden auf die eingesetzte Zellmenge bezogen und in µmol O₂ · L⁻¹ · s⁻¹ · OD₆₀₀⁻¹ angegeben. Die effektive Atmung ergibt sich aus der Differenz zwischen Substrat-Atmung und Ruheatmung. Die substratbezogenen Raten sind, sofern nicht anders angegeben, Mittelwerte aus jeweils drei Ansätzen.

5.11 Ruhezellen-Ansatz zur Metabolitendetektion

Auf MP (30 °C) oder LB+Glucose (250 mM, 20 °C) gewachsene Zellen wurden bei 20 °C gewaschen und in PBS zu einer OD₆₀₀ von 20 resuspendiert. Die Ansätze wurden in 22 mL Glasfläschchen mit Gummistopfen und Crimp-Verschluss durchgeführt, die 2 mL Zellsuspension enthielten. Flüssige Substrate wurden vor dem Verschließen der Fläschchen bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben, oder es wurden verschiedene Mengen gasförmiges MP durch das Septum injiziert. Ruhezellen aus der Überexpression mit Stamm BUT6 erhielten 100 mM Glucose als Elektronendonator. Die Fläschchen wurden bei 30 °C horizontal bei 100 rpm für 2–18 h inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (18.600x g, 5 min, 4 °C), der Überstand entsprechend der nachfolgenden Analysen weiterverarbeitet. Für kolorimetrische Analysen wurde der Überstand direkt verwendet, für gaschromatographische Analysen wurde mit einem 220 nm Spritzenfilter filtriert.

5.12 Protein-Isolierung

Gesamtprotein als Grundlage für Enzymkinetiken, SDS-PAGE und Peptidmassen Fingerprint wurde mittels Hochdruck-Entspannung gewonnen. Alle Arbeitsschritte erfolgten eisgekühlt. Mit PBS gewaschene Zellen aus Flüssigkultur nach 4–7 Tagen Inkubation wurden konzentriert (typischerweise 200 mL Kultur auf 4 mL PBS mit einer $OD_{600} = 20$) und in drei Passagen mit der FRENCH pressure cell press (FA-078, SLM Instruments Aminco mit HTU-180 3/8"-Zelle, G. Heinemann Ultraschall & Labortechnik) bei 137,9 MPa aufgeschlossen. Der unlösliche Anteil wurde abzentrifugiert (18.600x g, 30 min, 4 °C), der Überstand (= Zellextrakt) zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

5.13 NAD(P)/NAD(P)H-Umsatz im Zellextrakt

Die NAD(P)- bzw. NAD(P)H-Abhängigkeit von Enzymreaktionen bei Zugabe verschiedener Substrate im Zellextrakt wurde ermittelt. Der Ansatz setzte sich zusammen aus 1,8 mL PBS und 0,2 mL Zellextrakt. PBS als Arbeitsmedium wurde im Wasserbad auf 30 °C temperiert und im Falle der Untersuchung von Oxygenase-Reaktionen mit Druckluft Sauerstoff-gesättigt. Die Komponenten wurden im auf 30 °C temperierten Küvettenblock in einer Quarzküvette gemischt und 10 µL Substrat hinzugegeben (20 µL bei in Isopropylether gelöstem MP oder bei Racematen). Je 10 µL einer 50 mM NAD, NADH- oder NADP- Lösung wurden zupipettiert und die Bildung bzw. Zehrung des Reduktionsäquivalentes im Photometer bei 340 nm über die Zeit gemessen (VisionPro Version 4.10, Thermo Scientific). Die Raten wurden später auf die mittels Bradford-Test ermittelten Menge an Gesamtprotein im Ansatz bezogen. Bei Bedarf wurde 1 µL des Alkohol-Dehydrogenase-Inhibitors 4-Methylpyrazol dem Ansatz hinzugegeben.

5.14 SDS-PAGE und Färbung

Zellextrakte von Kulturen verschiedener Induktionszustände wurden im denaturierenden Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zusammensetzungen können Tabelle 5-3 entnommen werden. Die Komponenten wurden auf Eis unter Rühren gemischt, 4,5 mL des Sammelgels in die Gelkammer pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach 20 Minuten wurde das Isopropanol abgegossen, Reste mit Deionat ausgespült und mit Blotting-Papier die Wassertropfen entfernt. Der Kamm wurde eingesteckt und der Hohlraum mit Sammelgel gefüllt. Nach weiteren 20 Minuten wurde die Elektrophoresekammer mit dem Gel bestückt und die Tanks mit Tris-Glycin-Puffer gefüllt. Pro Probe wurden 30 µL Zellextrakt mit 10 µL ROTI®Load 1 (Carl Roth GmbH) gemischt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Je 30 µL der abgekühlten Proben wurden auf das Gel pipettiert, zum Größenvergleich der Banden diente je 3 µL ROTI®Mark TRICOLOR (Carl Roth GmbH) in den Außentaschen. Die

Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 50 V während der Wanderung durch das Sammelgel und mit 80 V während der Separierung im Trenngel betrieben.

Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das mit Deionat gespülte Gel mit Färbelösung überschichtet und in der Mikrowelle intervallweise aufgekocht. Weiter wurde das Gel in der Flüssigkeit 15 Minuten bei 60 rpm inkubiert, dann die Färbelösung abgenommen und das Gel erneut mit Deionat gespült. Das mit Entfärbelösung überschichtete Gel wurde über Nacht bei 60 rpm entfärbt und anschließend dokumentiert.

Tabelle 5-3 Zusammensetzung Acrylamid-Gel

Komponente	Trenngel, 10 %	Sammelgel, 5 %
dH ₂ O	2,42 mL	1,9 mL
Acrylamid-Bis 37,5:1; 40 %	1,25 mL	200 µL
Lower/Upper Tris	1,25 mL	500 µL
SDS, 10 %	50 µL	20 µL
APS, 10 %	33 µL	13 µL
TEMED	5 µL	2 µL

5.15 Peptidmassen Fingerprint

Das Peptidmassen Fingerprint (PMF) wurde an der Core Facility Hohenheim, Arbeitsgruppe Dr. Jens Pfannstiel, von Berit Würtz durchgeführt.

Der Trypsinverdau wurde nach einer modifizierten Version von Shevchenko und Kollegen durchgeführt (Shevchenko et al. 1996). Die relevanten Banden wurden aus dem Gel geschnitten, zerkleinert und bei Raumtemperatur mit Wasser (LC-MS UHPLC-Qualität), Acetonitril, 100 mM NH₄HCO₃/10 mM DTT, Acetonitril, 100 mM NH₄HCO₃/55 mM Chloracetamid, 100 mM NH₄HCO₃ und Acetonitril gewaschen. Die Proben wurden 30 Minuten lang auf Eis mit Trypsin (10 ng/µL Trypsin in 40 mM NH₄HCO₃) inkubiert und über Nacht bei 37 °C verdaut. Trifluoressigsäure (10 %) wurde hinzugefügt und der Überstand aufgefangen. Die Gelstücke wurden mit 66 % Acetonitril/1,7 % Essigsäure inkubiert und 15 Minuten bei 37 °C bebrütet. Der Überstand wurde mit dem tryptischen Verdau gepoolt und in einem SpeedVac (Thermo Fisher Scientific) getrocknet. Für die Analyse wurden die Proben in 0,1 % TFA suspendiert.

Nano-LC-ESI-MS/MS-Experimente wurden auf einem EASY-nLC 1200-System (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt, das mit einem Q Exactive HF-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt war und eine NanosprayFlex-Quelle (Thermo Fisher Scientific) verwendete. Die tryptischen Peptide wurden direkt auf eine analytische NanoEase-Säule (NanoEase M/Z HSS C18 T3, 1,8 µm, 100 Å, 75 µm x 250 mm Säule, Waters GmbH) injiziert, die bei einer konstanten Temperatur von 35 °C betrieben wurde. Die Gradientenelution erfolgte bei einer Flussrate von 250 nL/min unter Verwendung eines 30-minütigen Gradienten mit dem folgenden Profil: 2 %–55 % Lösungsmittel B in 30 min, 55 %–95 % Lösungsmittel B in 10 min, 5 min isokratisch bei 95 % Lösungsmittel B, Reequilibrierung für 10 min von 95 % auf 2 % B

und 10 min isokratisch mit 2 % B. Als Lösungsmittel wurden 0,1 % Ameisensäure (Lösungsmittel A) und 0,1 % Ameisensäure in 80 % Acetonitril (Lösungsmittel B) verwendet. Das Q Exactive HF wurde mit der XCalibur-Software (Version 4.0, Thermo Fisher Scientific Inc.) betrieben. Surveyspektren ($m/z = 200-2.000$) wurden in der Orbitrap mit einer Auflösung von 60.000 bei $m/z = 200$ erfasst. Datenabhängige MS/MS-Massenspektren wurden für die 20 häufigsten Peptidvorläufer in der Orbitrap unter Verwendung der Hochenergie-Kollisionsdissoziation (HCD) bei einer Auflösung von 15.000 mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 27 erzeugt. Die interne Kalibrierung wurde mit Lock-Mass-Ionen aus der Umgebungsluft durchgeführt, wie von Olsen und Kollegen beschrieben (Olsen et al. 2005). Mascot 2.6 (Matrix Science) wurde als Suchmaschine für die Proteinidentifizierung verwendet. Die Spektren wurden mit als FASTA-formatierten Sequenzen (Proteom von *M. gadium* IBE100, bzw. Expressionsplasmid pST-K-ibeABCDEF-eph, Abschnitt 5.21) abgeglichen. Die Suchparameter spezifizierten Trypsin, erlaubten drei verpasste Spaltungen, eine Massentoleranz von 5 ppm für Peptidvorläufer und eine Toleranz von 0,02 Da für Fragment-Ionen. Die Methioninoxidation wurde als variable Modifikation zugelassen und die Carbamidomethylierung von Cysteinresten wurde als feste Modifikation festgelegt. Die Mascot-Ergebnisse wurden in die ScaffoldTM-Software 4.10.0 (Proteome Software) übertragen und ausgewertet.

5.16 gDNA-Isolierung, Plasmid-Isolierung, Konzentrationsbestimmung

Die Isolierung genomischer DNA (gDNA) für die meisten molekularbiologischen Anwendungen erfolgte mittels Aufschlusses durch Kugelmühle und ggf. weiteren Reinigungsschritten. Eine Impföse voller Zellmaterial wurde mit 300 μL ddH₂O in ein für die Kugelmühle spezifisches Aufschluss-Vial, welches mit Silikakugeln ($d = 0,1$ mm) bis zum Übergang von Konus auf Zylinder gefüllt war, gegeben und bei 4.000 rpm für 20 s aufgeschlossen (BeadBug Homogenizer, Benchmark Scientific Inc.). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (18.600x g, 10 min, 4 °C), der Überstand zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Plasmide wurden mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Elution erfolgte mit ddH₂O.

Konzentrationsbestimmungen für DNA wurden spektrophotometrisch in einer Mikroliterküvette ($d = 0,2$ und 1 mm) durchgeführt (TrayCell, Hellma GmbH & Co. KG). Der Nullwert wurde mit ddH₂O ermittelt, die DNA-Konzentration von 4 μL Probe über die Absorption bei 260 nm ermittelt und nach Herstellerangaben die Konzentration berechnet. Die Reinheit wurde aus den Verhältnissen zwischen der Absorption bei 260 zu 230 nm (Zielwert: 1,8–2,2) und 260 zu 280 nm (Zielwert: ~1,8) erfasst.

5.17 PCR, Colony-PCR, DNA-Aufreinigung

Die Vervielfältigung von DNA erfolgte mittels Polymerase Chain Reaction (PCR). Je nach Anwendung wurden unterschiedliche Formen der Template-DNA oder Polymerasen eingesetzt. Sollten Amplifikate für die Klonierung verwendet oder nach erfolgter Klonierung die Inserts überprüft werden, so kam die Q5® High Fidelity Polymerase mit Proof-Reading Funktion (NEB) zum Einsatz. Die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze können Tabelle 5-4 entnommen werden. Primer (Tabelle 5-6) wurden mit der Software Snappgene (www.snappgene.com) entworfen und von einer Fachfirma bezogen (Microsynth AG, Schweiz). Für das Screening großer Anzahlen an Klonen wurden die gewachsenen Kolonien jeweils mit Zahnstochern aufgenommen, in 40 µL ddH₂O suspendiert und thermisch bei 103 °C für 10 min (Gramnegative) oder 10 Intervalle 103 °C/10 min – 4 °C/3 min (Grampositive) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (18.600x g, 5 min, RT) und 1 µL des Überstandes als Template verwendet.

Die Temperaturprogramme für die PCR sind in Tabelle 5-5 aufgeführt. Diese unterscheiden sich im Wesentlichen in Abhängigkeit von der eingesetzten Polymerase und den Primern sowie der Länge des zu erzeugenden Amplifikates. Die Taq-Polymerase hat eine optimale Arbeitstemperatur bei 68 °C und eine Geschwindigkeit von 1 kb/min, wohingegen die Q5® HF-Polymerase bei 72 °C eine Geschwindigkeit von 20 kb/s erzielt. Die Annealing-Temperaturen ergeben sich aus der niedrigeren Schmelztemperatur des jeweiligen Primer-Paars, im Falle der Q5® HF-Polymerase werden 3 K zugeschlagen.

DNA für die Restriktionsklonierung wurde mit dem Monarch PCR&DNA Cleanup Kit 5 µg (NEB) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit ddH₂O.

Tabelle 5-4 PCR-Ansätze

Komponente	Taq-Polymerase	Q5® HF-Polymerase
Puffer	1x	1x
MgCl ₂	2,5 mM	2,0 mM
DMSO	2 %	2 %
dNTPs, je	0,2 mM	0,2 mM
Primer, je	0,2 µM	0,5 µM
Polymerase	0,75 U/25 µL	0,5 U/25 µL
DNA	5–50 ng/25 µL	5–50 ng/25 µL

Tabelle 5-5 PCR-Programme

Schritt	Taq-Polymerase		Q5® HF-Polymerase	
	Temperatur (°C)	Zeit	Temperatur (°C)	Zeit
Initiale Denaturierung	95	4 min	98	4 min
Denaturierung	95	30 s	98	30 s
Annealing	T _m -Primer	30 s	T _m -Primer + 3 K	30 s
Elongation	68	1 min/kb	72	20 s/kb
Finale Elongation	68	4 min	72	2 min

Tabelle 5-6 Primer

Primer	Sequenz	Verwendung
27F	agagtttgatcmtggctcag	16S rRNA Genanalyse
1492R	tacggytaccttgttacgactt	
HSP3F	atcgccaaggagatcgagct	Hitzeschockprotein Genanalyse zur Taxonomie von <i>Mycobacteria</i>
HSP4R	aagggtgccgcggatcttggt	
ibe-NotI-F	aaaaaGCGGCCGCaacagcgcggatcctctctc	Klonierung der Isobuten-Monooxygenase aus IBE200
ibe-blunt-R	taggtgtggcccaatcgattc	
eph-HindIII-F	aaaaaAAGCTTcgtggacagcaaagcgatg	Klonierung der Epoxid-Hydrolase aus IBE200
eph-NotI-R	aaaaaGCGGCCGCactaagaccgatgaccagg	
pST-K-F	aatgagcacgatccgcatg	Insertkontrolle in Klonierungs-/Überexpressionsvektor
pST-K-R	gcagtcgatcgtacgctagt	
cL-R	gtcgatagccactagttgcg	
ci-F	ggaagatctggtcggcgat	
ci-R	tggcctggcgtacatgag	
cR-F	gctgctgagtcatgcgttta	

5.18 Agarose-Gelelektrophorese

Genomische DNA, PCR-Amplifikate und Plasmid-DNA wurden in horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarosekonzentration richtete sich nach der Länge der aufzutrennenden Fragmente und lag typischerweise bei 1 % für den Bereich 0,5–10 kbp. Agarose wurde in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle geschmolzen, anschließend Ethidiumbromid (finale Konzentration 0,25 µg/mL) zugegeben und in den Gießstand gegeben. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE-Puffer (0,25 µg/mL Ethidiumbromid) überschichtet. Je nach erwarteter DNA-Konzentration wurden 4–8 µL Probe mit 1–2 µL Ladepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Zum Größenvergleich der Fragmente diente die 1 kbp DNA Ladder (NEB). Die Elektrophorese wurde bei 8–10 V/cm durchgeführt, das Gel unter UV-Licht dokumentiert.

5.19 DNA- und Genomsequenzierung, Genomanalyse

Die DNA-Sequenzierung von PCR-Amplifikaten wurde von einer Fachfirma durchgeführt (Microsynth SeqLab GmbH, Göttingen). Die Probenvorbereitung erfolgte nach Angaben des Dienstleisters.

Die Genomsequenzierung sowie die dafür notwendige DNA-Isolierung wurden am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dietmar Pieper, von Israel Barrantes und Luiz Borges durchgeführt.

Die bakterielle DNA wurde aus den Isolaten mit dem FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) gemäß des Protokolls des Herstellers extrahiert. Die Qualität und Konzentration der extrahierten DNA wurden mit einem Qubit-Fluorometer überprüft. Genomische Paired-End-Bibliotheken (2x250 bp) wurden gemäß den Anweisungen des Herstellers vorbereitet (TruSeq DNA LT Sample Prep Kit, Illumina). Die Sequenzierung des gesamten Genoms wurde dann mit dem HiSeq 2500 Ultra-Hochdurchsatz-Sequenziersystem (Illumina) durchgeführt und die Ausgabe mit FastQC (Andrews 2010) visuell auf Qualität geprüft. IBE100-Reads, die

Sequenzierungsadapter aufwiesen, wurden mit BBSplit v.38.67 (Bushnell 2014) identifiziert und getrimmt. Für Stamm IBE200 wurden Sequenzierungsadapter mit Scythe aus den FASTQ-Dateien entfernt und später Basen geringer Qualität mit Sickle getrimmt (Buffalo 2011; Joshi, N., & Fass, J. 2011). Für Stamm IBE100 wurden die qualifizierten Reads durch *de novo* Assemblierung mit Unicycler (Wick et al. 2017) in PATRIC (Davis et al. 2020) assembliert. Contigs kürzer als 300 bp wurden verworfen. Die Qualität der Assemblierung wurde durch Vergleich mit dem entsprechenden vollständigen Referenzgenom mit QUAST (Gurevich et al. 2013) bewertet. Die resultierende Assemblierung wurde mit RASTtk (Brettin et al. 2015) annotiert. Für Stamm IBE200 wurden die gefilterten Sequenzen unter Verwendung von multiplen k-mers (automatische Auswahl anhand der Leselängen) mit SPAdes assembliert und in Scaffolds eingeteilt (Bankevich et al. 2012). Die so gewonnenen Contigs wurden mit Prokka (Seemann 2014) annotiert. Die neuen Genom-Sequenzen wurden bei GenBank unter dem BioProject PRJNA814055, Accession number JAKZMO000000000 (IBE100), und BioProject PRJNA590116, Accession number WNWV000000000 (IBE200), eingereicht.

