

**Neuartige Poly(3-Hydroxybutyrat) Depolymerasen  
aus *Paucimonas lemoignei* und *Rhodospirillum rubrum***

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

vorgelegt von

**René Handrick**

aus Hoyerswerda

Hauptberichter: PD Dr. D. Jendrossek

Mitberichter: Prof. Dr. C. Syldatk

Abgabe der Arbeit: 24.06.2002

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2003

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart

2003

Die vorliegende Arbeit wurden am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart und der Georg-August-Universität Göttingen angefertigt. Die Untersuchungen wurden mit Mitteln der Studienstiftung des deutschen Volkes und der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Hiermit erkläre ich, daß die Arbeiten für vorliegende Dissertation von mir selbständig durchgeführt wurden.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>19</b>
1.1. Diversität der PHA.....	20
1.2. Ökonomische Bedeutung von PHA .....	22
1.3. Bau und Struktur nativer PHA-Granula.....	24
1.4. PHA-Stoffwechsel .....	25
1.4.1. Synthese von PHA.....	25
1.4.2. Hydrolyse von PHA.....	29
1.4.2.1. Extrazelluläre Depolymerisation von PHA.....	29
1.4.2.2. Intrazelluläre Depolymerisation von PHA.....	32
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>36</b>
2.1. Organismen, Plasmide und Primer.....	36
2.2. Nährmedien.....	41
2.2.1. Definierte Mineralische Medien .....	41
2.2.2. Komplexmedien.....	46
2.2.3. Isolierung von parakristallinen Polyhydroxyalkanoaten.....	47
2.2.4. Herstellung von Polymerstammlösungen .....	47
2.2.5. Herstellung von Polymeragarplatten.....	48
2.2.6. Herstellung von nPHA <sub>SCL</sub> -Agarose-Testplatten.....	48
2.2.7. Antibiotika .....	48
2.3. Stammhaltung und Konservierung.....	49
2.3.1. Kurzfristige Lagerung.....	49
2.3.2. Längerfristige Konservierung .....	49
2.4. Zellkultivierung und Reinheitskontrolle .....	49
2.4.1. Zellanzucht zur Gewinnung von nPHA aus Wildtypstämmen .....	50
2.4.2. Anzucht von <i>E. coli</i> HMS174 zur Gewinnung rekombinanter nPHB-Granula .....	50
2.4.3. Anzucht von <i>P. lemoignei</i> zur Gewinnung extrazellulärer PHA Depolymerasen .....	51
2.4.4. Photoheterotrophe Anzucht von <i>R. rubrum</i> zur Gewinnung von nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase.....	51
2.4.5. Trübungsmessungen .....	51
2.4.6. Lithoautotrophe Anzucht von <i>Ralstonia eutropha</i> H16.....	52
2.4.7. Anzucht von <i>P. lemoignei</i> auf Tyrosin .....	52
2.4.8. Reinheitskontrolle für <i>Rhodospirillum rubrum</i> , photoheterotrophe Anzucht .....	52
2.5. Zellaufschluß.....	52
2.5.1. Zellaufschluß durch Ultraschall .....	53
2.5.2. Zellaufschluß mittels French Presse .....	53
2.5.3. Kombiniertes Zellaufschluß .....	53
2.6. Anreicherung und Reinigung von Proteinen.....	53
2.6.1. Ammoniumsulfatfällung.....	53
2.6.2. Ultrafiltration .....	54
2.6.3. Säulenchromatographie .....	54
2.6.4. Ionenaustausch-Chromatographie.....	55
2.6.4.1. Kationenaustausch-Chromatographie .....	55

2.6.4.2.	Anionenaustausch-Chromatographie .....	55
2.6.5.	Chromatofokussierung an Mono-P .....	55
2.6.6.	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC).....	56
2.6.7.	Gelfiltrationschromatographie .....	56
2.6.8.	Isoelektrische Fokussierung .....	56
2.6.9.	Proteintrennung durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation .....	57
2.6.10.	Proteinfragmenttrennung mittels Reversed-Phase-High-Performance-Liquid-Chromatographie (RP-HPLC).....	58
2.6.11.	Gelpermeations-Chromatographie (GPC) .....	59
2.6.12.	Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) .....	59
2.6.13.	N-terminale Aminosäuresequenzierung .....	60
2.7.	Proteinbestimmungen .....	60
2.7.1.	Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) [modifiziert].....	60
2.7.2.	Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976).....	61
2.8.	Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen .....	62
2.8.1.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970).....	62
2.8.2.	Tricine-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Tricine-SDS-PAGE) .....	64
2.8.3.	Unspezifische Proteinfärbung mit Silber nach BLUM et al. (1987) .....	65
2.8.4.	Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie Blue.....	66
2.8.5.	Negativfärbung von SDS-Gelen nach FERNANDEZ-PATRON 1995 (modifiziert) .....	67
2.8.6.	Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE .....	67
2.8.7.	Native-Gradienten-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	68
2.9.	Immunologische Methoden .....	69
2.9.1.	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot) .....	69
2.9.2.	Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen PhaZ5 aus <i>P. lemoignei</i> und intrazelluläre Depolymerase aus <i>R. eutropha</i> H16 .....	69
2.9.3.	Immunologischer Nachweis von Proteinen .....	69
2.9.4.	Nachweis von Glykoproteinen.....	70
2.10.	Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	71
2.10.1.	Bestimmung von PHA Depolymeraseaktivitäten .....	71
2.10.1.1.	Turbidimetrischer Test zur Bestimmung der PHA Depolymeraseaktivität.....	71
2.10.1.2.	Mikrotiterplattenreadertest zur Bestimmung der PHA Depolymeraseaktivität.....	71
2.10.1.3.	Bestimmung der Aktivität der nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase aus <i>R. rubrum</i> .....	72
2.10.1.4.	Qualitativer Test auf hydrolytische Aktivität.....	72
2.10.1.5.	Bestimmung von Hydrolaseaktivitäten durch Titration .....	72
2.10.1.6.	Aktivitätstest mit ataktischem PHB .....	72
2.10.2.	Bestimmung von 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase-Aktivität nach SHUSTER und DOUDOROFF (1962) [modifiziert] .....	73
2.10.3.	Bestimmung von Esterase-Aktivitäten .....	73
2.10.4.	Lipasetest (Triolein/Tributyryn) nach KOUKER und JAEGER (1987), modifiziert.....	73
2.10.5.	Proteasetest .....	74
2.10.6.	Abbau von Polycaprolacton .....	75
2.10.7.	Cutinasetest.....	75
2.10.8.	Stärkeabbautest .....	75
2.10.9.	Nachweis von Amidase/Nitrilase-Aktivitäten.....	75
2.11.	Analyse von Produkten der enzymatischen Polyesterhydrolyse .....	75



2.11.1.	Enzymatischer Nachweis von 3-HB .....	75
2.11.2.	Darstellung von Diazomethan als Methylierungsreagenz.....	76
2.11.3.	HPLC-Analytik oligomerer 3-Hydroxybuttersäureester nach BACHMANN et al. (1999) [modifiziert] .....	76
2.11.4.	Nachweis von PHA-Oligomeren mittels Dünnschichtchromatographie.....	77
2.11.5.	Synthese monodisperser 3-HB-Oligomersubstrate .....	78
2.11.6.	Gaschromatographie .....	80
2.11.6.1.	Vorbereitung der Analyse von PHA aus ganzen Zellen .....	80
2.11.6.2.	Vorbereitung der Proben zur Bestimmung des PHB-Gehaltes nativer Granula.....	80
2.11.6.3.	Saure Methanolyse nach BRANDL et al. (1988).....	80
2.11.6.4.	Analysenbedingungen .....	81
2.11.6.5.	Peakidentifizierung und Peakquantifizierung .....	81
2.11.7.	Elektronenspray Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS).....	82
2.11.8.	Abschätzung des PHA Gehaltes von Zellen –Nilrotfärbung (STEINBÜCHEL et al., 1999) .....	82
2.12.	Isolierung nativer PHB-Granula nach WIECZOREK et al. (1996) [modifiziert].....	83
2.12.1.	Charakterisierung nativer PHA-Granula - Bestimmung von Zusammensetzung, Trockenmasse, apparentem Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichtsverteilung.....	83
2.13.	Herstellung artifizieller PHA-Granula nach HOROWITZ und SANDERS (1994), modifiziert .....	84
2.14.	Isolierung, Fraktionierung und Nachweis polarer und unpolarer Lipide.....	85
2.15.	Generierung interner Peptidfragmente zur Aminosäuresequenzierung.....	86
2.15.1.	Proteolytischer Verdau der nPHB-Depolymerase aus <i>P. lemoignei</i> .....	86
2.15.2.	Proteolytischer Verdau der PHB Depolymerase aus <i>R. rubrum</i> .....	86
2.15.3.	In-Gel Verdau von Proteinen .....	86
2.15.4.	Chemische Spaltung von Proteinen durch Bromcyan (TARR, 1986, modifiziert).....	87
2.16.	Elektronenmikroskopie .....	88
2.16.1.	Elektronenmikroskopische Trägernetze.....	88
2.16.2.	Herstellung von Kohle-Trägerfolien.....	88
2.16.3.	Darstellung der PHA-Einschlußkörper .....	88
2.16.4.	Negativkontrastierung nach VALENTINE et al. (1968) .....	88
2.16.5.	Elektronenmikroskopische Abbildung/Größenbestimmungen .....	89
2.17.	Genetische Methoden .....	89
2.17.1.	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen.....	89
2.17.2.	Gesamt-DNA-Isolierung .....	89
2.17.2.1.	Isolierung chromosomaler DNA aus Gram-negativen Bakterien nach AUSUBEL et al. (1987).....	89
2.17.2.2.	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>R. rubrum</i> und Gram-positiven Bakterien .....	90
2.17.3.	Plasmid DNA-Isolierung .....	90
2.17.3.1.	Miniprep für Plasmide aus <i>E. coli</i> .....	90
2.17.3.2.	Kombinierte FlexiPräp™-Phenol/Chloroform-Isolierung von Plasmid DNA .....	91
2.17.3.3.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Bacillus subtilis</i> mittels alkalischer Lyse.....	91
2.17.3.4.	Boiling Präp zur Schnellpräparation von Plasmiden .....	91
2.17.3.5.	Plasmidisolierung mit Hilfe der Säulenchromatographie .....	92
2.17.4.	Isolierung von Gesamt-RNA.....	92
2.17.5.	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren .....	92
2.17.5.1.	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (RENC) .....	92
2.17.5.2.	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	93
2.17.5.3.	Herstellung von „blunt end“ DNA-Fragmenten mit <i>Vent</i> -Polymerase.....	93
2.17.5.4.	Herstellung von „blunt end“ DNA-Fragmenten mit Klenow-Fragment.....	93