In silico Analysen wurden mit dem basic local alignment tool (NCBI pblast, Non-redundant protein sequences (nr)) durchgeführt (Altschul et al. 1997).

5.20 Genexpressionsanalyse

Flüssigkulturen von jeweils 100 mL Minimalmedium wurden aus MP- und 1-Hexanol-gezüchteten Flüssigvorkulturen beimpft, mit Triton X-100 (5 µL/L) versetzt und entweder mit MP (1 Sekunde Überdruck) oder 1-Hexanol (3 mM) versetzt. Die Flüssigkulturen für die Analyse wurden in dreifacher Ausführung hergestellt. Die Zellernte wurde in eisgekühlten Kulturen, Puffern und Behältern durchgeführt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und zwei Mal mit PBS gewaschen (10.000x g, 4 °C, 10 min). Die Zellen wurden in 5 mL PBS suspendiert. Pellets wurden durch Pipettieren von Tröpfchen (~100 µL) direkt in flüssigen Stickstoff hergestellt. Der restliche flüssige Stickstoff wurde entfernt und die Zellpellets auf Trockeneis transportiert.

Die Genexpressionsanalyse sowie die dafür notwendige RNA-Isolierung wurden am Fraunhofer IGB, Arbeitsgruppe Dr. Kai Sohn, von Christian Grumaz, Yevhen Vainshtein und Karoline Glanz durchgeführt.

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden die Zellpellets mit einer Mixer Mill MM 200 (Retsch GmbH) aufgebrochen. Die Isolierung erfolgte mit dem QIAGEN RNeasy Plus Mini Kit über QiaCube (QIAGEN), gefolgt von einer Bibliotheksvorbereitung mit dem ScriptSeq Bacteria Low Input Kit (Illumina Inc.). Vor der Sequenzierung wurde die Bibliothek mit dem HS NGS Fragment Analysis Kit auf einem Fragment Analyzer (AATI Inc.) einer Qualitätskontrolle unterzogen. Die Bibliothek wurde mit einer HighSeq2500 (Illumina Inc.) im Single-End-Modus

für 65 Zyklen mit einer durchschnittlichen Sequenziertiefe von etwa 4,5 Millionen Reads pro Probe sequenziert (Tabelle 5-7).

Die rohen Illumina-Reads wurden entsprechend den bei der Bibliotheksvorbereitung eingeführten Sequenzier-Barcodes de-multiplexiert, wobei die Illumina-Software bcl2fastq v1.84 mit Standardeinstellungen für das Adapter-Trimming verwendet wurde und keine Fehlanpassung pro Sequenzier-Barcode zugelassen wurde. Die Reads jeder Probe wurden von potenzieller Adapterkontamination befreit, qualitätskontrolliert und, falls erforderlich, im Single-End-Modus mit BBDuk aus dem BBDuk v34.41 Paket (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>) getrimmt. Um den Qualitätsfilter zu bestehen, sollte die Lesequalität (Phred-Score) über 20 liegen und jeder Read nach dem Trimmen mindestens 50 bp lang sein. Die durchschnittliche Bibliotheksgröße aller biologischen Replikate und Proben nach dem qualitätsbasierten Trimming betrug 4,34 Millionen Reads pro Probe.

Darüber hinaus wurde jede Probe vor und nach dem Trimming mit dem FastQC getestet, um die Sequenzqualität pro Base, die durchschnittliche Basenzusammensetzung, den GC-Gehalt, die Sequenzlängenverteilung und die Adapterkontaminationen zu bewerten (<https://tinyurl.com/5n6r5wf7>). Nach einem qualitätsbasierten Trimming und der Entfernung von Adaptern wurde jede Probe auf das Genom von *M. paragordoniae* IBE200 abgebildet (Tabelle 5-7).

Tabelle 5-7 Sequenzierungs- und Mapping-Statistiken

Biologisches Replikat	Bibliotheksgröße	unmapped	mapped	Accession
IBE200 Methylpropan, br1	4.378.863	2,53 %	97,47 %	SRX7269212
IBE200 Methylpropan, br2	4.435.001	3,33 %	96,67 %	SRX7269213
IBE200 Methylpropan, br3	4.585.072	0,86 %	99,14 %	SRX7269214
IBE200 1-Hexanol, br1	4.567.665	3,17 %	96,83 %	SRX7269215
IBE200 1-Hexanol, br2	4.119.620	3,97 %	96,03 %	SRX7269216
IBE200 1-Hexanol, br3	3.951.317	3,25 %	96,75 %	SRX7269217

Gesamtgröße der Bibliothek – Anzahl der Reads der biologischen Replikate (br) nach qualitätsbasiertem Trimming; % mapped/unmapped – Mapping zum *Mycobacterium paragordoniae* IBE200-Referenzgenom.

Die daraus resultierenden, richtig zugeordneten Qualitäts-Reads wurden quantifiziert und die Werte für reads per kilobase per million mapped reads (RPKM) wurden mit dem RSeQC v2.3.1-Paket (Wang et al. 2012) berechnet. Die differenzielle Expressionsanalyse wurde mit dem EdgeR-Paket (Robinson et al. 2010; McCarthy et al. 2012) für drei biologische Replikate für beide Wachstumsbedingungen durchgeführt. Die RNA-Sequenzen wurden bei GenBank unter dem BioProject PRJNA590116 eingereicht. Das EdgeR-Paket verwendet ein negatives binomiales verallgemeinertes lineares Modell, um statistisch signifikante differenziell regulierte genomische Merkmale zu identifizieren. Für die weitere Analyse wurden nur Gene ausgewählt, die die folgenden Auswahlkriterien erfüllten: $|\log_{2}FC|$ (logarithm of fold change) Wert sollte über oder gleich 1 sein, während der bereinigte p -Wert (FDR) unter 0,05 liegen sollte.

5.21 Konstruktion Expressionsplasmid

Ein Expressionsplasmid zur funktionalen heterologen Überexpression der löslichen di-Eisen-Monooxygenase (SDM) *MplbeABCDEF* und Epoxid-Hydrolase *MpEPH* aus Stamm IBE200 wurde mittels Restriktionsklonierung erstellt, die dafür notwendigen Schritte mit SnapGene (www.snapgene.com) geplant. Als Grundgerüst diente pST-K (Addgene plasmid # 44560), ein *E. coli*-Mycobacteria shuttle vector für die konstitutive heterologe Expression in Mycobacteria (Parikh et al. 2013). Die codierenden Genabschnitte der jeweiligen Enzyme wurden mit Primern aus Tabelle 5-6 und einer PCR mit Q5® HF-Polymerase erzeugt. Die Amplifikate wurden mittels Kit gereinigt. Der Vektor wurde aus DH5α mittels Kit isoliert. Amplifikate und Plasmid wurden jeweils in eigenen Ansätzen verdaut (pST-K: HindIII + EcoRV, *ibeABCDEF*: NotI, *eph*: HindIII + NotI) nach Angaben des Herstellers (Double Digest Calculator, Thermo Scientific, <https://tinyurl.com/w6by6hur>) und 20 Minuten bei 80 °C denaturiert. Die erzeugten Fragmente wurden im Agarosegel auf korrekte Länge überprüft und anschließend in einem Schritt mittels T4 Ligase (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers über Nacht bei RT ligiert. Der Ligationsansatz von insgesamt 20 µL beinhaltete 75 ng Vektor-DNA, 231 ng SDM-Insert und 51 ng EPH-Insert, wobei die Inserts im 3-fachen molaren Überschuss hinzugegeben wurden. Abschließend wurde die Ligase 20 Minuten bei 65 °C denaturiert.

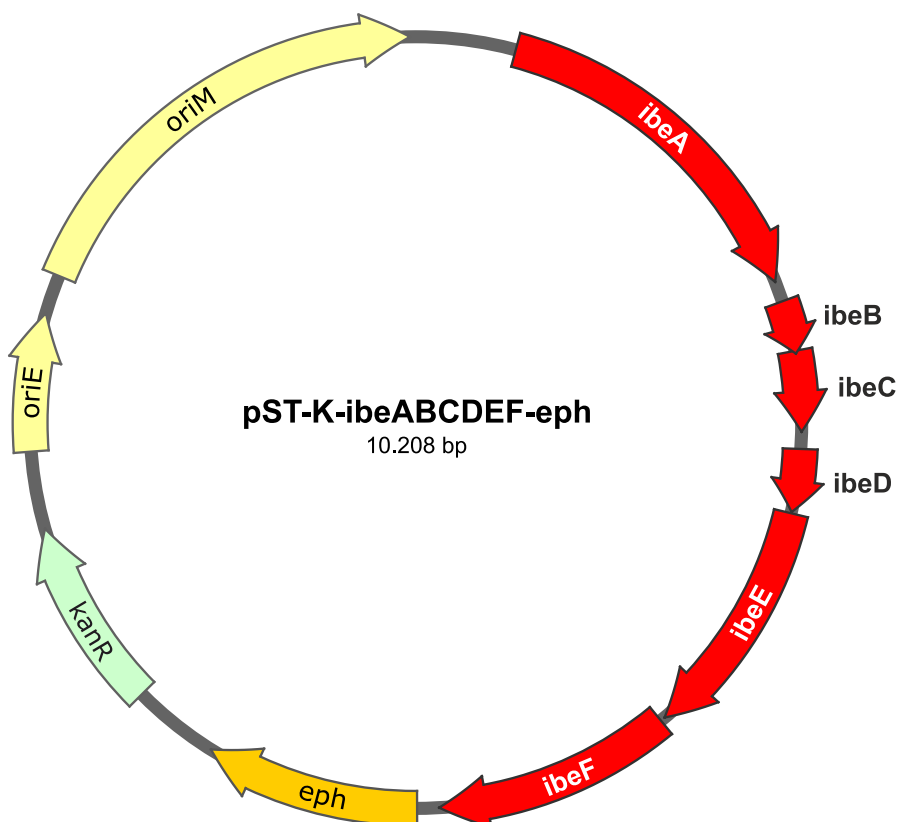


Abbildung 5-1 Plasmidkarte des Expressionsplasmides

Expressionsplasmid pST-K-ibeABCDEF-eph. kanR: Kanamycin-Resistenzmarker, oriE: *E. coli*-spezifischer origin of replication, oriM: Mycobacteria-spezifischer origin of replication, *ibeABCDEF*: SDM aus Stamm IBE200, *eph*: Epoxid-Hydrolase aus Stamm IBE200. Sequenz siehe Abschnitt 7.2.

5.22 Transformation: Heat shock, Elektroporation

Zur Vermehrung des Expressionsplasmides wurde der ligierte Ansatz per heat shock in *E. coli* DH5 α transformiert. Dazu wurden 2 μ L Ansatz in einem 2 mL Reaktionsgefäß auf Eis gestellt. Chemisch kompetente Zellen von DH5 α wurden auf Eis aufgetaut und anschließend 50 μ L Zellen mit dem Ligationsansatz vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der heat shock erfolgte bei 42 °C im Wasserbad für 30 s, danach wurde der Transformationsansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Auf RT vorgewärmte 950 μ L SOC wurden hinzugegeben und bei 37 °C bei 250 rpm für 2 h im 2 mL Reaktionsgefäß inkubiert. Je 100 μ L einer 1:10-Verdünnung des Transformationsansatzes wurden auf LB+Km-Platten ausplattiert und 48 h bei 30 °C inkubiert. Die Identifizierung der korrekten Klone erfolgte mittels Colony-PCR (Primer siehe Tabelle 5-6). Die Isolierung der Plasmide erfolgte mittels Kit, die Überprüfung der Inserts erfolgte durch Sequenzierung.

Das konstruierte Plasmid wurde per Elektroporation (MicroPulser und GenePulser II, Bio-Rad Laboratories, Inc.) in den Expressionswirt *M. fluoranthenorans* BUT6 transformiert. Elektrokompetente Zellen des Stammes wurden aus einer sich kurz vor Ende der exponentiellen Phase befindlichen, auf LB-Flüssigmedium gewachsenen Kultur gewonnen. Die Kultur wurde 1,5 h auf Eis inkubiert, die Zellen abzentrifugiert und dreimal mit 10 mL eiskaltem, 10%igem Glycerol gewaschen (3.000x g, 10 min, 4 °C). Dabei wurden 100 mL Kultur auf 1 mL reduziert und in Aliquots von 200 μ L bei –80 °C gelagert. Auf ein Aliquot elektrokompetente Zellen wurden 5 μ L Plasmid gegeben und in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (2 mm) gemischt. Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation auf Eis, die Elektroporation bei 2,5 kV und eine erneute 10-minütige Inkubation auf Eis. Es wurde 800 μ L auf RT vorgewärmtes SOC hinzugegeben und bei 30 °C bei 250 rpm für 3 h im 2 mL Reaktionsgefäß inkubiert. Je 100 μ L unverdünnter Transformationsansatz wurden auf LB+Km-Platten ausplattiert und 96 h bei 30 °C inkubiert. Die Identifizierung der korrekten Klone erfolgte mittels Colony-PCR (Primer siehe Tabelle 5-6).

5.23 Sequenzalignment

Sequenzalignments zweier Sequenzen wurden mit dem Smith-Waterman- (Smith und Waterman 1981), solche mit mehr als zwei Sequenzen mit dem Clustal Omega-Algorithmus berechnet (Sievers et al. 2011), jeweils mit den Standardeinstellungen. Zum Einsatz kam dafür die Software SnapGene (www.snapgene.com) oder MEGA X (Kumar et al. 2018). Für die Darstellung von Sequenzalignments wurde die Software Jalview Version 2.11.2.6 genutzt (Waterhouse et al. 2009).

5.24 Darstellung von Verwandtschaftsverhältnissen

Evolutionäre Analysen wurden in MEGA X (Kumar et al. 2018) durchgeführt. Die Evolutionsgeschichte wurde mithilfe der Neighbor-Joining-Methode (Saitou und Nei 1987) abgeleitet. Die phylogenetischen Bäume sind maßstabsgetreu gezeichnet, wobei die Zweiglängen in denselben Einheiten wie die evolutionären Abstände angegeben sind, die zur Ableitung des phylogenetischen Baums verwendet wurden. Im Falle des phylogenetischen 16S rRNA-Baums wurden die evolutionären Abstände mit der Maximum Composite Likelihood-Methode (Tamura et al. 2004) berechnet und sind in der Einheit der Anzahl der Basensubstitutionen pro Stelle angegeben. Im Falle des Peptidsequenzvergleichs wurden die evolutionären Abstände mit der Poisson-Korrekturmethode (Zuckerlandl und Pauling 1965) berechnet und sind in der Einheit der Anzahl der Aminosäuresubstitutionen pro Stelle angegeben. Alle mehrdeutigen Positionen wurden für jedes Sequenzpaar entfernt (Option „paarweise Deletion“).

5.25 Erstellung von Homologiemodellen, Visualisierung und Berechnungen

Homologiemodelle von Proteinen wurden mit SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org>) oder I-Tasser (<https://seq2fun.dcmf.med.umich.edu/I-TASSER/>) erstellt. Substrattunnel wurden mit CaverWeb v1.2 (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/caverweb/>) berechnet. Die Startparameter hierfür sind in Tabelle 5-8 aufgeführt.

Tabelle 5-8 Parameter für die Berechnung von Substrattunnel

Parameter	Wert	Parameter	Wert
desired_radius	5	probe_radius	0,9
exclude_residue_names	null	max_distance	3
shell_radius	3	compute_tunnel_residues	ja
shell_depth	4	visualization_tunnel_sampling_step	0,5
clustering_threshold	3,5	seed	1

PyMOL kam bei der Visualisierung von Tertiär-, Quartärstrukturen und Substrattunnel zum Einsatz (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4 Schrödinger, LLC). Zur Berechnung der Volumina der aktiven Zentren wurde das PyMOL plugin PyVOL verwendet (Smith et al. 2019).

5.26 Verwendete Software zur Bilderstellung und -bearbeitung

Für die Darstellung von Genclustern und Plasmiden wurde die Software SnapGene (www.snapgene.com) verwendet. Strukturformeln von Molekülen und Reaktionsgleichungen wurden mit ChemDraw Professional Version 16.0.0.82 (PerkinElmer Informatics) erstellt. Die CoreIDRAW Graphics Suite X5 (Corel Corporation) und Inkscape (www.inkscape.org) wurden zur Bildbearbeitung genutzt.

6 Literaturverzeichnis

Acheson, Justin F.; Bailey, Lucas J.; Brunold, Thomas C.; Fox, Brian G. (2017): In-crystal reaction cycle of a toluene-bound diiron hydroxylase. In: *Nature* 544 (7649), S. 191–195. DOI: 10.1038/nature21681.

Acheson, Justin F.; Bailey, Lucas J.; Elsen, Nathaniel L.; Fox, Brian G. (2014): Structural basis for biomolecular recognition in overlapping binding sites in a diiron enzyme system. In: *Nature communications* 5, S. 5009. DOI: 10.1038/ncomms6009.

Acheson, Justin F.; Moseson, Hannah; Fox, Brian G. (2015): Structure of T4moF, the Toluene 4-Monooxygenase Ferredoxin Oxidoreductase. In: *Biochemistry* 54 (38), S. 5980–5988. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00692.

Allen, J. R.; Clark, D. D.; Krum, J. G.; Ensign, S. A. (1999): A role for coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid) in a bacterial pathway of aliphatic epoxide carboxylation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (15), S. 8432–8437. DOI: 10.1073/pnas.96.15.8432.

Allen, J. R.; Ensign, S. A. (1997): Characterization of three protein components required for functional reconstitution of the epoxide carboxylase multienzyme complex from *Xanthobacter* strain Py2. In: *Journal of bacteriology* 179 (10), S. 3110–3115. DOI: 10.1128/jb.179.10.3110-3115.1997.

Allen, J. R.; Ensign, S. A. (1998): Identification and characterization of epoxide carboxylase activity in cell extracts of *Nocardia corallina* B276. In: *Journal of bacteriology* 180 (8), S. 2072–2078. DOI: 10.1128/JB.180.8.2072-2078.1998.

Allocati, Nerino; Federici, Luca; Masulli, Michele; Di Ilio, Carmine (2009): Glutathione transferases in bacteria. In: *The FEBS journal* 276 (1), S. 58–75. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06743.x.

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. In: *Nucleic acids research* 25 (17), S. 3389–3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389.

Alvarez, Laura Acuña; Exton, Daniel A.; Timmis, Kenneth N.; Suggett, David J.; McGenity, Terry J. (2009): Characterization of marine isoprene-degrading communities. In: *Environmental microbiology* 11 (12), S. 3280–3291. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02069.x.

Andrews, Simon (2010): FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Software]. Retrieved from <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

- Aoki, Hirobumi; Kimura, Toshiaki; Habe, Hiroshi; Yamane, Hisakazu; Kodama, Tohru; Omori, Toshio (1996): Cloning, nucleotide sequence, and characterization of the genes encoding enzymes involved in the degradation of cumene to 2-hydroxy-6-oxo-7-methylocta-2,4-dienoic acid in *Pseudomonas fluorescens* IP01. In: *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81 (3), S. 187–196. DOI: 10.1016/0922-338X(96)82207-0.
- Arand, Michael; Cronin, Annette; Oesch, Franz; Mowbray, Sherry L.; Jones, T. Alwyn (2003a): The telltale structures of epoxide hydrolases. In: *Drug metabolism reviews* 35 (4), S. 365–383. DOI: 10.1081/DMR-120026498.
- Arand, Michael; Hallberg, B. Martin; Zou, Jinyu; Bergfors, Terese; Oesch, Franz; van der Werf, Mariët J. et al. (2003b): Structure of *Rhodococcus erythropolis* limonene-1,2-epoxide hydrolase reveals a novel active site. In: *The EMBO journal* 22 (11), S. 2583–2592. DOI: 10.1093/emboj/cdg275.
- Bahl, Christopher D.; Hvorecny, Kelli L.; Morisseau, Christophe; Gerber, Scott A.; Madden, Dean R. (2016): Visualizing the Mechanism of Epoxide Hydrolysis by the Bacterial Virulence Enzyme Cif. In: *Biochemistry* 55 (5), S. 788–797. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01229.
- Bailey, Lucas J.; Elsen, Nathaniel L.; Pierce, Brad S.; Fox, Brian G. (2008a): Soluble expression and purification of the oxidoreductase component of toluene 4-monooxygenase. In: *Protein expression and purification* 57 (1), S. 9–16. DOI: 10.1016/j.pep.2007.09.007.
- Bailey, Lucas J.; McCoy, Jason G.; Phillips, George N.; Fox, Brian G. (2008b): Structural consequences of effector protein complex formation in a diiron hydroxylase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (49), S. 19194–19198. DOI: 10.1073/pnas.0807948105.
- Bankevich, Anton; Nurk, Sergey; Antipov, Dmitry; Gurevich, Alexey A.; Dvorkin, Mikhail; Kulikov, Alexander S. et al. (2012): SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. In: *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology* 19 (5), S. 455–477. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Bannerjee, D.; Sanders, L. E.; Sokatch, J. R. (1970): Properties of purified methylmalonate semialdehyde dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *J. Biol. Chem.* 245 (7), S. 1828–1835.
- Batt, Sarah M.; Minnikin, David E.; Besra, Gurdyal S. (2020): The thick waxy coat of *Mycobacteria*, a protective layer against antibiotics and the host's immune system. In: *The Biochemical journal* 477 (10), S. 1983–2006. DOI: 10.1042/BCJ20200194.

Berekaa, M. M.; Steinbüchel, A. (2000): Microbial degradation of the multiply branched alkane 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane (Squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisonense*. In: *Applied and environmental microbiology* 66 (10), S. 4462–4467. DOI: 10.1128/AEM.66.10.4462-4467.2000.

Bertoni, G.; Bolognese, F.; Galli, E.; Barbieri, P. (1996): Cloning of the genes for and characterization of the early stages of toluene and o-xylene catabolism in *Pseudomonas stutzeri* OX1. In: *Applied and environmental microbiology* 62 (10), S. 3704–3711. DOI: 10.1128/aem.62.10.3704-3711.1996.

Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie (Hg.) (1997): Toxikologische Bewertungen. 2-Methylpropen (104).

Bhalla, Gurpreet S.; Sarao, Manbeer S.; Kalra, Dinesh; Bandyopadhyay, Kuntal; John, Arun Ravi (2018): Methods of phenotypic identification of non-tuberculous *Mycobacteria*. In: *Practical Laboratory Medicine* 12, e00107. DOI: 10.1016/j.plabm.2018.e00107.

Brambilla, Cecilia; Llorens-Fons, Marta; Julián, Esther; Noguera-Ortega, Estela; Tomàs-Martínez, Cristina; Pérez-Trujillo, Miriam et al. (2016): *Mycobacteria* clumping increase their capacity to damage macrophages. In: *Frontiers in microbiology* 7, S. 1562. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01562.

Brendelberger, Günther; Rétey, János; Ashworth, Doreen M.; Reynolds, Kevin; Willenbrock, Frances; Robinson, John A. (1988): The enzymic interconversion of isobutyryl and *n*-butyrylcarba(dethia)-coenzyme A: A coenzyme B12 -dependent carbon skeleton rearrangement. In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (8), S. 1089–1090. DOI: 10.1002/anie.198810891.

Brettin, Thomas; Davis, James J.; Disz, Terry; Edwards, Robert A.; Gerdes, Svetlana; Olsen, Gary J. et al. (2015): RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. In: *Scientific reports* 5, S. 8365. DOI: 10.1038/srep08365.

Broberg, Christopher A.; Clark, Daniel D. (2010): Shotgun proteomics of *Xanthobacter autotrophicus* Py2 reveals proteins specific to growth on propylene. In: *Archives of microbiology* 192 (11), S. 945–957. DOI: 10.1007/s00203-010-0623-3.

Buffalo, V. (2011): Scythe [Software]. Retrieved from <https://github.com/vsbuffalo/scythe>.

Bushnell, Brian (2014): BBMap: a fast, accurate, splice-aware aligner. Lawrence Berkeley National Lab (LBNL), Berkeley, CA (United States).

Cafaro, Valeria; Scognamiglio, Roberta; Viggiani, Ambra; Izzo, Viviana; Passaro, Irene; Notomista, Eugenio et al. (2002): Expression and purification of the recombinant subunits of toluene/o-xylene monooxygenase and reconstitution of the active complex. In: *European journal of biochemistry* 269 (22), S. 5689–5699. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.03281.x.

Champreda, Verawat; Zhou, Ning-Yi; Leak, David J. (2004): Heterologous expression of alkene monooxygenase components from *Xanthobacter autotrophicus* Py2 and reconstitution of the active complex. In: *FEMS microbiology letters* 239 (2), S. 309–318. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.09.002.

Cheung, Samantha; McCarl, Victoria; Holmes, Andrew J.; Coleman, Nicholas V.; Rutledge, Peter J. (2013): Substrate range and enantioselectivity of epoxidation reactions mediated by the ethene-oxidising *Mycobacterium* strain NBB4. In: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (3), S. 1131–1140. DOI: 10.1007/s00253-012-3975-6.

Chuang, Adina S.; Mattes, Timothy E. (2007): Identification of polypeptides expressed in response to vinyl chloride, ethene, and epoxyethane in *Nocardioides* sp. strain JS614 by using peptide mass fingerprinting. In: *Applied and environmental microbiology* 73 (13), S. 4368–4372. DOI: 10.1128/AEM.00086-07.

Colby, J.; Stirling, D. I.; Dalton, H. (1977): The soluble methane mono-oxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). Its ability to oxygenate *n*-alkanes, *n*-alkenes, ethers, and alicyclic, aromatic and heterocyclic compounds. In: *The Biochemical journal* 165 (2), S. 395–402. DOI: 10.1042/bj1650395.

Coleman, Nicholas V.; Bui, Nga B.; Holmes, Andrew J. (2006): Soluble di-iron monooxygenase gene diversity in soils, sediments and ethene enrichments. In: *Environmental microbiology* 8 (7), S. 1228–1239. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2006.01015.x.

Coleman, Nicholas V.; Mattes, Timothy E.; Gossett, James M.; Spain, Jim C. (2002): Phylogenetic and kinetic diversity of aerobic vinyl chloride-assimilating bacteria from contaminated sites. In: *Applied and environmental microbiology* 68 (12), S. 6162–6171. DOI: 10.1128/AEM.68.12.6162–6171.2002.

Coleman, Nicholas V.; Spain, Jim C. (2003a): Distribution of the coenzyme M pathway of epoxide metabolism among ethene- and vinyl chloride-degrading *Mycobacterium* strains. In: *Applied and environmental microbiology* 69 (10), S. 6041–6046. DOI: 10.1128/AEM.69.10.6041–6046.2003.

Coleman, Nicholas V.; Spain, Jim C. (2003b): Epoxyalkane:coenzyme M transferase in the ethene and vinyl chloride biodegradation pathways of *Mycobacterium* strain JS60. In: *Journal of bacteriology* 185 (18), S. 5536–5545. DOI: 10.1128/JB.185.18.5536–5545.2003.

- Coleman, Nicholas V.; Yau, Sheree; Wilson, Neil L.; Nolan, Laura M.; Migocki, Margaret D.; Ly, Mai-Anh et al. (2011): Untangling the multiple monooxygenases of *Mycobacterium chubuense* strain NBB4, a versatile hydrocarbon degrader. In: *Environmental microbiology reports* 3 (3), S. 297–307. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2010.00225.x.
- Coschigano, P. W.; Häggblom, M. M.; Young, L. Y. (1994): Metabolism of both 4-chlorobenzoate and toluene under denitrifying conditions by a constructed bacterial strain. In: *Applied and environmental microbiology* 60 (3), S. 989–995. DOI: 10.1128/aem.60.3.989-995.1994.
- Cox, F. R.; Slack, C. E.; Cox, M. E.; Pruden, E. L.; Martin, J. R. (1978): Rapid Tween 80 hydrolysis test for *Mycobacteria*. In: *Journal of clinical microbiology* 7 (1), S. 104–105. DOI: 10.1128/jcm.7.1.104-105.1978.
- Cracan, Valentin; Banerjee, Ruma (2012): Novel coenzyme B12-dependent interconversion of isovaleryl-CoA and pivalyl-CoA. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (6), S. 3723–3732. DOI: 10.1074/jbc.M111.320051.
- Cracan, Valentin; Padovani, Dominique; Banerjee, Ruma (2010): IcmF is a fusion between the radical B12 enzyme isobutyryl-CoA mutase and its G-protein chaperone. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (1), S. 655–666. DOI: 10.1074/jbc.M109.062182.
- Crombie, Andrew T.; Emery, Helen; McGenity, Terry J.; Murrell, J. Colin (2017): Draft genome sequences of three terrestrial isoprene-degrading *Rhodococcus* strains. In: *Genome announcements* 5 (45). DOI: 10.1128/genomeA.01256-17.
- Crombie, Andrew T.; Khawand, Myriam El; Rhodius, Virgil A.; Fengler, Kevin A.; Miller, Michael C.; Whited, Gregg M. et al. (2015): Regulation of plasmid-encoded isoprene metabolism in *Rhodococcus*, a representative of an important link in the global isoprene cycle. In: *Environmental microbiology* 17 (9), S. 3314–3329. DOI: 10.1111/1462-2920.12793.
- Davis, James J.; Wattam, Alice R.; Aziz, Ramy K.; Brettin, Thomas; Butler, Ralph; Butler, Rory M. et al. (2020): The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. In: *Nucleic acids research* 48 (D1), D606–D612. DOI: 10.1093/nar/gkz943.
- Dawson, Robin A.; Rix, Gregory D.; Crombie, Andrew T.; Murrell, J. Colin (2022): ,Omics-guided prediction of the pathway for metabolism of isoprene by *Variovorax* sp. WS11. In: *Environmental microbiology* 24 (11), S. 5151–5164. DOI: 10.1111/1462-2920.16149.
- Dayem, Linda C.; Carney, John R.; Santi, Daniel V.; Pfeifer, Blaine A.; Khosla, Chaitan; Kealey, James T. (2002): Metabolic engineering of a methylmalonyl-CoA mutase-epimerase pathway for complex polyketide biosynthesis in *Escherichia coli*. In: *Biochemistry* 41 (16), S. 5193–5201. DOI: 10.1021/bi015593k.

de Bont, J.; van Dijken, J.; van Ginkel, K. (1982): The metabolism of 1,2-propanediol by the propylene oxide utilizing bacterium *Nocardia* A60. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 714 (3), S. 465–470. DOI: 10.1016/0304-4165(82)90155-6.

Dobslaw, Daniel; Schöller, Julia; Krivak, Dominik; Helbich, Steffen; Engesser, Karl-Heinrich (2019): Performance of different biological waste air purification processes in treatment of a waste gas mix containing *tert*-butyl alcohol and acetone: A comparative study. In: *Chemical Engineering Journal* 355, S. 572–585. DOI: 10.1016/j.cej.2018.08.140.

TRBA 466, August 2015: Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen.

Elsen, Nathaniel L.; Moe, Luke A.; McMartin, Lea A.; Fox, Brian G. (2007): Redox and functional analysis of the Rieske ferredoxin component of the toluene 4-monooxygenase. In: *Biochemistry* 46 (4), S. 976–986. DOI: 10.1021/bi0616145.

Ensign, S. A. (1996): Aliphatic and chlorinated alkenes and epoxides as inducers of alkene monooxygenase and epoxidase activities in *Xanthobacter* strain Py2. In: *Applied and environmental microbiology* 62 (1), S. 61–66.

Ensign, S. A. (2001): Microbial metabolism of aliphatic alkenes. In: *Biochemistry* 40 (20), S. 5845–5853. DOI: 10.1021/bi015523d.

Epstein, Joseph Williams; Rosenthal, Robert W.; Ess, Richard J. (1955): Use of *p*-(4-Nitrobenzyl)pyridine as Analytical Reagent for Ethylenimines and Alkylating Agents. In: *Analytical chemistry* 27, S. 1435–1439.

Erb, Tobias J.; Rétey, Janos; Fuchs, Georg; Alber, Birgit E. (2008): Ethylmalonyl-CoA mutase from *Rhodobacter sphaeroides* defines a new subclade of coenzyme B12-dependent acyl-CoA mutases. In: *J. Biol. Chem.* 283 (47), S. 32283–32293. DOI: 10.1074/jbc.M805527200.

Escobedo-Hinojosa, Wendy; Hammer, Stephan C.; Wissner, Julian L.; Hauer, Bernhard (2021): Fast and easy synthesis of the non-commercially available standard isobutyl monophosphate (ammonium salt). In: *MethodsX* 8, S. 101455. DOI: 10.1016/j.mex.2021.101455.

Fang, Huan; Kang, Jie; Zhang, Dawei (2017): Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. In: *Microbial cell factories* 16 (1), S. 15. DOI: 10.1186/s12934-017-0631-y.

Farhan Ul Haque, Muhammad; Hernández, Marcela; Crombie, Andrew T.; Murrell, J. Colin (2022): Identification of active gaseous-alkane degraders at natural gas seeps. In: *The ISME journal* 16 (7), S. 1705–1716. DOI: 10.1038/s41396-022-01211-0.

- Ferreira, Nicolas Lopes; Labbé, Diane; Monot, Frédéric; Fayolle-Guichard, Françoise; Greer, Charles W. (2006): Genes involved in the methyl *tert*-butyl ether (MTBE) metabolic pathway of *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. In: *Microbiology (Reading, England)* 152 (Pt 5), S. 1361–1374. DOI: 10.1099/mic.0.28585-0.
- François, Alan; Mathis, Hugues; Godefroy, Davy; Piveteau, Pascal; Fayolle, Françoise; Monot, Frédéric (2002): Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. In: *Applied and environmental microbiology* 68 (6), S. 2754–2762. DOI: 10.1128/AEM.68.6.2754–2762.2002.
- Frank, Jeremy A.; Reich, Claudia I.; Sharma, Shobha; Weisbaum, Jon S.; Wilson, Brenda A.; Olsen, Gary J. (2008): Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. In: *Applied and environmental microbiology* 74 (8), S. 2461–2470. DOI: 10.1128/AEM.02272-07.
- Frey, Jasmin; Kaßner, Sophie; Schink, Bernhard (2021a): Two marine *Desulfotomaculum* spp. of different origin are capable of utilizing acetone and higher ketones. In: *Current microbiology* 78 (5), S. 1763–1770. DOI: 10.1007/s00284-021-02441-9.
- Frey, Jasmin; Kaßner, Sophie; Spitteller, Dieter; Mergelsberg, Mario; Boll, Matthias; Schleheck, David; Schink, Bernhard (2021b): Activation of short-chain ketones and isopropanol in sulfate-reducing bacteria. In: *BMC microbiology* 21 (1), S. 50. DOI: 10.1186/s12866-021-02112-6.
- Frey, Jasmin; Schneider, Fabian; Huhn, Thomas; Spitteller, Dieter; Schink, Bernhard; Schleheck, David (2018): Two enzymes of the acetone degradation pathway of *Desulfococcus biacutus*: coenzyme B12 -dependent 2-hydroxyisobutyryl-CoA mutase and 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase. In: *Environmental microbiology reports* 10 (3), S. 283–292. DOI: 10.1111/1758-2229.12637.
- Fujii, T.; Ogawa, T.; Fukuda, H. (1988): Preparation of a cell-free, isobutene-forming system from *Rhodotorula minuta*. In: *Applied and environmental microbiology* 54 (2), S. 583–584. DOI: 10.1128/aem.54.2.583-584.1988.
- Fukuda, Hideo; Fujii, Takao; Ogawa, Takahira (1984): Microbial production of C3- and C4-hydrocarbons under aerobic conditions. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 48 (6), S. 1679–1682. DOI: 10.1271/bbb1961.48.1679.
- Fukuda, Hideo; Fujii, Takao; Ogawa, Takahira (1985): Production of isobutene by *Rhodotorula* yeasts. In: *Agricultural and Biological Chemistry* 49 (5), S. 1541–1543. DOI: 10.1271/bbb1961.49.1541.
- Furuhashi, Keizo; Taoka, Akira; Uchida, Seiichi; Karube, Isao; Suzuki, Shuichi (1981): Production of 1,2-epoxyalkanes from 1-alkenes by *Nocardia corallina* B-276. In: *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12 (1), S. 39–45. DOI: 10.1007/BF00508117.