2.17.5.5.	Herstellung von „blunt end“ DNA-Fragmenten mit Mung Bean Nuklease .....	93
2.17.5.6.	Agarosegelelektrophorese.....	93
2.17.5.7.	Reinigung von PCR-Produkten .....	94
2.17.5.8.	Herstellung von T-Vektoren nach MARCHUK et al. (1991), modifiziert .....	95
2.17.5.9.	Standardligation von DNA Fragmenten.....	95
2.17.5.10.	Restriktionsligation von DNA Fragmenten.....	95
2.17.6.	Präparation von Nucleinsäuren aus Agarosegelen.....	96
2.17.6.1.	Adsorption von DNA an Glasmilch .....	96
2.17.6.2.	Elektroelution von DNA aus Agarosegelen.....	96
2.17.7.	Konzentrierung von DNA .....	97
2.17.7.1.	Konzentrierung von Nucleinsäuren durch Fällung.....	97
2.17.7.2.	Dialyse und Konzentrierung von Nucleinsäuren mittels Centricon <sup>®</sup> Konzentratoren .....	97
2.17.8.	Transformation .....	97
2.17.8.1.	Aufbereitung von Ligationsansätzen für die Transformation .....	97
2.17.8.2.	Gewinnung kompetenter <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ für die Elektroporation (DOWER et al. 1988), modifiziert .....	98
2.17.8.3.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen nach INOUE et al. (1990), modifiziert .....	98
2.17.8.4.	Transformation von <i>E. coli</i> Stämmen nach INOUE et al. (1990), modifiziert.....	98
2.17.8.5.	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> nach INOUE et al. (1990), modifiziert.....	98
2.17.8.6.	Transformation von <i>B. subtilis</i> .....	99
2.17.9.	Markierung von DNA zur Herstellung von Sonden .....	99
2.17.10.	Southern-Transfer von DNA auf Nylonmembranen.....	100
2.17.11.	„Dot-Blot“.....	100
2.17.12.	Transfer von DNA aus Bakterienkolonien auf Nylon-Membranen (Kolonie-Blot).....	100
2.17.13.	Hybridisierung von Nucleinsäuren mit markierten DNA-Sonden .....	101
2.17.14.	Entfernung gebundener Sondenmoleküle von Southern-Blots („Strippen“) .....	102
2.17.15.	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	102
2.17.16.	Primer- und Sondendesign .....	103
2.17.17.	Standard PCR.....	103
2.17.18.	PCR mit degenerierten Oligonukleotidprimern .....	105
2.17.19.	Sequenzierung von DNA .....	106
2.17.19.1.	Sequenzierreaktionen .....	107
2.17.19.2.	Sequenziergele (A.L.F.-Sequencer).....	110
2.17.19.3.	Analyse von Sequenzdaten.....	110
2.18.	Chemikalien und Enzyme .....	111
<b>3.</b>	<b>EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE.....</b>	<b>113</b>
3.1.	Stand der Arbeiten zum enzymatischen Abbau von Polyhydroxyalkanoaten.....	113
3.2.	Entdeckung einer neuartigen extrazellulären PHA-Depolymeraseaktivität aus <i>Paucimonas lemoignei</i> .....	114
3.2.1.	Abbau von ataktischer PHB durch partiell gereinigte dPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase .....	114
3.2.2.	Partielle Trennung der Hydrolyseaktivitäten gegen native und denaturierte PHB im Saccharosedichtegradienten .....	116
3.2.3.	Trennung von PHA Depolymerasen aus <i>P. lemoignei</i> im nativen Gel .....	117
3.3.	Präparative Reinigung extrazellulärer nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase (PhaZ7) sowie der dPHB-Depolymerasen A (PhaZ5) und B (PhaZ2) .....	119

3.3.1.	Ionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose CL-6B .....	120
3.3.2.	Chromatofokussierung an Mono P .....	121
3.3.3.	Ergebnis der Anreicherung extrazelluläre nPHA- und dPHA-Depolymerasen aus <i>P. lemoignei</i> .....	123
3.3.4.	Immunologische Abgrenzung der nPHAS <sub>SCL</sub> -Depolymerase PhaZ7 von den extrazellulären dPHB-Depolymerasen PhaZ2 und PhaZ5 .....	125
3.3.5.	Gewinnung von Kristallen der nPHB-Depolymerase PhaZ7 .....	125
3.4.	Bildung der nPHAS <sub>SCL</sub> Depolymerase PhaZ7 bei Wachstum auf verschiedenen Substraten .....	127
3.5.	Der N-Terminus der reifen (extrazellulären) nPHA-Depolymerase PhaZ7 aus <i>P. lemoignei</i> .....	130
3.6.	Gewinnung interner Peptide und Analyse der Fragmente.....	131
3.6.1.	Chemische Spaltung mit Bromcyan.....	131
3.6.2.	Proteolytische Spaltung der nPHA Depolymerase aus <i>P. lemoignei</i> .....	132
3.7.	Biochemische Charakterisierung der nPHB Depolymerase PhaZ7 aus <i>P. lemoignei</i> .....	135
3.7.1.	Bestimmung der Molekularmassen von PhaZ7.....	135
3.7.1.1.	Molekularmasse unter reduzierenden Bedingungen.....	135
3.7.1.2.	Bestimmung der apparenten Molekularmasse von PhaZ7 durch Gelpermeationschromatographie.....	135
3.7.1.3.	Bestimmung der Molekularmasse von PhaZ7 durch MALDI-TOF-MS .....	136
3.7.1.4.	Glycosylierungstests .....	137
3.7.2.	Isoelektrischer Punkt .....	137
3.7.3.	Temperaturstabilität der gereinigten nPHA-Depolymerase PhaZ7 und Temperaturoptimum der nPHA-Hydrolyse .....	138
3.7.4.	Einfluß des pH-Wertes auf die nPHB Depolymeraseaktivität und die Stabilität von PhaZ7 .....	140
3.7.5.	Einfluß von Ionen auf die PHA-Depolymerisation durch PhaZ7.....	141
3.7.6.	Untersuchungen zur Substratspezifität von PhaZ7.....	143
3.7.6.1.	Abbau ataktischer PHA-Filme durch PhaZ7 .....	147
3.7.6.2.	Esteraseaktivität der nPHB Depolymerase PhaZ7.....	148
3.7.6.3.	Titrationsexperimente mit oligomeren PHA.....	150
3.7.7.	Produkte der PHA-Hydrolyse durch PhaZ7 .....	153
3.7.7.1.	Nachweis von Produkten der nPHAS <sub>SCL</sub> -Hydrolyse durch PhaZ7 mittels ESI-MS.....	158
3.7.8.	Spezifität der PHA-Hydrolyse durch PhaZ7 - Bindeexperimente mit denaturierten PHB-Granula.....	162
3.7.9.	Hemmung der dPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZ2 und PhaZ5 durch PhaZ7 als „dPHB-Depolymerase-Inhibitor“.....	163
3.7.10.	Einfluß von Detergentien und Hemmstoffen auf die hydrolytischen Aktivitäten von nPHB-Depolymerase PhaZ7 und dPHB Depolymerase PhaZ5 .....	166
3.8.	Klonierung des nPHAS <sub>SCL</sub> -Depolymerasegenes, <i>phaZ7</i> , aus <i>P. lemoignei</i> .....	172
3.8.1.	Gewinnung spezifischer Oligonukleotidsonden .....	173
3.8.2.	Versuch der Klonierung von <i>phaZ7</i> in <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	174
3.8.3.	Bestimmung der Nukleotidsequenz von <i>phaZ7</i> durch „PCR-Walking“ und partielle PCR-Klonierung .....	177
3.8.4.	Klonierung des <i>phaZ7</i> -Genes in <i>B. subtilis</i> WB800 .....	178
3.8.5.	Analyse der Sequenzdaten aus <i>P. lemoignei</i> .....	181
3.8.6.	Charakterisierung des <i>phaZ7</i> -Genes .....	183
3.8.6.1.	Transkriptions- und Translationssignale (Promotor-/Terminationssequenzen) .....	183
3.8.6.2.	Basenverteilung und Codonauswahl .....	186