- Furuya, Toshiki; Hayashi, Mika; Semba, Hisashi; Kino, Kuniki (2013): The mycobacterial binuclear iron monooxygenases require a specific chaperonin-like protein for functional expression in a heterologous host. In: *The FEBS journal* 280 (3), S. 817–826. DOI: 10.1111/febs.12070.
- Geilen, Frank M.A.; Stochniol, Guido; Peitz, Stephan; Schulte-Koerne, Ekkehard (2000): Butenes. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Hg.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, S. 1–13.
- Gogerty, David S.; Bobik, Thomas A. (2010): Formation of isobutene from 3-hydroxy-3-methylbutyrate by diphosphomevalonate decarboxylase. In: *Applied and environmental microbiology* 76 (24), S. 8004–8010. DOI: 10.1128/AEM.01917-10.
- Gonzalez, C. F.; Taber, W. A.; Zeitoun, M. A. (1972): Biodegradation of ethylene glycol by a salt-requiring bacterium. In: *Applied microbiology* 24 (6), S. 911–919. DOI: 10.1128/am.24.6.911-919.1972.
- Guenther, A. B.; Jiang, X.; Heald, C. L.; Sakulyanontvittaya, T.; Duhl, T.; Emmons, L. K.; Wang, X. (2012): The model of emissions of gases and aerosols from nature version 2.1 (MEGAN2.1): an extended and updated framework for modeling biogenic emissions. In: *Geosci. Model Dev.* 5 (6), S. 1471–1492. DOI: 10.5194/gmd-5-1471-2012.
- Gurevich, Alexey; Saveliev, Vladislav; Vyahhi, Nikolay; Tesler, Glenn (2013): QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 29 (8), S. 1072–1075. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086.
- Hanson, J. R.; Ackerman, C. E.; Scow, K. M. (1999): Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a bacterial pure culture. In: *Applied and environmental microbiology* 65 (11), S. 4788–4792. DOI: 10.1128/aem.65.11.4788-4792.1999.
- Heine, Thomas; Zimmerling, Juliane; Ballmann, Anne; Kleeberg, Sebastian Bruno; Rückert, Christian; Busche, Tobias et al. (2018): On the enigma of glutathione-dependent styrene degradation in *Gordonia rubripertincta* CWB2. In: *Applied and environmental microbiology* 84 (9). DOI: 10.1128/AEM.00154-18.
- Heitkamp, M. A.; Cerniglia, C. E. (1988): Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. In: *Applied and environmental microbiology* 54 (6), S. 1612–1614. DOI: 10.1128/aem.54.6.1612-1614.1988.
- Helbich, Steffen (2011): Der biologische Butanabbau. Diplomarbeit. Universität Stuttgart, Stuttgart. Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft.

- Helbich, Steffen; Barrantes, Israel; Dos Anjos Borges, Luiz Gustavo; Pieper, Dietmar H.; Vainshtein, Yevhen; Sohn, Kai; Engesser, Karl-Heinrich (2023): The 2-methylpropene degradation pathway in *Mycobacteriaceae* family strains. In: *Environmental microbiology*. DOI: 10.1111/1462-2920.16449.
- Hodgkin, D. M.C.; Kamper, J.; Lindsey, J.; MacKay, M.; Pickworth, J.; Robertson, J. H. et al. (1957): The structure of vitamin B₁₂. I. An outline of the crystallographic investigation of vitamin B₁₂. In: *Proc. R. Soc. Lond. A* 242 (1229), S. 228–263. DOI: 10.1098/rspa.1957.0174.
- Holmes, Andrew J.; Coleman, Nicholas V. (2008): Evolutionary ecology and multidisciplinary approaches to prospecting for monooxygenases as biocatalysts. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 94 (1), S. 75–84. DOI: 10.1007/s10482-008-9227-1.
- Horinouchi, M.; Kasuga, K.; Nojiri, H.; Yamane, H.; Omori, T. (1997): Cloning and characterization of genes encoding an enzyme which oxidizes dimethyl sulfide in *Acinetobacter* sp. strain 20B. In: *FEMS microbiology letters* 155 (1), S. 99–105. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12692.x.
- Horswill, A. R.; Escalante-Semerena, J. C. (1999): *Salmonella typhimurium* LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle. In: *Journal of bacteriology* 181 (18), S. 5615–5623. DOI: 10.1128/JB.181.18.5615-5623.1999.
- Hou, C. T.; Patel, R.; Laskin, A. I.; Barnabe, N.; Barist, I. (1983): Epoxidation of short-chain alkenes by resting-cell suspensions of propane-grown bacteria. In: *Applied and environmental microbiology* 46 (1), S. 171–177. DOI: 10.1128/aem.46.1.171-177.1983.
- Hristova, Krassimira R.; Schmidt, Radomir; Chakicherla, Anu Y.; Legler, Tina C.; Wu, Janice; Chain, Patrick S. et al. (2007): Comparative transcriptome analysis of *Methylibium petroleiphilum* PM1 exposed to the fuel oxygenates methyl *tert*-butyl ether and ethanol. In: *Applied and environmental microbiology* 73 (22), S. 7347–7357. DOI: 10.1128/AEM.01604-07.
- Hua, Yun Hao; Wu, Chih Yuan; Sargsyan, Karen; Lim, Carmay (2014): Sequence-motif detection of NAD(P)-binding proteins: discovery of a unique antibacterial drug target. In: *Scientific reports* 4, S. 6471. DOI: 10.1038/srep06471.
- Johnson, Erika L.; Smith, Christy A.; O'Reilly, Kirk T.; Hyman, Michael R. (2004): Induction of methyl tertiary butyl ether (MTBE)-oxidizing activity in *Mycobacterium vaccae* JOB5 by MTBE. In: *Applied and environmental microbiology* 70 (2), S. 1023–1030. DOI: 10.1128/AEM.70.2.1023–1030.2004.
- Johnston, Antonia; Crombie, Andrew T.; El Khawand, Myriam; Sims, Leanne; Whited, Gregg M.; McGenity, Terry J.; Colin Murrell, J. (2017): Identification and characterisation of isoprene-degrading bacteria in an estuarine environment. In: *Environmental microbiology* 19 (9), S. 3526–3537. DOI: 10.1111/1462-2920.13842.

- Joshi, N., & Fass, J. (2011): Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files [Software]. Retrieved from <https://github.com/najoshi/sickle>.
- Kim, Byoung-Jun; Hong, Seok-Hyun; Kook, Yoon-Hoh; Kim, Bum-Joon (2014): *Mycobacterium paragordoniae* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species closely related to *Mycobacterium gordonae*. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64 (Pt 1), S. 39–45. DOI: 10.1099/ijs.0.051540-0.
- Kim, Hong; Kim, Sun-Hyun; Shim, Tae-Sun; Kim, Mi-na; Bai, Gill-Han; Park, Young-Gil et al. (2005a): Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55 (Pt 4), S. 1649–1656. DOI: 10.1099/ijs.0.63553-0.
- Kim, Sunghwan; Chen, Jie; Cheng, Tiejun; Gindulyte, Asta; He, Jia; He, Siqian et al. (2023): PubChem 2023 update. In: *Nucleic acids research* 51 (D1), D1373-D1380. DOI: 10.1093/nar/gkac956.
- Kim, Yong-Hak; Engesser, Karl-H; Cerniglia, Carl E. (2005b): Numerical and genetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacteria*. In: *Microbial ecology* 50 (1), S. 110–119. DOI: 10.1007/s00248-004-0126-3.
- Kitanishi, Kenichi; Cracan, Valentin; Banerjee, Ruma (2015): Engineered and native coenzyme B12-dependent isovaleryl-CoA/pivalyl-CoA mutase. In: *J. Biol. Chem.* 290 (33), S. 20466–20476. DOI: 10.1074/jbc.M115.646299.
- Klijn, N.; Herrewegh, A. A.; Jong, P. de (2001): Heat inactivation data for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: implications for interpretation. In: *Journal of applied microbiology* 91 (4), S. 697–704. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01416.x.
- Kottegoda, Samantha; Waligora, Elizabeth; Hyman, Michael (2015): Metabolism of 2-methylpropene (isobutylene) by the aerobic bacterium *Mycobacterium* sp. strain ELW1. In: *Applied and environmental microbiology* 81 (6), S. 1966–1976. DOI: 10.1128/AEM.03103-14.
- Krishnakumar, Arathi M.; Sliwa, Darius; Endrizzi, James A.; Boyd, Eric S.; Ensign, Scott A.; Peters, John W. (2008): Getting a handle on the role of coenzyme M in alkene metabolism. In: *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 72 (3), S. 445–456. DOI: 10.1128/MMBR.00005-08.
- Krum, J. G.; Ensign, S. A. (2001): Evidence that a linear megaplasmid encodes enzymes of aliphatic alkene and epoxide metabolism and coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonate) biosynthesis in *Xanthobacter* strain Py2. In: *Journal of bacteriology* 183 (7), S. 2172–2177. DOI: 10.1128/JB.183.7.2172–2177.2001.

- Kumar, Sudhir; Stecher, Glen; Li, Michael; Knyaz, Christina; Tamura, Koichiro (2018): MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. In: *Molecular biology and evolution* 35 (6), S. 1547–1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
- Kurteva-Yaneva, Nadya; Zahn, Michael; Weichler, M-Teresa; Starke, Robert; Harms, Hauke; Müller, Roland H. et al. (2015): Structural basis of the stereospecificity of bacterial B12-dependent 2-hydroxyisobutyryl-CoA mutase. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (15), S. 9727–9737. DOI: 10.1074/jbc.M115.645689.
- Larke-Mejía, Nasmille L.; Crombie, Andrew T.; Pratscher, Jennifer; McGenity, Terry J.; Murrell, J. Colin (2019): Novel isoprene-degrading proteobacteria from soil and leaves identified by cultivation and metagenomics analysis of stable isotope probing experiments. In: *Frontiers in microbiology* 10, S. 2700. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02700.
- Leahy, Joseph G.; Batchelor, Patricia J.; Morcomb, Suzanne M. (2003): Evolution of the soluble diiron monooxygenases. In: *FEMS Microbiol Rev* 27 (4), S. 449–479. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00023-8.
- Linos, A.; Berekaa, M. M.; Reichelt, R.; Keller, U.; Schmitt, J.; Flemming, H. C. et al. (2000): Biodegradation of cis-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. In: *Applied and environmental microbiology* 66 (4), S. 1639–1645. DOI: 10.1128/AEM.66.4.1639-1645.2000.
- Lopes Ferreira, Nicolas; Mathis, Hugues; Labbé, Diane; Monot, Frédéric; Greer, Charles W.; Fayolle-Guichard, Françoise (2007): *n*-Alkane assimilation and *tert*-butyl alcohol (TBA) oxidation capacity in *Mycobacterium austroafricanum* strains. In: *Applied microbiology and biotechnology* 75 (4), S. 909–919. DOI: 10.1007/s00253-007-0892-1.
- Marsh, E. Neil G.; Meléndez, Gabriel D. Román (2012): Adenosylcobalamin enzymes: theory and experiment begin to converge. In: *Biochimica et biophysica acta* 1824 (11), S. 1154–1164. DOI: 10.1016/j.bbapap.2012.03.012.
- Massey, L. K.; Sokatch, J. R.; Conrad, R. S. (1976): Branched-chain amino acid catabolism in bacteria. In: *Bacteriological reviews* 40 (1), S. 42–54. DOI: 10.1128/br.40.1.42-54.1976.
- Mattes, Timothy E.; Coleman, Nicholas V.; Spain, Jim C.; Gossett, James M. (2005): Physiological and molecular genetic analyses of vinyl chloride and ethene biodegradation in *Nocardioides* sp. strain JS614. In: *Archives of microbiology* 183 (2), S. 95–106. DOI: 10.1007/s00203-004-0749-2.
- McCarl, Victoria; Somerville, Mark V.; Ly, Mai-Anh; Henry, Rebecca; Liew, Elissa F.; Wilson, Neil L. et al. (2018): Heterologous expression of *Mycobacterium* alkene monooxygenases in Gram-positive and Gram-negative bacterial hosts. In: *Applied and environmental microbiology* 84 (15). DOI: 10.1128/AEM.00397-18.

- McCarthy, Davis J.; Chen, Yunshun; Smyth, Gordon K. (2012): Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. In: *Nucleic acids research* 40 (10), S. 4288–4297. DOI: 10.1093/nar/gks042.
- McClay, K.; Fox, B. G.; Steffan, R. J. (2000): Toluene monooxygenase-catalyzed epoxidation of alkenes. In: *Applied and environmental microbiology* 66 (5), S. 1877–1882. DOI: 10.1128/AEM.66.5.1877-1882.2000.
- McClay, Kevin; Boss, Corinne; Keresztes, Ivan; Steffan, Robert J. (2005): Mutations of toluene-4-monooxygenase that alter regiospecificity of indole oxidation and lead to production of novel indigoid pigments. In: *Applied and environmental microbiology* 71 (9), S. 5476–5483. DOI: 10.1128/AEM.71.9.5476-5483.2005.
- McGenity, Terry J.; Crombie, Andrew T.; Murrell, J. Colin (2018): Microbial cycling of isoprene, the most abundantly produced biological volatile organic compound on Earth. In: *The ISME journal* 12 (4), S. 931–941. DOI: 10.1038/s41396-018-0072-6.
- Meier-Kolthoff, Jan P.; Göker, Markus (2019): TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. In: *Nature communications* 10 (1), S. 2182. DOI: 10.1038/s41467-019-10210-3.
- Mermoud, N.; Harayama, S.; Timmis, K. N. (1986): New route to bacterial production of indigo. In: *Nat Biotechnol* 4 (4), S. 321–324. DOI: 10.1038/nbt0486-321.
- Nakamura, T.; Nagasawa, T.; Yu, F.; Watanabe, I.; Yamada, H. (1992): Resolution and some properties of enzymes involved in enantioselective transformation of 1,3-dichloro-2-propanol to α -3-chloro-1,2-propanediol by *Corynebacterium* sp. strain N-1074. In: *Journal of bacteriology* 174 (23), S. 7613–7619. DOI: 10.1128/JB.174.23.7613-7619.1992.
- Namba, Y.; Yoshizawa, K.; Ejima, A.; Hayashi, T.; Kaneda, T. (1969): Coenzyme A- and nicotinamide adenine dinucleotide-dependent branched chain α -keto acid dehydrogenase. In: *J. Biol. Chem.* 244 (16), S. 4437–4447. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)94337-1.
- Nardini, Marco; Ridder, Ivo S.; Rozeboom, Henriëtte J.; Kalk, Kor H.; Rink, Rick; Janssen, Dick B.; Dijkstra, Bauke W. (1999): The X-ray structure of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. In: *J. Biol. Chem.* 274 (21), S. 14579–14586. DOI: 10.1074/jbc.274.21.14579.
- Nordlund, P.; Eklund, H. (1995): Di-iron-carboxylate proteins. In: *Current opinion in structural biology* 5 (6), S. 758–766. DOI: 10.1016/0959-440X(95)80008-5.
- Norton, J. E.; Sokatch, J. R. (1970): Purification and partial characterization of the branched chain amino acid transaminase of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Biochimica et biophysica acta* 206 (2), S. 261–269. DOI: 10.1016/0005-2744(70)90109-9.

- Notomista, Eugenio; Lahm, Armin; Di Donato, Alberto; Tramontano, Anna (2003): Evolution of bacterial and archaeal multicomponent monooxygenases. In: *Journal of molecular evolution* 56 (4), S. 435–445. DOI: 10.1007/s00239-002-2414-1.
- Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S. M. et al. (1992): The alpha/beta hydrolase fold. In: *Protein engineering* 5 (3), S. 197–211. DOI: 10.1093/protein/5.3.197.
- Olsen, Jesper V.; Godoy, Lyris M. F. de; Li, Guoqing; Macek, Boris; Mortensen, Peter; Pesch, Reinhold et al. (2005): Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. In: *Molecular & cellular proteomics: MCP* 4 (12), S. 2010–2021. DOI: 10.1074/mcp.T500030-MCP200.
- Onaca, Christina; Kieninger, Martin; Engesser, Karl-H; Altenbuchner, Josef (2007): Degradation of alkyl methyl ketones by *Pseudomonas veronii* MEK700. In: *Journal of bacteriology* 189 (10), S. 3759–3767. DOI: 10.1128/JB.01279-06.
- Ono, Mitsufumi; Okura, Ichiro (1990): On the reaction mechanism of alkene epoxidation with *Methylosinus trichosporium* (OB3b). In: *Journal of Molecular Catalysis* 61 (1), S. 113–122. DOI: 10.1016/0304-5102(90)85199-R.
- Ooyama, J.; Foster, J. W. (1965): Bacterial oxidation of cycloparaffinic hydrocarbons. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 31, S. 45–65. DOI: 10.1007/BF02045875.
- Owens, Carmen R.; Karceski, Julie K.; Mattes, Timothy E. (2009): Gaseous alkene biotransformation and enantioselective epoxyalkane formation by *Nocardioides* sp. strain JS614. In: *Applied microbiology and biotechnology* 84 (4), S. 685–692. DOI: 10.1007/s00253-009-2019-3.
- Pacifico, F.; Harrison, S. P.; Jones, C. D.; Sitch, S. (2009): Isoprene emissions and climate. In: *Atmospheric Environment* 43 (39), S. 6121–6135. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2009.09.002.
- Padovani, Dominique; Banerjee, Ruma (2006): Assembly and protection of the radical enzyme, methylmalonyl-CoA mutase, by its chaperone. In: *Biochemistry* 45 (30), S. 9300–9306. DOI: 10.1021/bi0604532.
- Parikh, Amit; Kumar, Devanand; Chawla, Yogesh; Kurthkoti, Krishna; Khan, Shazia; Varshney, Umesh; Nandicoori, Vinay K. (2013): Development of a new generation of vectors for gene expression, gene replacement, and protein-protein interaction studies in *Mycobacteria*. In: *Applied and environmental microbiology* 79 (5), S. 1718–1729. DOI: 10.1128/AEM.03695-12.

- Patel, R. N.; Hou, C. T.; Laskin, A. I.; Felix, A. (1982): Microbial oxidation of hydrocarbons: properties of a soluble methane monooxygenase from a facultative methane-utilizing organism, *Methylobacterium* sp. strain CRL-26. In: *Applied and environmental microbiology* 44 (5), S. 1130–1137. DOI: 10.1128/aem.44.5.1130-1137.1982.
- Pikus, J. D.; Studts, J. M.; Achim, C.; Kauffmann, K. E.; Münck, E.; Steffan, R. J. et al. (1996): Recombinant toluene-4-monooxygenase: catalytic and Mössbauer studies of the purified diiron and rieske components of a four-protein complex. In: *Biochemistry* 35 (28), S. 9106–9119. DOI: 10.1021/bi960456m.
- Piveteau, P.; Fayolle, F.; Vandecasteele, J. P.; Monot, F. (2001): Biodegradation of *tert*-butyl alcohol and related xenobiotics by a methylotrophic bacterial isolate. In: *Applied microbiology and biotechnology* 55 (3), S. 369–373. DOI: 10.1007/s002530000545.
- Robinson, Mark D.; McCarthy, Davis J.; Smyth, Gordon K. (2010): edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (1), S. 139–140. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp616.
- Rohwerder, Thore; Breuer, Uta; Benndorf, Dirk; Lechner, Ute; Müller, Roland H. (2006): The alkyl *tert*-butyl ether intermediate 2-hydroxyisobutyrate is degraded via a novel cobalamin-dependent mutase pathway. In: *Applied and environmental microbiology* 72 (6), S. 4128–4135. DOI: 10.1128/AEM.00080-06.
- Rohwerder, Thore; Rohde, Maria-Teresa; Jehmlich, Nico; Purswani, Jessica (2020): Actinobacterial degradation of 2-hydroxyisobutyric acid proceeds via acetone and formyl-CoA by employing a thiamine-dependent lyase reaction. In: *Frontiers in microbiology* 11, S. 691. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00691.
- Rojo, Fernando (2009): Degradation of alkanes by bacteria. In: *Environmental microbiology* 11 (10), S. 2477–2490. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x.
- Saeki, Hisashi; Akira, Miura; Furuhashi, Keizo; Averhoff, Beate; Gottschalk, Gerhard (1999): Degradation of trichloroethene by a linear-plasmid-encoded alkene monooxygenase in *Rhodococcus corallinus* (*Nocardia corallina*) B-276. In: *Microbiology (Reading, England)* 145 (Pt 7), S. 1721–1730. DOI: 10.1099/13500872-145-7-1721.
- Saitou, N.; Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. In: *Molecular biology and evolution* 4 (4), S. 406–425. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sander, R. (2015): Compilation of Henry's law constants (version 4.0) for water as solvent. In: *Atmos. Chem. Phys.* 15 (8), S. 4399–4981. DOI: 10.5194/acp-15-4399-2015.

- Sazinsky, Matthew H.; Bard, Joel; Di Donato, Alberto; Lippard, Stephen J. (2004): Crystal structure of the toluene/o-xylene monooxygenase hydroxylase from *Pseudomonas stutzeri* OX1. Insight into the substrate specificity, substrate channeling, and active site tuning of multicomponent monooxygenases. In: *J. Biol. Chem.* 279 (29), S. 30600–30610. DOI: 10.1074/jbc.M400710200.
- Schäfer, F.; Breuer, U.; Benndorf, D.; Bergen, M. von; Harms, H.; Müller, R. H. (2007): Growth of *Aquicola tertiarycarbonis* L108 on *tert*-butyl alcohol leads to the induction of a phthalate dioxygenase-related protein and its associated oxidoreductase subunit. In: *Eng. Life Sci.* 7 (5), S. 512–519. DOI: 10.1002/elsc.200700011.
- Schuster, Judith; Schäfer, Franziska; Hübler, Nora; Brandt, Anne; Rosell, Mònica; Härtig, Claus et al. (2012): Bacterial degradation of *tert*-amyl alcohol proceeds via hemiterpene 2-methyl-3-buten-2-ol by employing the tertiary alcohol desaturase function of the Rieske nonheme mononuclear iron oxygenase MdpJ. In: *Journal of bacteriology* 194 (5), S. 972–981. DOI: 10.1128/JB.06384-11.
- Seemann, Torsten (2014): Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (14), S. 2068–2069. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153.
- Seo, Jong-Su; Keum, Young-Soo; Harada, Renee M.; Li, Qing X. (2007): Isolation and characterization of bacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organophosphorus pesticides from PAH-contaminated soil in Hilo, Hawaii. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 55 (14), S. 5383–5389. DOI: 10.1021/jf0637630.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. (1996): Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. In: *Analytical chemistry* 68 (5), S. 850–858. DOI: 10.1021/ac950914h.
- Sievers, Fabian; Wilm, Andreas; Dineen, David; Gibson, Toby J.; Karplus, Kevin; Li, Weizhong et al. (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. In: *Molecular systems biology* 7, S. 539. DOI: 10.1038/msb.2011.75.
- Sims, Leanne P.; Lockwood, Colin W. J.; Crombie, Andrew T.; Bradley, Justin M.; Le Brun, Nick E.; Murrell, J. Colin (2022): Purification and characterization of the isoprene monooxygenase from *Rhodococcus* sp. strain AD45. In: *Applied and environmental microbiology* 88 (7), e0002922. DOI: 10.1128/aem.00029-22.
- Small, F. J.; Ensign, S. A. (1997): Alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2. Purification and characterization of a four-component system central to the bacterial metabolism of aliphatic alkenes. In: *J. Biol. Chem.* 272 (40), S. 24913–24920. DOI: 10.1074/jbc.272.40.24913.

Smith, Ryan H.B.; Dar, Arvin C.; Schlessinger, Avner (2019): PyVOL: a PyMOL plugin for visualization, comparison, and volume calculation of drug-binding sites.

Smith, T. F.; Waterman, M. S. (1981): Identification of common molecular subsequences. In: *Journal of molecular biology* 147 (1), S. 195–197. DOI: 10.1016/0022-2836(81)90087-5.

Smith, T. J.; Lloyd, J. S.; Gallagher, S. C.; Fosdike, W. L.; Murrell, J. C.; Dalton, H. (1999): Heterologous expression of alkene monooxygenase from *Rhodococcus rhodochrous* B-276. In: *European journal of biochemistry* 260 (2), S. 446–452. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00179.x.

Solano-Serena, F.; Marchal, R.; Casarégola, S.; Vasnier, C.; Lebeault, J. M.; Vandecasteele, J. P. (2000): A *Mycobacterium* strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. In: *Applied and environmental microbiology* 66 (6), S. 2392–2399. DOI: 10.1128/AEM.66.6.2392-2399.2000.

Song, Jack Jia Xin; Oguma, Kumiko; Takizawa, Satoshi (2023): Inactivation kinetics of 280 nm UV-LEDs against *Mycobacterium abscessus* in water. In: *Scientific reports* 13 (1), S. 2186. DOI: 10.1038/s41598-023-29338-w.

Spiess, Tilmann; Desiere, Frank; Fischer, Peter; Spain, Jim C.; Knackmuss, Hans-Joachim; Lenke, Hiltrud (1998): A new 4-nitrotoluene degradation pathway in a *Mycobacterium* strain. In: *Applied and environmental microbiology* 64 (2), S. 446–452. DOI: 10.1128/AEM.64.2.446-452.1998.

Steffan, R. J.; McClay, K.; Vainberg, S.; Condee, C. W.; Zhang, D. (1997): Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether, and *tert*-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. In: *Applied and environmental microbiology* 63 (11), S. 4216–4222. DOI: 10.1128/aem.63.11.4216-4222.1997.

Steffan, Robert J.; Vainberg, S.; Condee, Ch; McClay, K.; Hatzinger, P. (2000): Biotreatment of MTBE with a new bacterial isolate. In: Second International Conference on Remediation of Chlorinated and Racalcitrant Compounds, S. 165–173.

Stojanovski, Gorjan; Dobrijevic, Dragana; Hailes, Helen C.; Ward, John M. (2020): Identification and catalytic properties of new epoxide hydrolases from the genomic data of soil bacteria. In: *Enzyme and microbial technology* 139, S. 109592. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2020.109592.

Sutherland, T. D.; Horne, I.; Harcourt, R. L.; Russell, R. J.; Oakeshott, J. G. (2002): Isolation and characterization of a *Mycobacterium* strain that metabolizes the insecticide endosulfan. In: *Journal of applied microbiology* 93 (3), S. 380–389. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01728.x.

- Takami, Wako; Yoshida, Takako; Nojiri, Hideaki; Yamane, Hisakazu; Omori, Toshio (1999): Oxidation of chlorinated olefins by *Escherichia coli* transformed with dimethyl sulfide monooxygenase genes or cumene dioxygenase genes. In: *The Journal of general and applied microbiology* 45 (2), S. 69–75. DOI: 10.2323/jgam.45.69.
- Tamura, Koichiro; Nei, Masatoshi; Kumar, Sudhir (2004): Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (30), S. 11030–11035. DOI: 10.1073/pnas.0404206101.
- Taylor, Anne E.; Arp, Daniel J.; Bottomley, Peter J.; Semprini, Lewis (2010): Extending the alkene substrate range of vinyl chloride utilizing *Nocardioides* sp. strain JS614 with ethene oxide. In: *Applied microbiology and biotechnology* 87 (6), S. 2293–2302. DOI: 10.1007/s00253-010-2719-8.
- Todd, Jonathan D.; Curson, Andrew R. J.; Nikolaidou-Katsaraidou, Nefeli; Brearley, Charles A.; Watmough, Nicholas J.; Chan, Yohan et al. (2010): Molecular dissection of bacterial acrylate catabolism—unexpected links with dimethylsulfoniopropionate catabolism and dimethyl sulfide production. In: *Environmental microbiology* 12 (2), S. 327–343. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02071.x.
- US 11,124,806 B2: Methods for producing isobutene from 3-methylcrotonic acid. Angemeldet durch Mathieu Allard, Maria Anissimova, Philippe Marlière. Veröffentlichungsnr: US 11,124,806 B2.
- Uttarotai, Toungporn; Sutheworapong, Sawanee; Crombie, Andrew T.; Murrell, J. Colin; Mhuantong, Wuttichai; Noirungsee, Nuttapol et al. (2022): Genome characterisation of an isoprene-degrading *Alcaligenes* sp. isolated from a tropical restored forest. In: *Biology* 11 (4). DOI: 10.3390/biology11040519.
- van den Wijngaard, A. J.; Janssen, D. B.; Witholt, B. (1989): Degradation of epichlorohydrin and halohydrins by bacterial cultures isolated from freshwater sediment. In: *Microbiology (Reading, England)* 135 (8), S. 2199–2208. DOI: 10.1099/00221287-135-8-2199.
- van der Werf, M. J.; Overkamp, K. M.; Bont, J. A. de (1998): Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases. In: *Journal of bacteriology* 180 (19), S. 5052–5057. DOI: 10.1128/jb.180.19.5052-5057.1998.
- van der Werf, M. J.; Swarts, H. J.; Bont, J. A. de (1999): *Rhodococcus erythropolis* DCL14 contains a novel degradation pathway for limonene. In: *Applied and environmental microbiology* 65 (5), S. 2092–2102.

- van Ginkel, C. G.; Bont, J. A. M. de (1986): Isolation and characterization of alkene-utilizing *Xanthobacter* spp. In: *Archives of microbiology* 145 (4), S. 403–407. DOI: 10.1007/BF00470879.
- van Hylckama Vlieg, J. E.; Leemhuis, H.; Spelberg, J. H.; Janssen, D. B. (2000): Characterization of the gene cluster involved in isoprene metabolism in *Rhodococcus* sp. strain AD45. In: *Journal of bacteriology* 182 (7), S. 1956–1963. DOI: 10.1128/jb.182.7.1956-1963.2000.
- van Hylckama Vlieg, Johan E. T.; Kingma, Jaap; Kruizinga, Wim; Janssen, Dick B. (1999): Purification of a glutathione S-transferase and a glutathione conjugate-specific dehydrogenase involved in isoprene metabolism in *Rhodococcus* sp. strain AD45. In: *Journal of bacteriology* 181 (7), S. 2094–2101.
- van Hylckama Vlieg, Johan E. T.; Kingma, Jaap; van den Wijngaard, Arjan J.; Janssen, Dick B. (1998): A glutathione S-transferase with activity towards cis-1,2-dichloroepoxyethane is involved in isoprene utilization by *Rhodococcus* sp. strain AD45. In: *Applied and environmental microbiology* 64 (8), S. 2800–2805. DOI: 10.1128/AEM.64.8.2800-2805.1998.
- van Leeuwen, Bianca N. M.; van der Wulp, Albertus M.; Duijnste, Isabelle; van Maris, Antonius J. A.; Straathof, Adrie J. J. (2012): Fermentative production of isobutene. In: *Applied microbiology and biotechnology* 93 (4), S. 1377–1387. DOI: 10.1007/s00253-011-3853-7.
- van Loo, Bert; Kingma, Jaap; Arand, Michael; Wubbolts, Marcel G.; Janssen, Dick B. (2006): Diversity and biocatalytic potential of epoxide hydrolases identified by genome analysis. In: *Applied and environmental microbiology* 72 (4), S. 2905–2917. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2905-2917.2006.
- Vanderberg, L. A.; Perry, J. J.; Unkefer, P. J. (1995): Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. In: *Applied microbiology and biotechnology* 43 (5), S. 937–945. DOI: 10.1007/BF02431931.
- Verce, Matthew F.; Ulrich, Ricky L.; Freedman, David L. (2000): Characterization of an isolate that uses vinyl chloride as a growth substrate under aerobic conditions. In: *Applied and environmental microbiology* 66 (8), S. 3535–3542.
- Völker, Anne; Kirschner, Anett; Bornscheuer, Uwe T.; Altenbuchner, Josef (2008): Functional expression, purification, and characterization of the recombinant Baeyer-Villiger monooxygenase MekA from *Pseudomonas veronii* MEK700. In: *Applied microbiology and biotechnology* 77 (6), S. 1251–1260. DOI: 10.1007/s00253-007-1264-6.

- Wackett, L. P.; Brusseau, G. A.; Householder, S. R.; Hanson, R. S. (1989): Survey of microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. In: *Applied and environmental microbiology* 55 (11), S. 2960–2964. DOI: 10.1128/aem.55.11.2960-2964.1989.
- Wang, Liguang; Wang, Shengqin; Li, Wei (2012): RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 28 (16), S. 2184–2185. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts356.
- Watanabe, Fumiaki; Yu, Fujio; Ohtaki, Akashi; Yamanaka, Yasuaki; Noguchi, Keiichi; Yohda, Masafumi; Odaka, Masafumi (2015): Crystal structures of halohydrin hydrogen-halide-lyases from *Corynebacterium* sp. N-1074. In: *Proteins* 83 (12), S. 2230–2239. DOI: 10.1002/prot.24938.
- Waterhouse, Andrew M.; Procter, James B.; Martin, David M. A.; Clamp, Michèle; Barton, Geoffrey J. (2009): Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 25 (9), S. 1189–1191. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp033.
- Weichler, Maria-Teresa; Kurteva-Yaneva, Nadya; Przybylski, Denise; Schuster, Judith; Müller, Roland H.; Harms, Hauke; Rohwerder, Thore (2015): Thermophilic coenzyme B12-dependent acyl coenzyme A (CoA) mutase from *Kyrpidia tusciae* DSM 2912 preferentially catalyzes isomerization of (S)-3-hydroxybutyryl-CoA and 2-hydroxyisobutyryl-CoA. In: *Applied and environmental microbiology* 81 (14), S. 4564–4572. DOI: 10.1128/AEM.00716-15.
- Weisburg, W. G.; Barns, S. M.; Pelletier, D. A.; Lane, D. J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. In: *Journal of bacteriology* 173 (2), S. 697–703. DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- Wick, Ryan R.; Judd, Louise M.; Gorrie, Claire L.; Holt, Kathryn E. (2017): Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. In: *PLoS computational biology* 13 (6), e1005595. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
- World Health Organization (2022): Global tuberculosis report 2022: World Health Organization.
- Yaneva, Nadya; Schuster, Judith; Schäfer, Franziska; Lede, Vera; Przybylski, Denise; Pappoth, Torsten et al. (2012): Bacterial acyl-CoA mutase specifically catalyzes coenzyme B12-dependent isomerization of 2-hydroxyisobutyryl-CoA and (S)-3-hydroxybutyryl-CoA. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (19), S. 15502–15511. DOI: 10.1074/jbc.M111.314690.
- Yen, K. M.; Karl, M. R. (1992): Identification of a new gene, *tmoF*, in the *Pseudomonas mendocina* KR1 gene cluster encoding toluene-4-monooxygenase. In: *Journal of bacteriology* 174 (22), S. 7253–7261. DOI: 10.1128/jb.174.22.7253-7261.1992.