3.8.7.	Charakterisierung der Aminosäuresequenz von PhaZ7 .....	189
3.8.8.	Homologie von PhaZ7 zu bekannten Sequenzen .....	192
3.8.9.	Charakterisierung des potentiellen ORF 2.....	199
3.9.	Heterologe Expression der rekombinanten nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase PhaZ7 in <i>B. subtilis</i> WB800 und Charakterisierung der Klone .....	201
3.10.	Reinigung und Charakterisierung der nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase aus <i>R. rubrum</i> .....	206
3.10.1.	Auswahl der Kultivierungsbedingungen .....	206
3.10.2.	Präparative Reinigung der nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase (PhaZRr) aus <i>R. rubrum</i> .....	207
3.10.2.1.	Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel .....	209
3.10.2.2.	Ionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose CL-6B .....	209
3.10.2.3.	Präparative Geliltration an Superdex 200 .....	210
3.10.2.4.	Ionenaustauschchromatographie an Mono S .....	212
3.10.2.5.	Nachweis von nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymeraseaktivität im nativen Gel .....	213
3.10.3.	Ergebnis der Anreicherung nPHA- Depolymerase aus <i>R. rubrum</i> .....	214
3.11.	Biochemische Charakterisierung der nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase PhaZRr aus <i>R. rubrum</i> .....	215
3.11.1.	Bestimmung der Molekularmasse von PhaZRr.....	215
3.11.1.1.	Molekularmasse unter reduzierenden Bedingungen.....	215
3.11.1.2.	Bestimmung der Molekularmasse von PhaZRr durch Gelpermeationschromatographie.....	215
3.11.1.3.	Bestimmung der Molekularmasse von PhaZRr durch MALDI-TOF-MS .....	216
3.11.1.4.	Glycosylierungstests .....	217
3.11.2.	Isoelektrischer Punkt .....	217
3.11.3.	Temperaturoptimum der nPHA-Hydrolyse durch gereinigte PhaZRr .....	218
3.11.4.	Einfluß des pH-Wertes auf die nPHB Depolymeraseaktivität von PhaZRr.....	220
3.11.5.	Einfluß von Ionen auf die PHA-Depolymerisation durch PhaZRr.....	221
3.11.6.	Untersuchungen zur Substratspezifität von PhaZRr .....	223
3.11.6.1.	Verlauf der PHA-Hydrolyse durch PhaZRr und Abhängigkeit von einer „Aktivierung“ nativer PHA-Granula.....	226
3.11.6.2.	Titrationsexperimente mit oligomeren PHA und Hydrolyseprodukte .....	229
3.11.6.3.	Einfluß von Detergentien auf die hydrolytischen Aktivitäten von nPHB-Depolymerase PhaZRr.....	233
3.11.6.4.	Hemmung der nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase-Aktivität von PhaZRr durch Esterasehemmstoffe und Einfluß redoxaktiver Substanzen .....	233
3.12.	Gewinnung von Aminosäuresequenzen der nPHA Depolymerase aus <i>R. rubrum</i> .....	236
3.12.1.	Bestimmung des N-Terminus und tryptischer Verdau von PhaZRr.....	236
3.12.2.	Proteolytischer Verdau von PhaZRr mit Lys-C .....	236
3.12.3.	Gewinnung spezifischer Oligonukleotidsonden.....	238
3.13.	Klonierung des Genes der nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase aus <i>R. rubrum</i> .....	240
3.14.	Die Sequenz der nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase PhaZRr .....	245
3.14.1.	Charakterisierung der offenen Leserahmen des DNA-Fragmentes aus <i>R. rubrum</i> .....	250
3.14.1.1.	Transkriptions- und Translationssignale .....	250
3.14.1.2.	Basenverteilung und Codonauswahl .....	252
3.14.2.	Charakterisierung der abgeleiteten Aminosäuresequenz von PhaZRr .....	253
3.14.3.	Homologie von PhaZRr zu bekannten Sequenzen .....	256
3.14.3.1.	Charakterisierung der potentiellen offenen Leserahmen ORF 2 und ORF 3.....	259
3.15.	Heterologe Expression von <i>phaZRr</i> in <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	261
3.16.	Untersuchungen zur Verbreitung von nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase Genen .....	262

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>264</b>
4.1.	PhaZ7 - eine neuartige extrazelluläre nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase aus <i>P. lemoignei</i> .....	265
4.1.1.	Spezifität der nPHA <sub>SCL</sub> -Depolymerase PhaZ7 – Einfluß des Kristallinitätsgrades des Polyester-Substrates auf die Hydrolysierbarkeit .....	267
4.1.2.	PhaZ7 – eine Hydrolase des Serinhydrolase-Typs .....	277
4.1.3.	PhaZ7, dPHA-Depolymerasen und Lipasen – Gemeinsamkeiten und Unterschiede .....	278
4.1.4.	<i>Bacillus subtilis</i> – ein alternatives System zur heterologen Expression von PhaZ7 .....	284
4.2.	Enantioselektivität und Mechanismus der PHA <sub>SCL</sub> -Hydrolyse .....	285
4.3.	Das Schlüsselenzym des PHA-Metabolismus in <i>R. rubrum</i> - PhaZRr .....	293
4.3.1.	PhaZRr - die Minimalform einer Typ 2 - PHA-Depolymerase .....	296
4.3.2.	Anmerkungen zur AktivatorKomponente des nPHB-hydrolysierenden Systems in <i>R. rubrum</i> .....	306
4.4.	Verwandschaft der nPHA-Depolymerasen mit anderen PHA-Depolymerasen (E.C.3.1.1.75; E.C.3.1.1.76) und Carboxylesterasen (E.C.3.1.1.1.) .....	312
4.5.	Ausblick .....	315
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>318</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>339</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>341</b>

**ABKÜRZUNGEN**

A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Abb.	Abbildung
Ap	Ampicilin
ATCC	„American Type Culture Collection“
ad	Lateinisch „auf gesamt“
b	Basen (Nukleotide)
BAPNA	<i>N</i> - $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin-4-nitranilid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
bp	Basenpaare
ca.	circa
cfu	„colony forming units“, Lebendzellzahl
Cm	Chloramphenicol
CoA	Coenzym A
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
C-terminal	carboxyterminal
D	„dexter“, rechts
d	Tag
Da	Dalton
DDSC	Dodecansulfonylchlorid
DH	Dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiotreitol
E	Extinktion
E-cup	Eppendorfreaktionsgefäß
$\epsilon$	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)
ESI-MS	Elektronenspray Ionisations Massenspektrometrie
et al.	„et alii“, und andere
EtOH	Ethanol
FAME	Fettsäuremethylester
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
g	Gramm
GA	Granula-assoziiertes Protein
GC	Gaschromatographie
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
3-HB	3-Hydroxybuttersäure, 3-Hydroxybutyrat

3-HV	3-Hydroxyvaleriansäure, 3-Hydroxyvalerat
3-HO	3-Hydroxyoctansäure, 3-Hydroxyoctanoat
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
KE	Kletteinheiten
konz.	konzentriert
KP	Kaliumphosphat
L	„laevus“, links
l	Liter, Länge
LB	Luria-Bertani
LSLB	„low salt“ Luria-Bertani
LMW	„Low Molecular Weight“
Lsg.	Lösung
$\lambda$	Wellenlänge Lambda (Einheit nm)
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry
$M_r$	relatives Molekulargewicht
MCL	„medium chain length“; mittlere Kettenlänge
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MM	Mineralmedium
NAD(H)	Nicotinamidadenindinucleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduziert)
NB	Nutrient Broth
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
NTP	Nucleosid-5'-triphosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
N-terminal	aminoterminal
OD <sub>366</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 366 nm
p.A.	„pro analysis“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
<i>p</i> -NP-Ester	<i>p</i> -Nitrophenylacylester
pBKS/SK	pBlueskript-Vektor mit KS/SK-Orientierung der Multiple cloning site
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
ppm	„parts per million“
R <sub>f</sub>	relative Mobilität
Rpm	Rotationen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Rubisco	D-Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase
SAP	Shrimp alkalische Phosphatase
SCL	„short chain length“; kurze Kettenlänge
SDS	Natriumdodecylsulfat

---

SK	Stammkultur
SL	Spurenelement-Lösung
sp.	Spezies
t	Zeit
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität in $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	Massenanteil am Gesamtvolumen
w/w	Massenanteil an Gesamtmasse
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid



**Abkürzungen für Polymersubstrate**

PHA	Polyhydroxyalkanoat
PHB	Poly(3-Hydroxybuttersäure), Poly(3-Hydroxybutyrat)
PHV	Poly(3-Hydroxyvaleriansäure), Poly(3-Hydroxyvalerat)
PHO	Poly(3-Hydroxyoctansäure), Poly(3-Hydroxyoctanoat)
dPHA <sub>SCL</sub>	denaturiertes parakristallines Poly(3-Hydroxyalkanoat) aus C3- bis C5-Monomeruntereinheiten
nPHA <sub>SCL</sub>	amorphes Poly(3-Hydroxyalkanoat) aus C3- bis C5-Monomeruntereinheiten (in nativen PHA-Granula)
dPHA <sub>MCL</sub>	denaturiertes parakristallines Poly(3-Hydroxyalkanoat) aus C6- bis C14-Monomeruntereinheiten
nPHA <sub>MCL</sub>	amorphes Poly(3-Hydroxyalkanoat) aus C6- bis C14-Monomeruntereinheiten (in nativen PHA-Granula)
aPHA	ataktisches Polyhydroxyalkanoat (statistisch verteilte <i>R,S</i> -Hydroxyalkanoat-Untereinheiten; amorph)
aPHB	ataktisches Poly(3-Hydroxybutyrat)
cPHB	„channel“ PHB
dPHB	denaturiertes parakristallines Poly(3-Hydroxybutyrat)
nPHB	native = biochemisch intakte PHB Granula [amorphes Poly(3-Hydroxybutyrat)]
PCL	Poly(6-Hydroxyhexanoat)

**Abkürzungen für Aminosäuren**

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

## ABSTRACT

Many bacteria including gram-positive and gram-negative strains are able to accumulate carbon and energy intracellularly in osmotically inactive form of biodegradable polymer - the poly[(*R*)-3-hydroxyalkanoic acids] [PHA]. Natural PHA represent a wide class of storage polymers with isotactic structure that are synthesized during unbalanced growth, e.g. in excess of a suitable carbon source and growth limitation by other nutrients (e.g. nitrogen, phosphate). Based on physical and physiological reasons PHA is grouped in short-chain-length PHA (3 to 5 carbon atoms per monomer; PHA<sub>SCL</sub>) and medium-chain-length PHA (6 to 14 carbon atoms per monomer; PHA<sub>SCL</sub>). PHA and its most representative poly-3-hydroxybutyrate (PHB) exist in two different biophysical states in nature - amorphous or paracrystalline PHA. The polyesters are deposited intracellularly in the form of inclusion bodies, called native PHA-granules (nPHA). These nPHA-granules contain amorphous PHA (Mw 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>) with high mobility of the polyester chains and are coated by a surface layer consisting of structural („phasin“) and functional (PHA-synthases, nPHA-depolymerases) proteins and polar lipids *in vivo*. If bacterial cells die and the granule surface layer is either damaged or completely lost by chemical or biochemical treatment (e.g. ionic/nonionic detergents, strong alkali, proteases, lipases) or physical stress (e.g. repeated freezing, thawing, rapid centrifugation), the polymer starts to develop a crystalline phase and forms lamellar structures of polyester chains in ordered helical conformation called denatured paracrystalline PHA (dPHA) that is a substrate for dPHA-depolymerases (e. g. PhaZ2, PhaZ5 of *P. lemoignei*).

### **Extracellular nPHA<sub>SCL</sub> Depolymerase PhaZ7 of *Paucimonas lemoignei***

In this work the first extracellular nPHA<sub>SCL</sub>-depolymerase (PhaZ7) was purified from culture fluid of *Paucimonas lemoignei*. The purified enzyme (Mw 36.2 kDa) was remarkably stable and active at high pH (up to pH 12), high temperature (60°C), high concentrations of ionic and nonionic detergents and reducing agents. The depolymerase seemed to contain neither essential SH groups nor essential disulfide bridges and nPHB hydrolysis did not show strong dependency on mono- or bivalent cations. However, complexing agents inhibited the enzyme supporting that bivalent ions should be involved in stabilizing the enzyme. PhaZ7 revealed an unusual substrate specificity for amorphous PHA<sub>SCL</sub>, e.g. nPHB granules, native poly(3-hydroxyvalerate) (nPHV) granules, artificial cholate-coated amorphous PHA<sub>SCL</sub> granules, and oligomers of *R*-3-hydroxybutyrate (3HB) consisting of six or more monomeric 3HB units. The pentameric 3-HA oligomers are the main products of enzymatic hydrolysis of nPHB and nPHV as confirmed by mass spectrometry. No significant activity was found with 3-HB oligomers consisting of two to five 3HB units suggesting that the minimal oligomeric unit recognized is the 3-HB hexamer. The catalytic site revealed a high stereospecificity for natural occurring *R-R* bonds as shown in experiments with synthetic 3-HB oligomers of different tacticity. As shown by the enzymatic hydrolysis of synthetic atactic poly ((*R,S*)-3-HB) and further completely amorphous PHA<sub>SCL</sub> PhaZ7

has the astonishing property to recognize the physical state of the polymer and to discriminate between the well degradable amorphous PHA<sub>SCL</sub> and the paracrystalline PHA<sub>SCL</sub> (not hydrolyzed) which represent a substrate for all other known extracellular PHA<sub>SCL</sub> depolymerases (EC 3.1.1.75), aside from PhaZ7. The enzyme revealed highest activity ( $> 9000 \mu\text{mol cleaved ester bonds min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) on nPHB from different sources (*Ralstonia eutropha* H16, recombinant *Escherichia coli* expressing PHA biosynthesis gene cluster *phaCAB* from *R. eutropha* with or without phasin *phaG*, *Bacillus* strains) No activity was found with dPHA, PHA<sub>MCL</sub>, polynucleotides, protease substrates, poly(6-hydroxyhexanoate) and lipase substrates (tributyrine, trioleine). However a low but significant *p*-nitrophenylacyl esterase activity with weak specificity for *p*-Nitrophenyloctanoate (0.38 U/mg) was observed.

PhaZ7 inhibits the dPHB hydrolytic activity of two purified dPHA<sub>SCL</sub> depolymerases (PhaZ2, PhaZ5 from *P. lemoignei*) but does not inhibit the hydrolysis of water soluble 3-HB oligomers or *p*-nitrophenylesters. Data suggested that PhaZ7 is identical with the „PHB depolymerase inhibitor“ (PDI) described previously (MUKAI et al., 1992). However, the enzyme is not a depolymerase inhibitor *sensu strictu*. PhaZ7-depending inhibition of dPHB hydrolysis is the result of an indirect surface competition effect (REINHARDT et al., 2002). PhaZ7 is secreted during growth of *P. lemoignei* on organic acids (including 3-HB) in late exponential and stationary growth phase as on insoluble dPHA<sub>SCL</sub> supporting that expression and secretion of PHA depolymerases generally occurs in response to carbon starvation conditions.

To clone the *phaZ7* gene purified enzyme was proteolytically cleaved and isolated peptides sequenced provided data for probes and primers to prepare oligomer PCR primers of guessed protein. These primers were used to obtain DNA fragments by PCR walking on genomic *in vitro* DNA-libraries. In addition to *phaZ7* structural gene, a second open-reading frame (ORF 2) was localized upstream of *phaZ7* which showed significant aminoacid homology to histidine kinases from bacteria. The *phaZ7* gene was introduced into *Bacillus subtilis* WB800 (multiple protease negative; MURASHIMA et al., 2002) and functionally expressed under control of the constitutive P43 promoter of pWB980. Using the signal peptide sequence of SacB, the nPHA<sub>SCL</sub> depolymerase was secreted and processed correctly. DNA-deduced amino acid sequence revealed no significant homologies to known PHA depolymerases. However, limited sequential homologies to lipases from *Bacillus* and *Geobacillus* genera and to hypothetical proteins from *Caenorhabditis elegans* were found. The catalytic center AHS<sub>136</sub>MG resembles the canonical lipase box motif of *Bacillus* lipases class 1.4 and 1.5. Based on inhibition studies with diisopropylfluorophosphate it was postulated that PhaZ7 should be a member of serine hydrolase protein family related to carboxyesterases (EC 3.1.1.). Primary sequence homologies, secondary structure analysis and directed mutagenesis suggested that the catalytical triad is formed by S<sub>136</sub>, D<sub>242</sub>, H<sub>306</sub> (H<sub>47</sub>G<sub>48</sub> putative oxyanion) and the enzyme shows the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold motif but can not be classified in known lipase/esterase families. Therefore setup of a new family 9 „extracellular PHA depolymerases“ of serine esterases is suggested (following the classification of ARPIGNY and

JAEGER, 1999). Family 9 consist of two subfamilies: 9.1 (extracellular nPHA depolymerases, currently one member, PhaZ7) and 9.2 (extracellular dPHA depolymerases).