Literaturverzeichnis

Yoshida, Hiromi; Kojima, Katsuhiko; Shiota, Masaki; Yoshimatsu, Keiichi; Yamazaki, Tomohiko; Ferri, Stefano et al. (2019): X-ray structure of the direct electron transfer-type FAD glucose dehydrogenase catalytic subunit complexed with a hitchhiker protein. In: *Acta crystallographica. Section D, Structural biology* 75 (Pt 9), S. 841–851. DOI: 10.1107/S2059798319010878.

Zahn, Michael; König, Gerhard; Pham, Huy Viet Cuong; Seroka, Barbara; Lazny, Ryszard; Yang, Guangli et al. (2022): Mechanistic details of the actinobacterial lyase-catalyzed degradation reaction of 2-hydroxyisobutyryl-CoA. In: *J. Biol. Chem.* 298 (1), S. 101522. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101522.

Zahn, Michael; Kurteva-Yaneva, Nadya; Schuster, Judith; Krug, Ulrike; Georgi, Tina; Müller, Roland H. et al. (2019): Structures of 2-hydroxyisobutyric acid-CoA ligase reveal determinants of substrate specificity and describe a multi-conformational catalytic cycle. In: *Journal of molecular biology* 431 (15), S. 2747–2761. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.05.027.

Zhou, Ning-Yi; Jenkins, Alister; Chan Kwo Chion, Chan K. N.; Leak, David J. (1999): The alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2 is closely related to aromatic monooxygenases and catalyzes aromatic monohydroxylation of benzene, toluene, and phenol. In: *Applied and environmental microbiology* 65 (4), S. 1589–1595.

Zuckerlandl, Emile; Pauling, Linus (1965): Evolutionary divergence and convergence in proteins. In: Bryson V., Vogel H. J. (Hg.): *Evolving Genes and Proteins*: Elsevier, S. 97–166.

7 Anhang

7.1 Accession numbers der Isolate

Tabelle 7-1 Accession numbers der Isolate

Stamm	GenBank assembly	BioSample ID	WGS	BioProject
IBE100	GCA_029675005.1	SAMN26536104	JAKZMO000000000	PRJNA814055
IBE200	GCA_009733755.1	SAMN13318592	WNWV000000000	PRJNA590116

7.2 Ausgewählte Nukleotid-Sequenzen

>16S rRNA *Mycolicibacterium gadium* IBE100 1.528 nt MNO81_29630

```

1  ttttgtttgg agagtttgat tctggctcag gacgaacgct ggcggcgtgc ttaacacatg
61  caagtcgaac ggaaaggccc tttcgggggt actcagagtgg cgaacgggtg agtaacacgt
121 ggggtgatctg ccctgcactt tgggataagc ctgggaaact ggttctaata ccgatagga
181 ctacgcgatg catgtcgtgt ggtggaaagc ttttgcggtg tgggatgggc ccgcggccta
241 tcagcttggt ggtgggggtga tggcctacca aggcgacgac gggtagccgg cctgagaggg
301 tgaccggcca cactgggact gagatacggc ccagactcct acgggaggca gcagtgggga
361 atattgcaca atgggcgcaa gcctgatgca gcgacgccgc gtgagggatg acggccttcg
421 ggttgtaaac ctctttcagt gccgacgaag cgcaagtgac ggtaggcata gaagaaggac
481 cggccaacta cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggg ccgagcgttg tccggaatta
541 ctgggcgtaa agagctcgta ggtggtttgt cgcgttgttc gtgaaaactc acagctcaac
601 tgtgggctg cgggcgatac gggcagactt gagtactgca ggggagactg gaattcctgg
661 tgtagcgggt gaatgcgagc atatcaggag gaacaccggt ggcgaaggcg ggtctctggg
721 cagtaactga cgctgaggag cgaaagcgtg gggagcgaac aggattagat accctggtag
781 tccacgccgt aaacggtggg tactaggtgt gggtttcctt ccttgggatc cgtgccgtag
841 ctaacgcatt aagtacccc cctggggagt acggccgcaa ggctaaaact caaagaaatt
901 gacggggggc cgcacaagcg gcggagcatg tggattaatt cgatgcaacg cgaagaacct
961 tacctgggtt tgacatgcac aggacgccgg cagagatgtc ggttcccttg tggcctgtgt
1021 gcagggtggg catggctgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac
1081 gagcgcaacc cttgtctcat gttgccagcg ggtaatgccg gggactcgtg agagactgcc
1141 ggggtcaact cggaggaagg tggggatgac gtcaagtcat catgcccctt atgtccaggg
1201 cttcacacat gctacaatgg ccggtacaaa gggctgcgat gccgtgaggt ggagcgaatc
1261 ctttcaaagc cggctctcagt tcggatcggg gtctgcaact cgaccccgtg aagtcggagt
1321 cgctagtaat cgcagatcag caacgctcgc gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc
1381 gcccgtcacg tcatgaaagt cggtaacacc cgaagccggt ggcctaacc cttgtgggag
1441 ggagccgtcg aaggtgggat cggcgattgg gacgaagtcg taacaaggta gccgtaccgg
1501 aaggtgcggc tggatcacct cttttcta

```

>16S rRNA *Mycobacterium paragordoniae* IBE200 1.527 nt GKP29_RS26675

```

1  aaaggaggtg atccagccgc accttcgggt acggctacct tgttacgact tCGTCCCAAT
61  cgccgatccc accttcgaca gctccctccc aaagggttag gccactggct tCGGGTGTTA
121 ccgactttca tgacgtgacg ggcggtgtgt acaaggcccg ggaacgtatt caccgcagcg
181 ttgctgatct gcgattacta gcgactccga cttcacgggg tcgagttgca gaccccgatc
241 cgaactgaga ccggctttaa aaggattcgc ttaacctcgc ggcacgcag ccctttgtac
301 cggccattgt agcatgtgtg aagccctgga cataaggggc atgatgactt gacgtcatcc
361 ccaccttctt ccgagttgac ccggcagtc tctcacgagt cccggcatt acccgctggc
421 aacatgagac aagggttgcg ctcgttgcgg gacttaacc aacatctcac gacacgagct
481 gacgacagcc atgcaccacc tgcacacagg ccacaaggga accgacatct ctgccggcgt
541 cctgtgcatg tcaaaccag gtaaggttct tgcggttgca tcgaattaat ccacatgctc
601 cgccgcttgt gcgggccccc gtcaatttct ttgagtttta gccttgccggc cgtactcccc
661 aggcggggta cttaatgctg tagctacggc acggatccca aggaaggaaa cccacaccta
721 gtaccaccg tttacggcgt ggactaccag ggtatctaat cctgttcgct cccacgctt
781 tcgctcctca gcgtcagtta ctgcccagag acccgcttc gccaccggtg ttctcctga
841 tatctgcgca ttccaccgct acaccaggaa ttccagtctc cctgcagta ctcaagtctg
901 cccgtatcgc ccgcacgctc acagttaagc cgtgagattt cacgaacaac gcgacaacc
961 acctacgagc tctttacgcc cagtaattcc ggacaacgct cgcaccctac gtattaccgc
1021 ggctgctggc acgtagttgg ccggtgcttc ttctccacct accgtcaatc cgagaaaacc

```

Anhang

```
1081 cgaaccttcg tcatggtga aagaggttta caaccgaag gccgtcatcc cccacgcggc
1141 gtcgctgcat caggctttcg cccattgtgc aatattcccc actgctgcct cccgtaggag
1201 tctgggcccgt atctcagtec cagtgtggcc ggacaccctc tcaggccggc taccgctcgt
1261 cgccttggtg ggccatcacc ccaccaacaa gctgataggc cgcgggcccc tcccacaccg
1321 caaaagcttt ccaccacagg acatgtgttc tgtggtccta ttcggtatta gaccagttt
1381 cccaggctta tcccgatgtg cagggcagat taccacgctg ttactcaccg gttcgcact
1441 cgtgtacccc gaagggcctt accgttcgac ttgcatgtgt taagcacgcc gccagcgttc
1501 gtcttgagcc agaatcaaac tctccaa
```

>16S rRNA *Mycobacterium fluoranthenivorans* BUT6 (partial) 1.252 nt

```
1 ggtgatctgc cctgcacttt gggataagcc tgggaaactg ggtctaatac cgaatatgac
61 cgcattcttc atgggggtgtg gtggaaagct tttgcgggtg gggatgggcc cgcggcctat
121 cagcttggtg gtggggtaat ggocctacaa ggcgacgacg ggtagccggc ctgagagggt
181 gaccggccac actgggactg agatacggcc cagactccta cgggaggcag cagtggggaa
241 tattgcacaa tgggcgcaag cctgatgcag cgcgcccggc tgagggatga cggccttcgg
301 gttgtaaacc tctttcagca cagacgaagc gcaagtgcag gtatgtgcag aagaaggacc
361 ggccaactac gtgccagcag ccgcggtaat acgtagggtc cgagcgttgt ccggaattac
421 tgggcgtaaa gagctcgtag gtggtttgtc gcgttggttc tgaaaactca cagcttaact
481 gtgggcgtgc gggcgatacg ggcagacttg agtactgcag gggagactgg aattcctggt
541 gtagcgggtg aatgvcgaga tatcaggagg aacaccggtg gcgaaggcgg gtctctgggc
601 agtaactgac gctgaggagc gaaagcgtgg ggagcgaaca ggattagata ccctggtagt
661 ccacgcctga aacgggtgggt actagggtgtg ggtttccttc ctgggatcc gtgccgtagc
721 taacgcatta agtaccgccg ctggggagta cggccgcaag gctaaaactc aaagaaattg
781 acggggggcc gcacaagcgg cggagcatgt ggattaattc gatgcaacgc gaagaacctt
841 acctgggttt gacatgcaca ggacgccagt agagatattg gttcccttgt ggcctgtgtg
901 caggtggtgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg
961 agcgcacacc ttgtcctatg ttgccagcgg gttatgccgg ggaactcgtg gagactgccg
1021 gggatcaact ggaggaagggt ggggatgacg tcaagtcatc atgccctta tgtccagggc
1081 ttcacacatg ctacaatggc cggtaaaaag ggctgcgatg ccgtgagggt gagcgaatcc
1141 ttgtaaagcc ggtctcagtt cggatcgggg tctgcaactc gaccccgatg agtcggagtc
1201 gctagtaatc gcagatcagc aacgctgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gt
```

>hsp65 IBE100 (partial) 604 nt MNO81_27715

```
1 gaccaccagg gtggaaaggg cctcgcctc gacatcctcg gcgatgatca gcagcggcctt
61 gccggactgg atgaccttct ccagcagcgg cagcagatcc ttgaccgtcg acaccttca
121 cgacacgagc aggatgtagg gatcctcgag gaccgcttcc tgacgctcgg cgtcggtagc
181 gaagtaacct gagatgtagc cctgtgcgaa gcgcatgcc tcggtgagct ccagctgcag
241 gccgaagggt ttggactcct cgcggtgat gacaccctcg ttgccgacct tgtccatggc
301 ctggcgatc agctcgcgca tctggacgtc accggcggag atggcagcgg tggcagcgat
361 ctgtccttgg gtctcgacct ccttggccga cttcagcagc gtctcggtag tcttctcgac
421 ggcttctcgt atgcccgcgt tcaggccgag cgggttggcg cctgcggcca cgttgcgcag
481 accctcgcga acgagtgctt gagccaggac ggtggcgggt gtggtgccgt cgcccgcgac
541 atcgtcggtc ttcttggcga cctctttgac cagctcagcg ccgatcttct cgtacgggtc
601 ctcc
```

>hsp65 IBE200 (partial) 604 nt GKP29_RS22280

```
1 ggaggaccgg tacgagaaga tcgggcgcca gctggtcaag gaagtgcgca agaagaccga
61 cgacgttgcc ggtgacggca ccacgacggc caccgtgctg gcgcaggcgc tgggtcaagga
121 aggcctgcgc aacgtcgcag ccgggtgcaa cccgctgggc ctgaagcgcg gcacgagaa
181 ggccgtggag aaggtcaccc agaccctgct cagctcggcc aaggacgtcg agaccaagga
241 gcagatcgcg gccaccgcgg gcatctccgc gggcgaccag tcgatcgggt acctgatcgc
301 cgaggcgatg gacaaggctg gcaacgaggg cgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt
361 cggcctgcag ctcgagctca ccgagggcat gcggttcgac aagggttaca tctcgggcta
421 ctctgtcacc gacgcgcgag gtcaggaagc ggtcctggaa gacccctaca tcctgctggt
481 ctccagcaag gtgtcgaccg tcaaggacct gttgccgttg ctggagaagg tcattcaggg
541 cggcaagcgg ctgctgatca tcgccgagga cgtcagagggt gaggcgtctg ccaccctggt
601 cgtg
```

Anhang

>hsp65 BUT6 (partial) 604 nt

```
1 ggaggaccgc tacgagaaga tcggcgccga gctgggtcaaa gaggtcgcca agaagaccga
61 tgacgtcgcg ggcgacggca ccaccaccgc caccgtgctg gccagggccc tggttcgcga
121 aggtctgcgc aacgtcgcgg ccggcgccaa cccgctcggc ctgaagcgcg gtatcgagaa
181 ggctgtcgag gctgtcaccg ctgcctgctg ctcgaccgcc aaagaggtcg agaccaagga
241 gcagatcgct gccaccgchg gcatctccgc cggtgaccag tcgatcggtg acctgatcgc
301 cgaggctctg gacaaggctg gcaacgaggg tgtcatcacc gtcgaggagt ccaacacctt
361 cggcctgcag ctggagctca ccgaggggat gcgcttcgac aagggctaca tctcgggtta
421 cttcgtgacc gacgcggagc gtcaggaagc ggtcctcgag gatccctaca tcctgctggt
481 ctccggcaag gtgtcgacgg tcaaggacct gctcccgtg ctggagaagg tcatccagtc
541 cggcaagccg ctgctgatca tcgccgagga cgtcgagggc gaggccctgt cgaccctggt
601 cgtg
```

> pST-K-ibeABCDEF-eph 10.208 nt

```
ibeA      (426..1946)    →
ibeB      (1979..2257)   →
ibeC      (2250..2591)   →
ibeD      (2609..2938)   →
ibeE      (2938..3966)   →
ibeF      (3987..5006)   →
eph       (5100..6014)   →
KanR      (6388..7203)   →
oriE      (7535..8123)   →
oriM      (8290..10183)  →
```

```
1 agtactaata ttggatcgtc ggcaccgtca cggccgtggg aggcggcacg atccgcgacg
61 tgatgatcgg ccgcatcccc acgggtgctg gcagtgagct ctacgccatc ccggcggtga
121 tctgtgctgt cgcacgcaca ggcccgggtg gagaagggtc tctgacgagc gggagaactc
181 cctatcagtg atagagtttg tctccctat cagtgataga taggctctgg gaggaccctg
241 gtgtacgacc agcacggcat acatcatttc gacgcccaga gattcgccgc ccgaaatgag
301 cagcatccgc atgcccagga atcacttcgc aatgcaccac caccaccacc atatgggatc
361 cgattaggtg tggcccaatc ggattcccgt tccgcgctca ttggtcgaaa ggacagagac
421 gaaaaatggt gctgaatagg gatgattggt atgacacctc acgcgacttg cagtgggact
481 gcacttacgt agatcagaag gtggcgctcc ctgaacagtg gacgggggcc gcgaacatcc
541 cggaagaagc ctggcgtaaa tgggacgagc cattccgggt tccataccgt gactatgtcc
601 gaattcagcg ggagaaggaa tcgggtgtca aggcggtcag cggcgccctg gtgcccggcg
661 ggatctacga gaagctcgac ccgcacacag tcgccgcctc gcatctccac atgggcgcta
721 taaccgggtg cgagcatatg gcagtgcagc tgcagagccg gttttgccgg ttcgcccggg
781 ctccggcgct gcgtaacttg ggcgctcttc gcatgttggg cgagactcgc cacacgcaac
841 tgaacctccg cttcgcccat gacctcatca aggcagatcc gcggtttgat tgggcgaga
901 aggcggtttc cacaaatgag tggggcgctt tggcggtaaa gaacttcttc gacgacatca
961 tgttgaacgc agactgcgtg gaggcgtccc tggcgggccag cctgaccgtg gagcatgggt
1021 tcaccaatct gcagtttgtg gcactggccg cggacgcgat ggccgcccgt gacatcaact
1081 ggtcgaactt gctgtcgtcg accagaccg acgaggctcg gcacgcccag accggcttcc
1141 cgacgctggg catcctaatt gagcacgatc cagagcgcgc ccagcgtgca cttgacgtcg
1201 cgttctggcg tccaccggg ctgttccaga cgctgaccgg aacggcgatg gactactaca
1261 cgccactgga gctacgcaag atgagcttca aggaattcat gctcgagtgg gtcgtcaacc
1321 atcacgaacg cgtcctgcgc gactacggcc tgaagaagcc gtggtactgg gatcagttct
1381 tgcgtgccct tgaaacgggt caccacgcga tgcacatcgg cactggttc tggcgccga
1441 cgctgttctg gaagcccaac gctgggtgtg ccaaggacga gcgggcatgg ctgaatgaaa
1501 agtatccgac gtgggaagcc gacttcggct tcatgtggga cgagatcatc gccaacatca
1561 acgcccggac catggaaaag actctgcccg aaacgctacc ctcgctatgc aatctgacgc
1621 agtcccactt ggggtgccggc atgggtcccc acgagctggc ggaacatagc ctgatgtaca
1681 acggccgtct ctaccaatc gactcggaga tctcgaagtg gtgcttcgag caggatccag
1741 agcgctacgc cggccaacga aatatcatcg atcgcttcat cgccggcgag attcaacccc
1801 cggacctgtc cgggtggcctg gcgtacatga gccttaccac ggaggtgatg ggcgacgacg
1861 tctacggcta cgagtgggccc aaggactatc tgcctccag taatggatca cccaacacg
1921 cgatggccgg gtcgggttctg ctgtagtcgg tttcggcgat caagttagga gaatgacgat
1981 ggctccatct cccattactg cgcgggtcgt ggggtgattc attgcgcaac tagtggctat
2041 cgacaccgag gacacctggg accagggttc cgagaaggtg gcgggtccacg tcgtcgggcg
```