Based on results of substrate specificity (nPHB, nPHV, dPHB, dPHV) and kinetic studies on 3HB oligomer hydrolysis by dPHAS<sub>CL</sub> depolymerases PhaZ2, PhaZ5 and nPHAS<sub>CL</sub> depolymerase PhaZ7, it is hypothesized that the unique high number of at least seven extracellular PHAS<sub>CL</sub> depolymerases produced by *P. lemoignei* under carbon starvation could provide a selection advantage by a cooperative effect on PHAS<sub>CL</sub> hydrolysis similar to other polymer hydrolases (e.g. chitinases).

### **The nPHAS<sub>CL</sub> depolymerase PhaZRr of *Rhodospirillum rubrum***

In the second part of this work, the intracellular nPHAS<sub>CL</sub> depolymerase from phototrophic purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* (PhaZRr) was purified and characterized. In contrast to extracellular degradation, the intracellular degradation of nPHA is the active enzymatic hydrolysis of endogenous storage reservoir by the accumulating microorganism itself. The mechanism of enzymatic mobilization of endogenous nPHB has not yet been defined in detail and only a few studies on this subject have been published. The first nPHB depolymerizing system reconstituted of crude extracts of *R. rubrum* and nPHB granules obtained from *Bacillus megaterium* was described by MERRICK and DOUDOROFF (1964). Three soluble components of *R. rubrum* crude extracts were necessary for *in vitro* hydrolysis of nPHB to 3-HB: a heat sensitive fraction containing depolymerase extract, a thermostable „activator“ fraction, and an oligomer hydrolase. The authors were not successful in purifying the depolymerase or the activator.

To purify the nPHAS<sub>CL</sub>-depolymerase PhaZRr crude extracts were prepared from photoheterotrophically (acetate) grown *R. rubrum* and fractionated. Activity could be followed using nPHB from *R. eutropha* H16 or recombinant *E. coli* (*phaCAB* with or without *phaG*) as a substrate. The hydrolytic enzyme consisted of a single 35 kDa polypeptide. Temperature optimum (50°C) was significantly lower than that of extracellular nPHAS<sub>CL</sub> depolymerase PhaZ7. With respect to ion dependency, PhaZRr behaves as PhaZ7. EDTA inhibited the activity, suggesting that bivalent cations may play in stabilizing the enzyme. The pattern of high sensitivity to traces of reducing agents indicated that at least one disulfide bridge should be essential in enzyme stabilization as hypothesized from computational prediction of redox state and as described for extracellular dPHA-depolymerases (JENDROSSEK, 2001b) and lipases (JAEGER, 1999). In contrast to PhaZ7, the *R. rubrum* nPHAS<sub>CL</sub> depolymerase was sensitive to ionic and nonionic detergents, suggesting that hydrophobic interactions may take part in substrate recognition and/or that special interaction of granule surface layer constituents and activator is important for nPHB hydrolysis. The hydrolytic activity *in vitro* increased (> sixfold) after preincubation of nPHB with activator. The activator fraction did not show esterase activity. This component could be substituted by a variety of endoproteinasases, but not by lipases, and was obviously not required for hydrolysis of artificial SDS-, or cholate-coated PHB granules containing amorphous polymer. Because the activator fraction apparently could not substitute the

protease activation of nPHB required for hydrolysis of polymer by dPHB-depolymerase PhaZ5, it should be „specific“ for PhaZRr. The absence of proteolytic activity by activator compound and the lack of inhibitory effects by protease inhibitors on activator suggest that its mechanism should be different from that of proteases. The activator itself was liable to proteases so that it should contain at least one ester or peptide bond. The apparently amphiphilic molecule is stable in various alkanes, ketones, aliphatic or aromatic alcohols and soluble in slightly polar solvents (e.g. phenol:chloroform:isoamylalcohol mixture).

The nPHA<sub>SCL</sub>-depolymerase PhaZRr has high specificity with nPHB (up to 3100  $\mu\text{mol}$  cleaved ester bonds  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  protein) independent of the source of polymer (*R. eutropha* H16, recombinant *E. coli* harboring *phaCAB* from *R. eutropha* with or without phasin *phaG*, *Bacillus* strains) and hydrolyzes nPHA<sub>SCL</sub> independent whether granules were activated by protease or activator. Hydrolysis of protease or activator treated nPHB and nPHV and absence of nPHA<sub>MCL</sub> depolymerase activity indicate a substrate specificity comparable to extracellular dPHA<sub>SCL</sub> depolymerases. However, paracrystalline dPHA<sub>SCL</sub> were not hydrolyzed at all suggesting that PhaZRr recognizes the amorphous state of PHA. The enzyme did not exhibit lipase or protease activity. No significant esterase activity with soluble *p*-nitrophenylacylesters (side chain between 2 to 8 carbon atoms) was determined supporting that the amorphous PHB polymer could represent the preferred substrate *in vivo*. The products of nPHB hydrolysis were 3HB-monomer, 3HB-dimer and 3HB-trimer as revealed by high performance liquid chromatography. Corresponding tests on hydrolysis of 3-HB oligomers revealed properties comparable to dPHA<sub>SCL</sub>-depolymerase (PhaZ2, PhaZ5 from *P. lemoignei*). No activity with the 3HB dimer, slight activity with 3HB trimer and increase with higher oligomers seems to be a characteristic feature. Oligomer hydrolase activity with 3HB oligomers above the trimer was in the range of depolymerase activity with nPHB. PhaZRr showed significant endo-esterase activity. Enantioselectivity of the enzyme was comparable to PhaZ7. Defined synthetic 3HB-polyesters containing *R,S*-configured monomers were hydrolyzed dependent if the two subsites between which cleavage occurs, are occupied by *R*-3HB units whereas distal subunits may also be occupied by *S*-3HB. Suggested mechanism of PhaZ2, PhaZ5 and PhaZRr is comparable to PhaZ from *Alcaligenes faecalis* T1 (BACHMANN and SEEBACH, 1999).

N-terminal sequences of proteolytic PhaZRr fragments were determined and a specific nucleotide probe was derived by internal PCR with degenerated primers. A genomic 2.1 kb DNA fragment was cloned in *E. coli* DH5 $\alpha$  using pJOE890 and pBluescriptKS<sup>-</sup> containing potential *phaZRr* and the 5'-region of an additional ORF 2 (downstream of depolymerase gene) which was similar to 30S ribosomal S2 proteins. Analysis of DNA sequence confirmed the presence of *phaZRr* based on sequence identity to the N-termini of the mature protein and of internal peptides. The *phaZRr* gene was functionally expressed in recombinant *E. coli*. Deduced amino acid sequence of *phaZRr* revealed high homologies to extracellular dPHB depolymerases with type 2 catalytic domain. However, PhaZRr is significantly smaller than extracellular dPHA<sub>SCL</sub> depolymerases and a typical linker or

substrate binding domain of dPHA<sub>SCL</sub> depolymerases (JENDROSSEK, 2002) is absent. The highly conserved lipase box pentapeptide of extracellular dPHA<sub>SCL</sub> depolymerases (EC 3.11.76; GLS<sub>x</sub>G) was found to be modified to GIS<sub>19</sub>SG consistent with PHA<sub>MCL</sub> depolymerase of *Pseudomonas fluorescens* GK 13 (EC 3.11.76). Putative secondary structure of PhaZRr follows the  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold pattern (OLLIS et al., 1992). It is concluded that PhaZRr belongs to serine hydrolase family supported by inhibitory effect of DFP and sequence homology. Primary sequence homologies and secondary structure analysis suggest that the catalytical triad is formed by S<sub>19</sub>, D<sub>115</sub>, H<sub>155</sub> (H<sub>250</sub>G<sub>251</sub> putative oxyanion). Interestingly, the deduced amino acid sequence revealed a typical N-terminal signal peptide sequence. The N-terminus of purified PhaZRr coincided with predicted leader peptidase cleavage site suggesting that PhaZRr should be a secretory protein. However, no activity or protein could be detected in concentrated cell free culture fluid and it might be speculated that the signal peptide directs the depolymerase into the surface layer of the nPHB granule. Electron microscopical investigations with immuno gold labeled PhaZRr specific antibodies aim at true localization of depolymerase inside or outside the cell are in progress.

## 1. EINLEITUNG

Polyhydroxyfettsäureester bilden eine Gruppe von Biopolymeren, welche sich durch eine weite Verbreitung und die Abbaubarkeit mittels ebenso ubiquitär verbreiteter Enzyme auszeichnet. Im wissenschaftlichen Sprachgebrauch hat sich für diese Stoffklasse die Kurzbezeichnung **PHA** (= polyhydroxyalkanoic acids) durchgesetzt (ANDERSON und DAWES, 1990). Der nach bisherigem Kenntnisstand am weitesten verbreitete Polyester ist die erstmals bei *Bacillus megaterium* als amphiphile "Lipid-ähnliche" Substanz beschriebene Poly(3-Hydroxybuttersäure), **PHB** (LEMOIGNE, 1926), welche in hochmolekularer Form wie andere natürliche PHA als bakterieller Energie- und Kohlenstoffspeicher fungiert (DAWES und RIBBONS, 1964; DAWES und SENIOR, 1973; DAWES, 1976, 1985, 1989; HIPPE, 1967; HIPPE und SCHLEGEL, 1967; MERRICK, 1978; PREISS, 1989; SENIOR und DAWES, 1971). Mikroorganismen akkumulieren PHA in Gegenwart eines Überschusses an Kohlenstoffquelle bei gleichzeitiger Begrenzung des Wachstumes durch den Mangel eines essentiellen Nährstoffes. Neben einer Wachstumsbegrenzung durch Stickstoffmangel (SCHLEGEL et al., 1961a; SUZUKI et al., 1986a, 1986c; TIMM und STEINBÜCHEL, 1990) wird die Bildung des Speicherstoffes auch durch Phosphat-, Sulfat- und Magnesiummangel, sowie O<sub>2</sub>-Mangel bei aeroben Mikroorganismen induziert (KALTWASSER, 1962; REPASKE und REPASKE, 1976; SUZUKI et al., 1986b; SCHUSTER und SCHLEGEL, 1967; DAWES 1976). Der erreichbare Gehalt an PHA liegt bei über 90 % des Zelltrockengewichtes (SUZUKI et al., 1986b; TIMM und STEINBÜCHEL, 1990; für eine Übersicht siehe KIM und LENZ, 2001). Für das chemolithotrophe Bakterium *Ralstonia eutropha* H16 (ehemals *Alcaligenes eutrophus*, YABUUCHI et al., 1995) wurden PHB-Gehalte von 65 bis 96 % der Zelltrockenmasse beschrieben (SCHLEGEL et al., 1961b; PEDRÓS-ALIÓ et al., 1985).

Wasserunlösliche PHA hoher Molekulargewichte stellen einen nahezu idealen Speicherstoff dar, weil sie keinen osmotischen Druck erzeugen. Diese Eigenschaft führt zur Erhöhung der Überlebensrate PHB speichernder Zellen, wenn diese physikalischen Stressbedingungen wie Änderungen des osmotischen Druckes ausgesetzt sind (TAL und OKON, 1985). Im Sinne der Stressbewältigung scheint PHB noch weitere Funktionen zu besitzen. So wurde bereits 1958 von WILLIAMSON und WILKINSON sowie 1961 von SLEPECKY und LAW die physiologische Bedeutung von PHB für die Sporulation der Gattung *Bacillus* nachgewiesen. In *Azotobacter beijerinckii* (LEMOIGNE und GRIARD, 1943) ist PHB neben seiner Funktion als oxidierbares Substrat zum Schutze der Nitrogenase (SENIOR und DAWES, 1971) auch an der Encystierung beteiligt.

Die Fähigkeit zur Bildung von PHA ist unter den Bakterien weit verbreitet und findet sich sowohl in taxonomisch als auch physiologisch unterschiedlichsten Bakteriengruppen. Neben aerob heterotrophen Mikroorganismen (*Pseudomonas*-, *Rhizobium*-, *Spirillum*-Arten; HAYWARD et al., 1959; HUISMAN et al., 1989) sind auch chemolithotrophe Organismen, (*R. eutropha* H16) und Vertreter der Gattung *Nocardia* zur PHA-Synthese in der Lage (SCHLEGEL und GOTTSCHALK, 1962; DAWES und RIBBONS, 1964; DAWES und SENIOR, 1973; ANDERSON und DAWES, 1990). Weite

Verbreitung besitzen PHA innerhalb der Gattung *Bacillus*. So wurde in *B. megaterium*, *Bacillus cereus* und dem Milzbranderreger *Bacillus anthracis* PHB nachgewiesen (LEMOIGNE et al., 1944; WILLIAMSON und WILKINSON, 1958). Neben anoxygen phototrophen Organismen (Gattungen *Rhodospseudomonas*, *Rhodospirillum*; LIEBERGESELL et al., 1991) sowie oxygen phototrophen Cyanobakterien (*Chlorogloea*) und anaerob heterotrophen Arten (*Clostridium botulinum*; EMERUWA und HOWRIKO, 1973) besitzen auch halophile Vertreter der Archea die Fähigkeit zur PHA-Synthese (RODRIGUEZ-VALERA und LILLO, 1992). Für Übersichten siehe PREISS (1989), STEINBÜCHEL und HEIN (2001). Bei den erwähnten Beispielen handelt es sich um eine Akkumulation hochmolekularer Hydroxyalkanoat-Polyester.

In der niedermolekularen Form (120 bis 200 3-HB-Moleküle) scheint PHB als „channel PHB“ [**cPHB**] in prokaryontischen (REUSCH und SADOFF, 1988) und eukaryontischen Organismen (REUSCH, 1989) ubiquitär verbreitet zu sein. Es bildet in Komplexen mit Kalzium-Polyphosphaten spannungsabhängige Transmembrankanäle, deren Aufgaben vermutlich im  $\text{Ca}^{2+}$ - und Phosphat-Transport (DAS et al., 1997) und möglicherweise im Transport von einzellsträngiger DNA im Verlaufe des Transformationsprozesses bestehen. Letztere Annahme basiert auf der Erkenntnis, daß in einer Reihe von Organismen enge Korrelationen zwischen der genetischen Kompetenz und der Konzentration des beschriebenen Komplexes in der Zellmembran bestehen (REUSCH und SADOFF, 1983; REUSCH et al., 1986; HUANG und REUSCH, 1995). PHB-Komplexen in den Membranen von Mitochondrien und Mikrosomen kommt wahrscheinlich eine Funktion bei der Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu (REUSCH, 1989). Sogar in menschlichem Blutplasma wurde PHB nachgewiesen. 20 bis 30 % der Plasma-PHB fanden sich in Assoziation mit VLDL (very-low-density lipoprotein)- und LDL (low-density lipoprotein). Der Hauptanteil des im Plasma gefundenen PHB liegt gebunden an Albumin als Carrierprotein vor (REUSCH et al., 1992). Für das (D,D)-3-Hydroxybuttersäure-Dimer wurde bei Spezies aus der Familie der Baldachinspinnen (*Linyphiidae*, Großgattung *Lyniphia*) eine Pheromonwirkung beschrieben (SCHULZ und TOFT, 1991, zit. in MÜLLER und SEEBACH, 1993).

### 1.1. Diversität der PHA

3-Hydroxybuttersäure stellte lange den einzigen bekannten Baustein von PHA dar. Die mit der Entdeckung von 3-Hydroxy-2-butensäure (DAVIS, 1964) und zehn Jahre später von 3-Hydroxyvaleriansäure (3-HV) (WALLEN und ROHWEDDER, 1974) als Monomerenbausteine von PHA erhaltenen Hinweise auf eine größere Diversität fanden zum damaligen Zeitpunkt kaum Beachtung. Mittlerweile sind über 150 in Seitenkettenlänge und Struktur sowie der Stellung der Hydroxygruppe verschiedene Hydroxyfettsäuremonomere in PHA bekannt (STEINBÜCHEL und VALENTIN, 1995; für eine Übersicht siehe KIM und LENZ, 2001). Neben gesättigten 3-Hydroxyfettsäuren mit 3 bis 12 C-Atomen (BRANDL et al., 1988; DE SMET et al., 1983; HOLMES et al., 1982) finden sich auch ungesättigte 3-Hydroxyfettsäuren ( $\text{C}_5$  bis  $\text{C}_{14}$ ) mit ein oder zwei



Doppelbindungen (FRITZSCHE et al., 1990a; LAGEVEEN et al., 1988). Das Spektrum der Monomere ist nicht auf 3-Hydroxyfettsäuren beschränkt. Auch 4-Hydroxy- (KUNIOKA et al., 1989; VALENTIN et al., 1992) und 5-Hydroxyfettsäuren (DOI et al., 1987; STEINBÜCHEL, 1991a) wurden als Bausteine bakterieller PHA identifiziert. Die Monomerketten können verzweigt sein (FRITZSCHE et al., 1990b). Ungewöhnliche langkettige, bromierte und sogar zyklisch aliphatische (LENZ et al., 1992) und aromatische Seitenketten wurden in PHA aus *P. oleovorans* nachgewiesen (FRITZSCHE et al., 1990c; KIM et al., 1991). Bei den Bausteinen der bekannten PHA (mit Ausnahme der achiralen 3-Hydroxypropionsäure, 4-Hydroxybuttersäure und 5-Hydroxyvaleriansäure) handelt es sich ausschließlich um die D-(-)-Enantiomere (STEINBÜCHEL, 1991b). Aufgrund der aus verschiedenen Monomer-Kettenlängen resultierenden unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der PHA und aus physiologischen Gründen (PHA-Synthasen besitzen in der Regel Substratspezifität für eine Gruppe von CoA-Thioestern) wurde eine Einteilung in PHA aus kurzkettigen Monomeren mit 3 bis 5 Kohlenstoffatomen, **PHA<sub>SCL</sub>** (short-chain-length), und **PHA<sub>MCL</sub>** (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>, medium-chain-length) vorgeschlagen (STEINBÜCHEL et al., 1992).