Anhang

2101 ccgggtcgct gcgcccgatc cccatcccgg atacgaggtg tcgctgggcy attcggctct
2161 gccggccgac ggaaaagtgg cggacttctt cgcgaccaat ccggttccgc cgttgcaagt
2221 gtttgacatc cgattccggc agctggctca tgtctgatgc cgccgcccgc ggctttgtcg
2281 aactggttga cgtcgacgag ctctgggacg gtgagatgga gtcctttgac gtcgggtgatg
2341 aggaagtctt gcttgtcaag gtggacggac aggtcccgcc ctacgacggg atctgcccgc
2401 accagggcgc ctctttggtc gaggggcgaac ttgcccggacg cgtggtgacg tgcccgggctc
2461 acgagtggcg gttcgacgcc ttgaccggcg aaggcgtcaa tccacgtgac cactgtttgc
2521 atcgtcacga cgtccgcgtc gtcgacggcg tcgtccaagt ccgccttcgc gtccacgctg
2581 cggctgagtg attaaggaga tttagcgaat gactgtcatt gatatggacg aagagaccgc
2641 cgctaaccat gacctggctg gcccggtcat ccggtcgggc aatcgtgctg aagcagtcac
2701 cgatgctgtc gaggaggaca atcccactg cgacgtggtg gttctcgacc gtgacgacta
2761 tgtgcgatc catacactcg gcacatgccg gctgaccgcg gcgagcctgg aaaaggcact
2821 tggcgaaccg tttccgctgg cgtctcttga gatcgacatg cccgcgttcc gggggcggat
2881 gaaaaccggg accgacgagt acatctgggt ctacgaccac gccgaacagg agcagtgatg
2941 agcgagagtg cagcgcggcc acgcacacgc cgtggactga agacttgggg ttcgttcgga
3001 aacctgggtc ggcgtcctac cgagtacgag atcctcacc acggcctcaa tcacaccact
3061 ggctcggctc gcctggaaat gggctccggag gtctggggta accgttggct gcgggaacac
3121 cgcgaccgga tgccgctggt cgttcccga tgggacgcct tccgcgatcc cgacaagatg
3181 acctacggta cctacgttgc ccagcaggac gatcaggaga cttacgtcga agggctgctc
3241 gaacagttcg acagcgaagg ctacgacgag gcgctgtccg acgaggcatt gacgctgctg
3301 agtcatgcgt ttacaccgac tcgctatgtc gcacactccc agcagatgct ctccgcctac
3361 ctgcagcagc tagcgatcag tagctacgtc ggcaattgcg cggccttcca aaccgccgac
3421 cagctgcgcc gcgttcagtt ggtggcctac cgcactacc agctcaaatt gaccaccct
3481 gccagcggat tcgccacagg tgagaaggcc acctggaccg aggatcccga ctggcagccg
3541 atccgggccc ctttcgagtg ggcgttggtc gaattcgact gggaccgagc gtttgtggcg
3601 accaacctgg tgacaaaggc gatgcgcgac cagatcttcc tgggtgatct ggctcatcag
3661 tttggcgccc tcgacgctcg tctcgacgaa ctggtcaccg acaacctctg gcacgatcc
3721 cagcgcagca agcgatggac caccgacctc gtgaagtctc tcgcccgggc ccatccgctc
3781 aacctcgttg tgcgtcaggg gcactcgcac tcctggctcg agcgcgctga cgccatgatc
3841 gatgccggcg ctccgggtgat ccaaacaacc agcggaaagg actccaacgc aatcgtgctg
3901 gccgtccgcy aatgctggac cagctggctt cacgagctcg gtctaactgc aattccgct
3961 gcatagcaga gcaacgggtg ttgcccggtg ctgagagagt cacattcgaa ggccacgatt
4021 ccatcgtcga ttgtgagccg tcggagacgc tgcgtcgggc cggcctgagt gccggcttgc
4081 ggctgccgta cgaatgcgcc agcgggggat gcggcagttg ccgcccag ctgcttgacg
4141 gcaactgtca taccctgtgg gaggacgccg tcgggctgtc ggagcagat cgccgccgcy
4201 gcaaccgaat attgatgtgc caatccgtgc cggaccggga ctgctcgtc aagggtccgcy
4261 tcgtctcgtc gatcgtcgc gaacctcgc ccgagcgggt cgatggacgc ttggcaagtc
4321 ggaccgcgct gacccccgac accgctctgt tcaccgtcga gctaggccgt cccatgagct
4381 tcctaccggg ccagttccgcy ctgttcgagt cgtcctcagg cattcgacgcy gcgtactcta
4441 tggcccacc ccgaaacgggtg ggttcgacga gtttggaaat tgtgatcagg gcgaaacctg
4501 gccggcgcgc gtcgaagtgg ctgttcgagg aatcacgct ccgtgaaccg ctgctcctc
4561 aggggcccga tgggcgggccc tatgctcagc ccgactccac ccggccggtg ctatgtgtg
4621 cgggcggcac ggggctggcc ccgactcctg cgatcgcga gcatctgctg accgccgagc
4681 agcctccgac tctgcacgtc tatgtcgggt cactgcccga cggccacctg gtcctgctc
4741 agcgtctgct gcgggtgcgc gatctgggtg ccgtgatgac cttgtcggcy gaaagtcca
4801 gcggcgctgt ggcttacgcy tgtgaactca tgccggtagc ggaaggccgcy gtgatcgacc
4861 acgtagcaag tgactggacc cagctcgcgcy accacgacat ctacctgtcc ggcccggcag
4921 gtatggtcga cgcgcgctg cgcgccttcg tgcgtgacgcy cgacgcgccc gccgatcggc
4981 ttttttacga ccgcttcttt gcttaacctg cggcggcact cacgagagag gatccgcyct
5041 gttGCGGCCG Cactaagacc cgatgaccag gaaaagtaat caacgaaggg tagaaacct
5101 tgacaacaac cgccaccocg tctgogacc ctgcaatgcy gcggccggag gaatttgcgc
5161 acagtgaat cgagctatcc accggcgtga agattcacta tgtccgggag ggccggggtc
5221 ctccgttgtt gctgctgcac ggggtggccag gattctggtg ggagtgaac aaagtaatc
5281 ggccgctcgc agaacatttc gacgtaatc taccgatct ccggggttac ggagattcgy
5341 aaaagcccga cctcaatgat atatcgcagt acacactcga ccacgcgacc gacgatcag
5401 cggcattgct ggatgcactc ggaattgaca aggtgtatat tgcggcccac gactatgcy
5461 caatcattgt ccacaaatc atccgcaagt tccgcgaccg agtggtaac gccgcaattt
5521 tcgatccgat cacaccggac ttccggtgcy tctatctcgy catcccacac gtctcggagt
5581 cgtggtatcc ccaattccac caaacgcaca tgcggtgca gctggtgagc tccagccggc
5641 aggcattgca gatctatctc gccacttca tgaatcactg gtcctatcgc gaccagctac
5701 tcaccgatga cgagatggag atctacgctc acaatttcat gaagccgggc aatatccag
5761 gtggtttcaa ttactaccgy gctaactctg cgatgacgag cgcgccttgy accgaactg
5821 atcaagaggt cagcgatttg ccggtgacga tcctctgggy ccaaggagac acagtggtag

Anhang

5881 cgctccgtact tgcagaccag ctgccgaaat attatttcgaa ctacaccctt gagatcatcg
5941 aggacggggg acatttcatg atggctcgaga agccggagat agttatcgac cgtctaacgg
6001 cctcctttgg gtgaactcct cggagctggc cggggcgccg cgcacgctt tgctgtccac
6061 gAagcttgac tacaaggacg acgacgacaa gtaaaagcta tcagttaact aaaacgaaaag
6121 gctcagtcga aagactgggc ctttctgttt ataactagcg tacgatcgac tgccaggcat
6181 caaataaaac gaaaggctca gtcgaaagac tgggcctttc gttttatgcc atcatggccg
6241 cggatgatcag ctagccacct gacgtcgggg gggggggaaa gccacgttgt gtctcaaaat
6301 ctctgatggt acattgcaca agataaaaa atatcatcat gaacaataa actgtctgct
6361 tacataaaca gtaatacaag ggggtgtatg agccatattc aacgggaaac gtcttgcctg
6421 aggccgcatg taaattccaa catggatgct gatttatatg ggtataaatg ggtcgcgat
6481 aatgtcgggg aatcaggtgc gacaatctat cgcttgtatg ggaagcccca tgcgccagag
6541 ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg ttacagatga gatggtcaga
6601 ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca agcattttat ccgtactcct
6661 gatgatgcat ggttactcac cactgcgac cccgggaaaa cagcattcca ggtattagaa
6721 gaatatcctg attcaggtga aaatattggt gatgcgctgg cagtgttcct gcgccggtt
6781 cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgcac gcgtatttcg tctcgcctcag
6841 gcgcaatcac gaatgaataa cggtttgggt gatgcgagtg attttcatga cgagcgtaat
6901 ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataatc ttttgccatt ctaccggat
6961 tcagtcgtca ctcatgggtga tttctcactt gataacctta tttttgacga ggggaaatta
7021 ataggttgta ttgatgttgg acgagtcgga atcgcagacc gataccagga tcttgccatc
7081 ctatggaact gcctcgggtga gttttctcct tcattacaga aacggctttt tcaaaaatat
7141 ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt tgatgctcga tgagtttttc
7201 taatcagaat tggttaattg gttgtaaacac tggcagagca ttacgctgac ttgacgggac
7261 ggccgctttg ttgaataaat cgaacttttg ctgagttgaa ggatcagatc acgcatcttc
7321 ccgacaacgc agaccgttcc gtggcaaaagc aaaagttcaa aatcaccaac tgggtccacct
7381 acaacaaagc tctcatcaac cgtggctccc tcactttctg gctggatgat ggggcgattc
7441 aggcttggtg taagtcagca acaccttctt cagcaggcag acctcactag tccactgag
7501 cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tctttttttt ctgcgcgtaa
7561 tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttggttg ccggatcaag
7621 agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg
7681 tcttctagat gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat
7741 acctcgtctt gctaatcctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tctgtcttta
7801 ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg
7861 gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc
7921 gtgagcattg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagaaa ggcggacagg tatccggtaa
7981 gcggcagggg cggaacagga gacgcacga gggagcttcc aggggaaac gcctggtatc
8041 tttatagtc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt
8101 cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttctggcct
8161 tttgctggcc ttttctcac atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct gttgataacc
8221 gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctccgtaagt ctccgctcag ccgaacgacc gagcgcacg
8281 cgttacgtag agcccaccag ctccgtaagt tccgggtgctg tgtggctcgt acccgcgcat
8341 tcaggcggca gggggtctaa cgggtctaa ggcggctgta cggccgccac agcggctctt
8401 agcggcccgg aaacgtcctc gaaacgacgc atgtgttctt cctggttggg acaggtggtt
8461 gggggtgctc ggctgtcgtt ggtgtttcat catcagggtc cgacgggaga gcggggagt
8521 gtcagtttgt ggggtggccc ctacgggaaa tatctgactt ggagctcgtg tcggaccata
8581 caccggtgat taatcgtggt ttattatcaa gcgtgagcca cgtcgcgacg caatttgagc
8641 agctctggct gccgtactgg tccctggcaa gcgacgatct gctcaggggg atctaccgcc
8701 aaagccgcgc gtcggcccta ggccgcgggt acatcgaggc gaaccaaca gcgctggcaa
8761 acctgctggt cgtggaagta gaccatccag acgcagcgt ccgagcgtc agcgcgggg
8821 ggtcccatcc gctgcccac gcgatcgtgg gcaatcgcgc caacggccac gcacacgcag
8881 tgtgggcact caacgcccct gttccacgca ccgaatacgc gcggcgtgag ccgctcgcag
8941 acatggcggc gtgcgcccga ggccctcggc gcgcccgtcga tggcgaccgc agttactcag
9001 gcctcatgac caaaaacccc ggccacatcg cctgggaaac ggaatggctc cactcagatc
9061 tctacacact cagccacatc gaggcgagc tccggcgcaa catgccaccg ccgcgctggc
9121 gtcagcagac cacgtacaaa gcggctccga ccgctcaggg gcggaattgc gactgttcg
9181 attccgtcag gttgtgggccc tatcttcccg ccctcatgcg gatctacctg ccgaccggga
9241 acgtggacgg actcggccgc gogatctatg ccgagtcca cgcgcgaaac gccgaatttc
9301 cgtgcaacga cgtgtgtccc ggaccgctac cggacagcga ggtccgcgcc atcgccaaca
9361 gcatttggcg ttggatcaca accaagtcgc gcatttgggc ggacgggatc gtggtctacg
9421 aggccacact cagtgcgcgc catgcccaca tctcgggaa gggcgcagca gcgcgcagc
9481 cggcagacac agttgcgcgg ccgcgaaaag ccgctcagc catggaggca ttgctatgag
9541 cgacggctac agcgcggct acagcgcgg ctacaactgg cagccgactg tccgcaaaa
9601 gcggcgcgctg accgcgcgcg aaggcgcctc aatcaccgga ctatccgaac gccacgtcgt

Anhang

```
9661 ccggctcgtg gcgcaggaac gcagcgagtg gttcgcgag caggctgcac gccgcgaacg
9721 catccgcgcc taccacgacg acgagggcca ctcttgccg caaacggcca aacatttcgg
9781 gctgcatctg gacaccgtta agcgactcgg ctatcggcg aggaaagagc gtgcggcaga
9841 acaggaagcg gctcaaaagg cccacaacga agccgacaat ccaccgctgt tctaacgcaa
9901 ttggggagcg ggtgtcgcgg gggttccgtg gggggttccg ttgcaacggg tcggacaggt
9961 aaaagtctct gtagacgcta gttttctggt ttgggcatg cctgtctcgt tgcgtgtttc
10021 gttgctcctg ttttgaatac cagccagacg agacggggtt ctacgaatct tggtcgatac
10081 caagccattt ccgctgaata tcgtggagct caccgccaga atcggtggtt gtggtgatgt
10141 acgtggcgaa ctccgttgta gtgcttggtg tggcatccgt ggcggtaccg cctgacgcc
10201 cccgatc
```

7.3 Ausgewählte Aminosäuresequenzen

>IbeA IBE100 505 aa MNO81_04000

```
1 MLLNRDDWYD TSRDLQWDMT YVDKGTAFPD GWTGSGDIPK EAWAKWDEPF RVSYRDYVRI
61 QREKEAGVKA VSNALVRAGI YEKLDPAHVA ASHLHMGGTC MVEQMAVVMQ SRFCRFAPSP
121 AWRNLGVFGM LDETRHAQLD LRFSDLLKA DPRFDWAQKA FHTNEWGILA VKNFFDDAML
181 NADCVEASLV TSLTVEHGFT NLQFVALAAD AMAAGDINWS NLLSSIQTDE ARHAQQGFPT
241 LAILMEHDPA RAQRSIDVAF WRATRLFQTL TGPAMDYYTP LDQRRHSFKE FMLEWIVNHH
301 ERILDDYGLK KPWYWDQFMR ALETGHHAMH LGTWYWRPTL FWKPNAGVSK DEREWLNEKY
361 PTWEQDFGFM WDEIIANINS GKMELTLPET LPALCSLTQL PLGAGMGPHF CGENSLMYKD
421 RLYHFDSAIS KWCFEQDPER YAGHQNIIDR FIAGEIQPPD LSGGLAYMSI TPDVMGDDVY
481 DYEWAKDYLP SNGNGKHSVA ETVLQ
```

>IbeA IBE200 506 aa GKP29_RS08605

```
1 MLLNRDDWYD TSRDLQWDMT YVDQKVAFFE QWTGAANIPE EAWRKWDEPF RVSYRDYVRI
61 QREKESGVKA VSGALVRAGI YEKLDPAHVA ASHFHMGAIT GVEHMAVTLQ SRFCRFAPAP
121 AWRNLGVFGM LDETRHTQLN LRFADLIKA DPRFDWAQKA FHTNEWGVLA VKNFFDDIML
181 NADCVEASLA ASLTVEHGFT NLQFVALAAD AMAAGDINWS NLLSSTQTDE ARHAQTGFPT
241 LGILMEHDPE RAQRALDVAF WRSTRRLFQTL TGTAMDYYTP LELRKMSFKE FMLEWVVNHH
301 ERVLRDYGLK KPWYWDQFLR ALETGHHAMH IGTWFWRPTL FWKPNAGVSK DERAWLNEKY
361 PTWEADFGFM WDEIIANINA GRMEKTLPET LPSLCNLTQL PLGAGMGPHF LAEHSIMYNG
421 RLYQFDSEIS KWCFEQDPER YAGHRNIIDR FIAGEIQPPD LSGGLAYMSL TPEVMGDDVY
481 GYEWAKDYLP SSSNGSPKHAM AGSVSL
```

>EPH IBE100 303 aa MNO81_04050

```
1 MTTASSFATP AVRRPEEFSH NEIQLSTGVK IHVYREGSGP PLLLLHGWPG FWWEWSKVVA
61 PLAEHFDVIV PDLRGGFDSE KPDLGDISQY TLDHATDDQA ALLDELGIDE AYVVGHDYAA
121 IIVHKFIRKF RNRVIKAAIF DPITPDFGEF YFGIPHVSES WYSQFHQTDMSVELVSSSR
181 ACKIYFTHFM NHWSYRDELL TDDEMEIYVD NFMKAGNIHG GFNYRANLS MTSAPWNELD
241 DEVTDLPVTI LWGQGDTVVP SLLADRLPKY YSNYTLIVE DAGHFMMVEK PDIVIERLTA
301 AFK
```