Viele Organismen sind in der Lage, neben PHB ausgehend von entsprechenden Vorläufersubstraten (z. B. Propionat, Valerat) Copolymere [z. B. P(3-HB-co-3-HV)] zu synthetisieren (DOI et al., 1988; TIMM, 1989; LIEBERGESELL et al., 1991). Die Anzucht von *Chromobacterium violaceum* mit Valerat unter Speicherbedingungen führt zur Akkumulation von Poly(3-Hydroxyvaleriansäure), **PHV**, deren Anteil bis zu 65 % (w/w) der Zelltrockenmasse beträgt (STEINBÜCHEL et al., 1993). In all diesen Fällen bezeichnet man die Substratfettsäuren als "related substrates", da der Einbau einer Fettsäure gleicher Kohlenstoffatomzahl in die PHA erfolgt (GROSS et al., 1989; HAYWOOD et al., 1990; HUISMAN et al., 1989). Auch *P. oleovorans*, der am Besten untersuchte **PHA<sub>MCL</sub>** speichernde Mikroorganismus (DE SMET et al., 1983), bildet aus einer Reihe von längerkettigen 3-Hydroxyfettsäuren (> C<sub>6</sub>) entsprechende **PHA<sub>MCL</sub>** (BRANDL et al., 1988; LAGEVEEN et al., 1988; FRITZSCHE et al., 1990a und 1990b). Die Fähigkeit zur Synthese von **PHA<sub>MCL</sub>** aus langkettigen 3-Hydroxyfettsäuren bei gleichzeitigem Unvermögen zur Bildung von PHB oder P(3-HB-co-3-HV) dient als taxonomisches Merkmal. Die erwähnten Eigenschaften sind charakteristisch für fluoreszierende Pseudomonaden der rRNA-Homologiegruppe I (HUISMAN et al., 1989).

Eine Synthese von PHA kann jedoch auch auf einfachen „nicht verwandten“ Substraten („unrelated substrates“, d. h. keine unmittelbaren Vorläufermoleküle von PHA darstellenden Substraten; z. B. Glukose, Glukonat) erfolgen (SCHLEGEL und GOTTSCHALK, 1962; STEINBÜCHEL und HEIN, 2001).

In Fütterungsversuchen einer Mutante von *R. eutropha* H16 (PHA-Synthase *phaC1* aus *Pseudomonas mendocina*) mit Propylthiooctanoat und Propylthiohexanoat wurde unlängst die Bildung neuartiger Poly(3-Hydroxy-S-propyl- $\omega$ -thioalkanoate) beschrieben (EWERING et al., 2002).

## 1.2. Ökonomische Bedeutung von PHA

Angesichts der in den entwickelten Industrienationen zunehmend in das Zentrum der öffentlichen Diskussion getretenen Umweltschutz- und Abfallproblematik, ansteigender Rohstoffknappheit und dem bereits absehbaren Ende einer Verfügbarkeit fossiler Rohstoffe, wie Erdöl, Kohle und Erdgas, hat die Suche nach zukunftstauglichen "Ersatzwerkstoffen" an Bedeutung gewonnen (STEINBÜCHEL, 1993). Durch die Chance der Herstellung von PHA aus nachwachsenden Rohstoffen, ihre vollständige Abbaubarkeit zu Kohlendioxid und Wasser (unter aeroben Bedingungen), sowie ihre mit petrochemisch hergestelltem Polyethylen und Polypropylen vergleichbaren physikalischen Eigenschaften bieten sich für den Einsatz vielfältige Möglichkeiten (BAPTIST und WERBER, 1965; BYROM, 1987; HARTLEY, 1987). Reines PHB kann aufgrund seiner Sprödigkeit und der geringen (vom Kristallisationsgrad abhängigen) Elastizität jedoch nur bedingt genutzt werden (ALPER und LUNDGREN, 1963; HOLMES, 1985). Oberhalb der Schmelztemperatur von 178 °C (abhängig vom Kristallisationsgrad) tritt bei 180 bis 200 °C zudem ein drastisches Absinken der Molekulargewichte auf (thermische Zersetzung), was die Verwendbarkeit bei höheren Temperaturen limitiert (STEINBÜCHEL, 1991a, 1991b; SHARMA und RAY, 1995). Für die angewandte Forschung ergibt sich die Aufgabe, Möglichkeiten zu erkunden, welche eine rentable Produktion technisch anwendbarer PHA gestatten. Durch Variation der Monomerenzusammensetzung lassen sich PHA gewinnen, welche ein breites Spektrum unterschiedlicher Eigenschaften besitzen (DOI et al., 1988 und 1990b; LIEBERGESELL et al., 1993; STEINBÜCHEL et al., 1993). Das erste kommerziell hergestellte PHA ist ein unter dem Handelsnamen BIOPOL<sup>®</sup> von der ICI-Tochter Zeneca Bio Products (SHERWOOD, 1983) hergestelltes P(3-HB-co-3-HV)-Copolymer. Die industrielle Produktion erfolgte im zweistufigen Fed-Batch-Prozess mit einer Doppelmutante von *R. eutropha* H16 unter Phosphatlimitierung mit Glucose und Propionsäure als Kohlenstoff-Quellen (BYROM, 1990). Durch Änderung der Propionsäure-Konzentration läßt sich der Anteil von 3-Hydroxyvaleriansäure am Gesamtpolymer von 0 bis 30 mol% variieren und damit verbunden die mechanischen Eigenschaften des gebildeten PHA verändern (HOLMES et al., 1982; HOLMES, 1985). Kristallinität und Schmelzpunkt sinken mit zunehmendem 3-HV-Anteil. Für PHA mit 28 mol% 3-HV beträgt die Schmelztemperatur nur noch 102 °C (MITOMO et al., 1988). Die Elastizität erhöht sich, und die Sprödigkeit sinkt deutlich (OWEN, 1985). Aufgrund der ungünstigen Marktentwicklung seit Inkrafttreten der Verpackungsverordnung in Deutschland und den im Vergleich zu synthetischen Plastikmaterialien wie Polyethylen noch immer um etwa den Faktor fünf zu hohen Produktionskosten wurde die kommerzielle Verwendung von BIOPOL<sup>®</sup> (seit 1991: Shampoo-Flaschen), trotz erwiesener guter biologischer Abbaubarkeit (BRANDL und PÜCHNER, 1992; BRIESE et al., 1994a) und erzielter Fortschritte bei der Werkstoffverarbeitung, 1995 wieder eingestellt (WACKER, Pressestelle-WELLA AG, Darmstadt, persönliche Mitteilung). Eine wichtige Rolle für die Ökonomie von biotechnologischen Prozessen spielt die Suche nach kostengünstig verfügbaren Substraten und in energetischer Hinsicht effizienten Organismen. So wurden z. B. methylotrophe Pseudomonaden

gefunden, die bei Wachstum mit Methanol PHB akkumulieren (SUZUKI et al., 1986a). Die Synthese von PHA aus billigen Substraten, wie sie mit dem Produktionsstamm *Alcaligenes latus* btF-96 ausgehend von Saccharose bei der österreichischen Chemie Linz GmbH betrieben wird, ist eine Möglichkeit zur Kostenreduzierung (HRABAK, 1992). Der verwendete Stamm zeichnet sich dadurch aus, daß eine PHB-Akkumulation bereits während des exponentiellen Wachstums erfolgt. Auch biologisch hergestellte PHA<sub>MCL</sub> aus *P. oleovorans* mit einem Anteil einfach ungesättigter Monomere können nach physikochemischer Modifikation (Elektronenbestrahlung) in werkstofftaugliche P(3HO)<sub>CL</sub> ("cross linked", quervernetzt) mit gummiartigen Eigenschaften bei erhöhter Kristallinität (höherer Schmelzpunkt) umgewandelt werden (DE KONING et al., 1994). Mischungen (sogenannte "blends") von Polymeren biologischen und synthetischen Ursprungs besitzen vielfältig variierbare Eigenschaften (SCANDOLA, 1996; SHARMA und RAY, 1995).