>EPH IBE200 304 aa GKP29_RS08435

```
1 MTTTATPSAT PAMRRPEEFA HSEIELSTGV KIHVYREGAG PLLLLHGWPG GFWWEWNKVI
61 GPLAEHFDVI VPDLRGYGDS EKPDLDNISQ YTLDHATDDQ AALLDALGID KVIYVGHYAA
121 AIIVHKFIRK FRDRVVKAAI FDPITPDFGA FYFGIPHVSE SWYSQFHQTDMSVQLVSSSR
181 QACKIYFAHF MNHWSYRDQL LTDEMEIYVD DNFMPKPGNIH GGFNYRANLS MTSAPWTEL
241 DQEVSDLPVT ILWGQGDTVVP PSLVADQLPK YSNYTLIVE EDGGHFMMVE KPEIVIDRLT
301 ASFG
```

>HcmA IBE100 575 aa MNO81_03945

```
1 MTTEYTETHA TPEELRLVTD ALFSRAEADL EEWENNELAD FVKRAPESQE NYLSGAGMPV
61 KRVIYGPQDLP ENWGEIGLPG QYPYTRGPYP TMYRGRKWTM RQIAGFGQAE ETNKRQYLI
121 AQGQTGLSVD FDMPTLMGLD SDDEMSELGEV GREGVAIDVL PDMAALFDGI DLENISVSMT
181 INPSAWILLA MYIAVAEDRG MDLNLKSGTI QNDILKEYVA QKEWIFPVRP SMRIVRDCIA
```


Anhang

```
241 YGSQHLARYN PVNISGYHIS EAGGSAVQEV AFTMAITKAY VEDVVAAGID VDDFASRLSF
301 FFVSQADMFE EVAKFRAVRR YYAKMMKEHF GAKKPNSMRL RFHAQTAAAT LTKPQPMVNI
361 VRTAIQALSA VLGGAQSIHT NGLDEAYTIP SEMAMKLALR TQQIIAETN IPNVIDPLGG
421 SYYVEALTNQ IEDGIQAYMD KVEAIGGVVA AIEQGFFQKE ISDTAYDYAR RKASGDRPVI
481 GVNKYVDEQE DQKIEVHKLD PESEARQITR LKQVRADRP ERARAAMNTL LTAARDEAVN
541 LMPATIEAVR AHLSMGEITG ALRDVFGSYQ ETPVF
```

>HcmA IBE200 573 aa GKP29_RS08570

```
1 MTSQPTDntp EELRLVSDAL YKRAQADLEE WEDNELAAFI ARAPEAQDSY RTGAGMPVKR
61 VYGPQDLPES WEEIGLPGRY PYTRGPYPTM YRGRKWTMRQ IAGFGQAEET NKRFQYLISQ
121 GQTGLSVDFD MPTLMGRDSD DEMSLGEVGR EGVAIDVLPD MAALFDGIDL ENISVSMTIN
181 PSAWILLAMY VAVAEDRGMD LNKLSGTIQN DILKEYVAQK EWIFPVRPSM RIVRDCVAYS
241 AEHLARYNPV NISGYHISEA GGSAVQEVAF TMAITKAYVE DVVATGIDVD KFSRSLSEFF
301 VSQADMFEV AKFRAVRRYY AKLMKERFGA KNPNSMRLRF HAQTAAATLT KPQPMVNIVR
361 TAIQALSAVL GGAQSIHTNG LDEAYTIPSE MAMKLALRTQ QIIAETNVN NVIDPLGGSY
421 YVEALTDQIE ANIQEYMDKV EAMGGVVAAI EQGFFQKEIS DTAYDYAKRK ASGERPVGIV
481 NKYVDEHEDQ KIEVHKLDPE SEARQITRLK QVRADRNPER AKAAMDALLA AARDESVMNL
541 PVTIEAVRAH LSMGEITGAL RGVFGSYQET PVF
```

7.4 Homologiemodelle

Die Modelle sind über den digitalen Anhang (2023_Helbich_Diss_Supplements.zip) unter <https://elib.uni-stuttgart.de/> abrufbar.

- IBE100 lbeA: lbeA_IBE100.pdb
- IBE200 lbeA: lbeA_IBE200.pdb
- *Rhodococcus* sp. AD45 IsoA: IsoA_AD45.pdb
- IBE200 Eph: Eph_IBE200.pdb
- IBE200 HcmA: HcmA_IBE200.pdb
- IBE200 HcmB: HcmB_IBE200.pdb

7.5 Peptidmassen Fingerprint

Die Scaffold-Dateien sind über den digitalen Anhang (2023_Helbich_Diss_Supplements.zip) unter <https://elib.uni-stuttgart.de/> abrufbar.

- IBE100: PMF_IBE100.sf3
- BUT6 pST-K-ibeABCDEF-eph: PMF_BUT6pSTK.sf3

7.6 Sauerstoffzehrung

Die Messwerte sind über den digitalen Anhang (2023_Helbich_Diss_Supplements.zip) unter <https://elib.uni-stuttgart.de/> abrufbar.

- Sauerstoffzehrung.pdf

7.7 Photometrische Daten

7.7.1 Wachstum

Tabelle 7-2 OD₆₀₀-Werte der Wachstumskurven von Stamm IBE100

Zeit (hh:mm)	2,1 mM	4,2 mM	8,4 mM	16,8 mM
00:00	0,179	0,181	0,162	0,164
09:30	0,192	0,185	0,181	0,179
23:00	0,226	0,214	0,240	0,198
27:00	0,208	0,219	0,225	0,196
30:30	0,211	0,192	0,238	0,220
46:55	0,153	0,222	0,323	0,298
51:50		0,150	0,344	0,305
54:55		0,255	0,329	0,295
70:50		0,403	0,466	
74:50		0,446	0,528	
78:35		0,358	0,662	
95:25		0,295	0,690	

Grau hinterlegte Werte wurden für die Berechnung der Wachstumskonstante herangezogen.

Tabelle 7-3 OD₆₀₀-Werte der Wachstumskurven von Stamm IBE200

Zeit (hh:mm)	2,1 mM	4,2 mM	Zeit (hh:mm)	8,4 mM	12,6 mM	16,8 mM	Zeit (hh:mm)	21,0 mM
00:00	0,152	0,139	00:00	0,160	0,161	0,159	00:00	0,167
16:10	0,179	0,148	16:30	0,179	0,173	0,189	16:35	0,233
20:10	0,189	0,193	20:20	0,184	0,184	0,202	20:25	0,267
24:25	0,194	0,207	24:55	0,214	0,204	0,213	24:00	0,284
40:30	0,191	0,264	40:05	0,308	0,307	0,328	40:30	0,381
45:00		0,263	44:35	0,372	0,341	0,412	44:35	0,425
48:35		0,284	48:35	0,422	0,408	0,552	49:30	0,500
64:20		0,278	64:10	0,564	0,634	0,658	64:40	0,782
			68:05	0,616	0,724	0,778	68:50	0,872
			72:20	0,596	0,756	0,688	72:15	1,045
			88:55	0,586	0,786	0,646	88:25	1,184
			95:25	0,626	0,834		92:35	1,208

Grau hinterlegte Werte wurden für die Berechnung der Wachstumskonstante herangezogen.

7.7.2 Supplement-Wachstum

Tabelle 7-4 OD₆₀₀-Werte der Wachstumskurven von Stamm IBE200 mit Supplementen

Zeit in hh:mm	MM	MM -Co	MM +ZnCl ₂	MM +GSH
00:00	0,167	0,159	0,180	0,200
24:40	0,284	0,163	0,283	0,273
48:45	0,501	0,158	0,536	0,530
71:30	1,045	0,134	0,905	1,115
97:10	1,208	0,105	1,270	1,335

Wachstum von Stamm IBE200 auf 21 mM MP in Minimalmedium, MM-Cobalt-defizitär, MM + 5 mM ZnCl₂, MM + 5 mM GSH.

7.7.3 Kolorimetrischer Nachweis der Epoxid-Konzentration

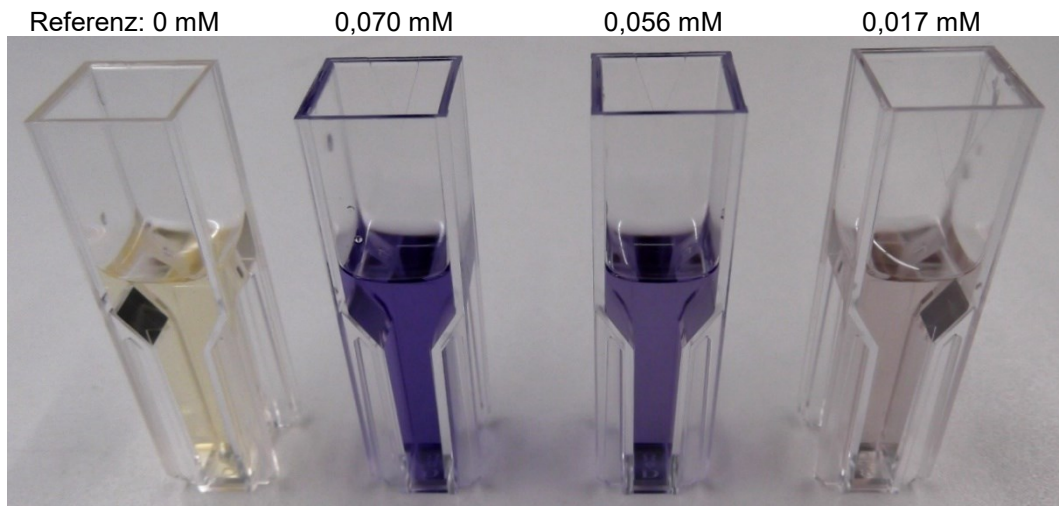


Abbildung 7-1 NBP-Assay: Farbumschlag bei verschiedenen Konzentrationen an IBO

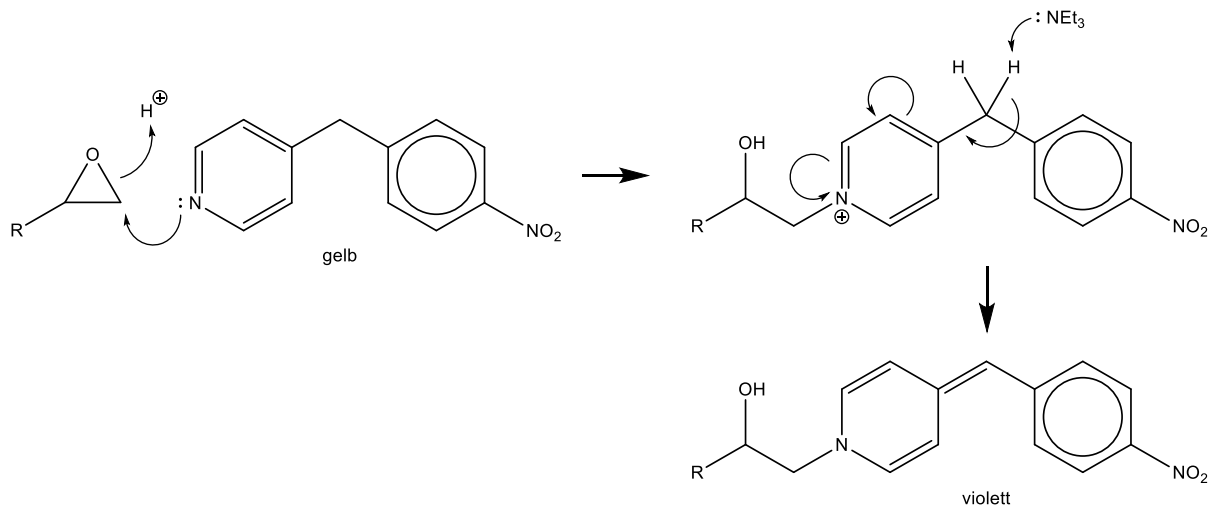


Abbildung 7-2 Reaktionsmechanismus NBP-Assay

Das Epoxid alkyliert 4-NBP. Triethylamin (NEt_3) deprotoniert das Produkt, es entsteht ein violettes Präzipitat, welches mit Hilfe von Aceton in Lösung für die photometrische Auswertung gehalten werden kann. Reaktionsmechanismus nach Epstein und Kollegen (Epstein et al. 1955).

Tabelle 7-5 Messdaten Kalibrierkurve NBP-Assay

c in mM	A_{600}
0,400	2,100
0,300	1,843
0,200	1,425
0,100	0,548
0,050	0,275
0,010	0,055
0,005	0,027
0,000	0,000

Beziehung linear im Bereich von 0 bis 0,1 mM grau hinterlegt.

Anhang

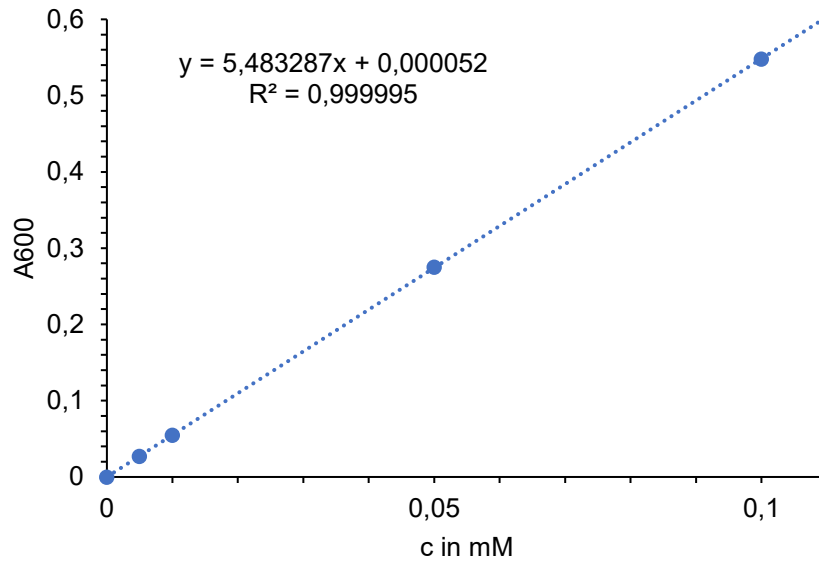


Abbildung 7-3 Kalibrierkurve: NBP-Assay

Linearer Bereich der Kalibrierkurve für die kolorimetrische Bestimmung einer 1,2-Epoxy-2-methylpropan-Konzentration in PBS.

Tabelle 7-6 A₆₀₀-Werte des NBP-Assays der Konversion von MP zu IBO

t in h/2MP in mM	20,6	41,3	82,6	103,2	123,8	206,4	123,8 ¹⁾
2	0,023	0,024	0,028	0,036	0,026	0,044	0,000
4	0,000	0,061	0,053	0,092	0,066	0,083	0,001
6	0,010	0,132	0,174	0,227	0,384	0,304	0,000
7		0,091	0,241		0,594	0,418	
8					0,368	0,230	0,001
10						0,056	
13						0,001	0,002

A₆₀₀-Werte des NBP-Assays der Ruhezellenansätze von BUT6 pST-K-ibeABCDEF-eph. ¹⁾ BUT6 WT.

Tabelle 7-7 A₆₀₀-Werte des NBP-Assays zur Epoxid-Abnahme

Zeit in min	Kontrolle zellfrei	BUT6 WT	BUT6 pST-K-ibeABCDEF-eph
0	0,545		
20		0,361	0,354
40	0,550	0,215	0,219
60		0,107	0,106
80	0,532		
120	0,529	0,004	0,000

A₆₀₀-Werte des NBP-Assays der Ruhezellenansätze von BUT6 pST-K-ibeABCDEF-eph, BUT6 WT und der zellfreien Kontrolle.

7.7.4 NAD(P)-Umsatz

Die Messwerte sind über den digitalen Anhang (2023_Helbich_Diss_Supplements.zip) unter <https://elib.uni-stuttgart.de/> abrufbar.

- NADP-Umsatz.pdf

7.7.5 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Tabelle 7-8 Messdaten Kalibrierkurve Bradford-Assay

c in mg/L	A ₅₉₅
0	0,000
10	0,121
20	0,229
30	0,321
40	0,420
50	0,492
60	0,571
70	0,628
80	0,688
90	0,732
100	0,826

Aufteilung in zwei lineare Bereiche von 0 bis 40 mg/L Protein (orange) und 50 bis 100 mg/L Protein (grau).

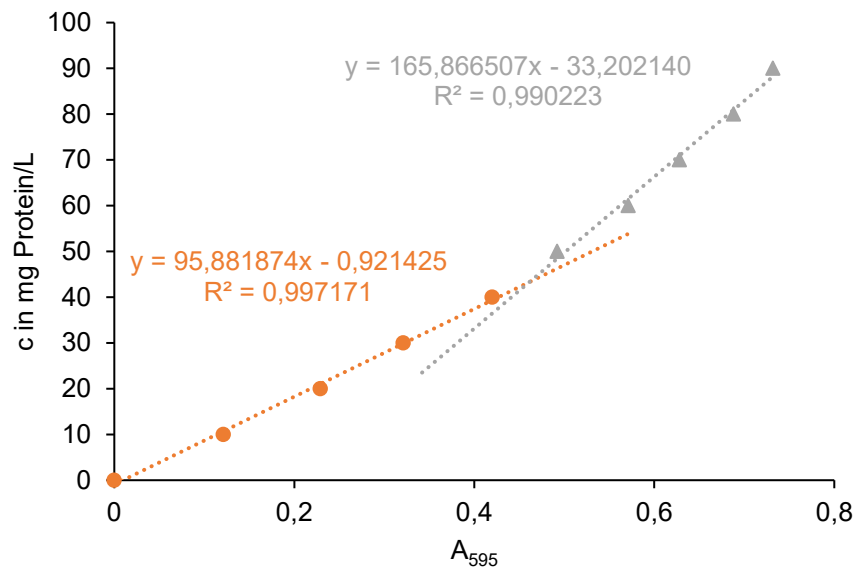


Abbildung 7-4 Kalibrierkurve Bradford-Assay