Die Gentechnik eröffnete die Möglichkeit der Übertragung von PHA-Synthesegenen in verschiedene Mikroorganismen und Pflanzen (für eine umfassende Übersicht s. STEINBÜCHEL und HEIN, 2001). Rekombinante Stämme von *Escherichia coli*, welche die PHB-Biosynthesegene aus *R. eutropha* H16 besitzen, sind in der Lage, bis zu 95 % (w/w) PHB zu speichern (FIDLER und DOUGLAS, 1992), und mit Hilfe eines rekombinanten Stammes von *E. coli*, in welchem neben dem *phaC*-Gen (PHA-Synthase) aus *R. eutropha* auch eine 4-HB-CoA-Transferase aus *Clostridium kluyveri* exprimiert wurde, konnte P(4HB) als Homopolyester in Ausbeuten von bis zu 80 % der Zelltrockenmasse gewonnen werden (HEIN et al., 1997). Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit Hilfe von auf dem Ti-Plasmid aus *Agrobacter tumefaciens* und den PHB-Synthesegenen aus *R. eutropha* H16 basierenden Konstrukten ermöglicht eine PHB-Akkumulation in Pflanzen. Für eine rekombinante PHB-Synthese ist dabei die Expression der bakteriellen Acetoacetyl-CoA-Reduktase und der PHB-Synthase erforderlich (POIRIER et al., 1992). Es ist bereits gelungen, PHB in Leukoplasten von *A. thaliana*; Sojabohne und Raps zu produzieren, wobei die erzielten Ausbeuten auf mittlerweile bis zu 13 % der Zelltrockenmasse gesteigert werden konnten (MITSKY et al., 1996; VALENTIN et al., 1999).

Die Einsatzfelder für PHA erstrecken sich vom Verpackungsmaterial (Ersatz klassischer "Einweg"-Verpackungen aus synthetischen Kunststoffen) über eine universelle Anwendung in der Medizin (langsam resorbierbare chirurgische Implantate bei Knochenbrüchen, Retardpräparate in der Chemotherapie), die Nutzung als Immobilisationsmatrix für denitrifizierende Mikroorganismen in der Trinkwasseraufbereitung (Festbettreaktor; BIEHLER, 1989) und der Verwendung in der chemischen Industrie (Herstellung enantiomerenreiner Chemikalien) bis hin zur Einwegwindel (STEINBÜCHEL, 1991b und 1993; FRASER et al., 1989). Ein wichtiges Einsatzgebiet in der Medizin finden PHA in jüngster Zeit auf dem Gebiet des „Tissue engineering“, z.B. als Matrixgerüst für die Regeneration von Blutgefäßen, Herzklappen und Nervengewebe (YOUNG et al., 2000; SINSKEY, 2000).

### 1.3. Bau und Struktur nativer PHA-Granula

Die Speicherung von PHA in der Zelle erfolgt in Form von komplex aufgebauten Granula, welche im lichtmikroskopischen Bild anhand der intensiven Lichtbrechung zu erkennen sind. PHA-reiche Zellen können mittels einer Farbreaktion mit Sudanschwarz B identifiziert werden (WILLIAMSON und WILKINSON, 1958; SCHLEGEL et al., 1970). Im Durchschnitt werden Granula-Durchmesser von 0,35  $\mu\text{m}$  bis 0,5  $\mu\text{m}$  angegeben (ELLAR et al., 1968; DUNLOP und ROBARDS, 1973; ANDERSON und DAWES, 1990). Die sich in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen und der Wachstumsphase ändernde Größe und Anzahl der PHA-Granula in der Zelle (PEDROS-ALIO et al., 1985) ist stammspezifisch determiniert. Die Übertragung von PHB-Synthesegenclustern aus *Rhodospirillum rubrum* und *Rhodobacter sphaeroides* in eine PHB-negative Mutante von *R. eutropha* H16 führt in den rekombinanten Stämmen zur Bildung von Granula, welche in Form und Größe den PHB-Granula des jeweiligen Gendonors entsprechen (HUSTEDEL et al., 1992).

Das Polymer liegt *in vivo* in Form eines Elastomers in amorpher Form vor, wobei benachbarte Polyesterketten wahrscheinlich durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen der Estergruppen mit Wassermolekülen gegeneinander mobilisiert werden (BARNARD und SANDERS, 1989). Die Zusammensetzung und insbesondere der strukturelle Aufbau der nativen PHA-Granula *in vivo* werden kontrovers diskutiert. Mit 97,5 % (w/w) bildet PHA den Hauptbestandteil der Granula, gefolgt von 2 % (w/w) Protein und 0,5 % (w/w) Lipiden und Phospholipiden (LUNDGREN et al., 1964; GRIEBEL et al., 1968; GRIEBEL und MERRICK, 1971). Um hydrophobe Moleküle wie PHA in einer hydrophilen Umgebung (Cytoplasma) in stabiler kolloidal-partikulärer Form zu halten, bedarf es einer kompartimentierenden Membran. In der Literatur existieren grundsätzlich verschiedene Vorstellungen zur räumlichen Anordnung der Membrankomponenten. Das von STUART et al. (1995) für Poly(3-Hydroxyoctanoat)-[PHO]-Granula aus *Pseudomonas oleovorans* vorgeschlagene Modell geht von zwei durch eine Phospholipidschicht getrennten kristallinen Proteinschichten aus. Dies steht jedoch im Widerspruch zu der von PREUSTING et al. (1991) für PHO-Granula beschriebenen einschichtigen Granulum-Hülle, bestehend aus in regelmäßigen Abständen von 7,3 nm angeordneten Proteinen und Phospholipiden. Anhand von Ultradünnschnitten vorgenommene Membrandickenbestimmungen ergaben Werte von 2,5 bis 4 nm (*R. rubrum*, *Ferrobacillus ferrooxidans*, BOATMAN, 1964; WANG und LUNDGREN, 1969) und lassen auf eine Monolayer schließen. Ähnliche Angaben finden sich für PHB-Granula aus *B. cereus* (DUNLOP und ROBARDS, 1973) und *B. megaterium* (MERRICK et al., 1965). Insbesondere die Arbeiten von MAYER et al. zeigen, daß im Falle von *R. eutropha* H16 mit hoher Wahrscheinlichkeit nur eine einfache Protein-Phospholipidschicht existiert (MAYER, 1992; MAYER et al., 1996; MAYER und HOPPERT, 1997).

In funktioneller Hinsicht werden drei Klassen von Granula-assoziierten Proteinen unterschieden: (i) Phasine, (ii) PHA-Synthasen und (iii) intrazelluläre PHA-Depolymerasen (STEINBÜCHEL et al., 1995). Den Hauptanteil der Hüll-Proteine bilden die katalytisch nicht aktiven Phasine (PhaP,

strukturelle Proteine), deren Bezeichnung sich von den in Pflanzen vorkommenden Oleosinen ableitet (STEINBÜCHEL et al., 1995) (Abb. 1). Phasine besitzen amphiphile Eigenschaften, welche zur Stabilisierung der PHA-Granula *in vivo* von entscheidender Bedeutung sind. Neben dem GA24-Protein aus *R. eutropha* H16 [PhaP], welches 40 bis 80 % des gesamten Granula-Proteins darstellt (WIECZOREK et al., 1995; reevaluiert von HANLEY et al., 1999) und dem GA14-Protein aus *Rhodococcus ruber* (PIEPER-FÜRST et al., 1994 und 1995) konnten durch immunologische Untersuchungen in einer Vielzahl von Bakterien eine Reihe weiterer potentieller Phasine nachgewiesen werden (WIECZOREK et al., 1996). PhaP-negative Mutanten von *R. eutropha* H16 weisen nur 50 % der PHB-Akkumulation des Wildtyps auf und bilden ein einziges großes PHA-Granulum. Die Komplementation mit dem Strukturgen des Phasins erhöht das Niveau der PHA-Speicherung und führt zur Bildung mehrerer Granula pro Zelle. Phasine sind folglich für das Ausmaß der PHA-Speicherung sowie die Größe und Anzahl der Granula und deren strukturelle Integrität verantwortlich (WIECZOREK et al., 1995). Ihnen kommt offenbar eine wesentliche Funktion bei der Regulation von PHA-Biosynthese und Abbau zu (YORK, 2001a; 2001b).

Eine Granula-Assoziation der PHA-Synthasen konnte anhand von gereinigten nativen (= biochemisch intakten) Granula nachgewiesen werden (MERRICK und DOUDOROFF, 1961; PIEPER und STEINBÜCHEL, 1992; FULLER et al., 1992). Neben den PHA-Synthasen liegen auch intrazelluläre PHA-Depolymerasen, deren Aufgabe in einer Mobilisierung der Polyhydroxyfettsäureester besteht, Granula-gebunden vor (HIPPE und SCHLEGEL, 1967; SAITO et al., 1992; HANDRICK et al., 2000).

PHA *in vivo* und in durch schonende Isolierung gewonnenen nativen PHA-Granula befindet sich im Gegensatz zu extrazellulärem parakristallinem PHA [denaturiertem PHA - **dPHA**] in einem vollständig amorphen Zustand [amorphes PHA in nativen Granula - **nPHA**] (KAWAGUCHI und DOI, 1990; BONTRHONE et al., 1992; s. Abb. 1). Unter Verwendung von Phospholipiden oder Detergentien zur Substitution der Granulamembran ist es möglich, sogenannte artifizielle amorphe PHA-Granula *in vitro* herzustellen, deren physikalische Eigenschaften denen nativer Granula entsprechen (HOROWITZ und SANDERS, 1994). Wird die Membran entfernt, kommt es zur Kristallisation des PHA. Die Ergebnisse bestätigten Befunde einer zunehmenden Kristallisation der PHA nach Behandlung nativer Granula mit Lipase (KAWAGUCHI und DOI, 1990).

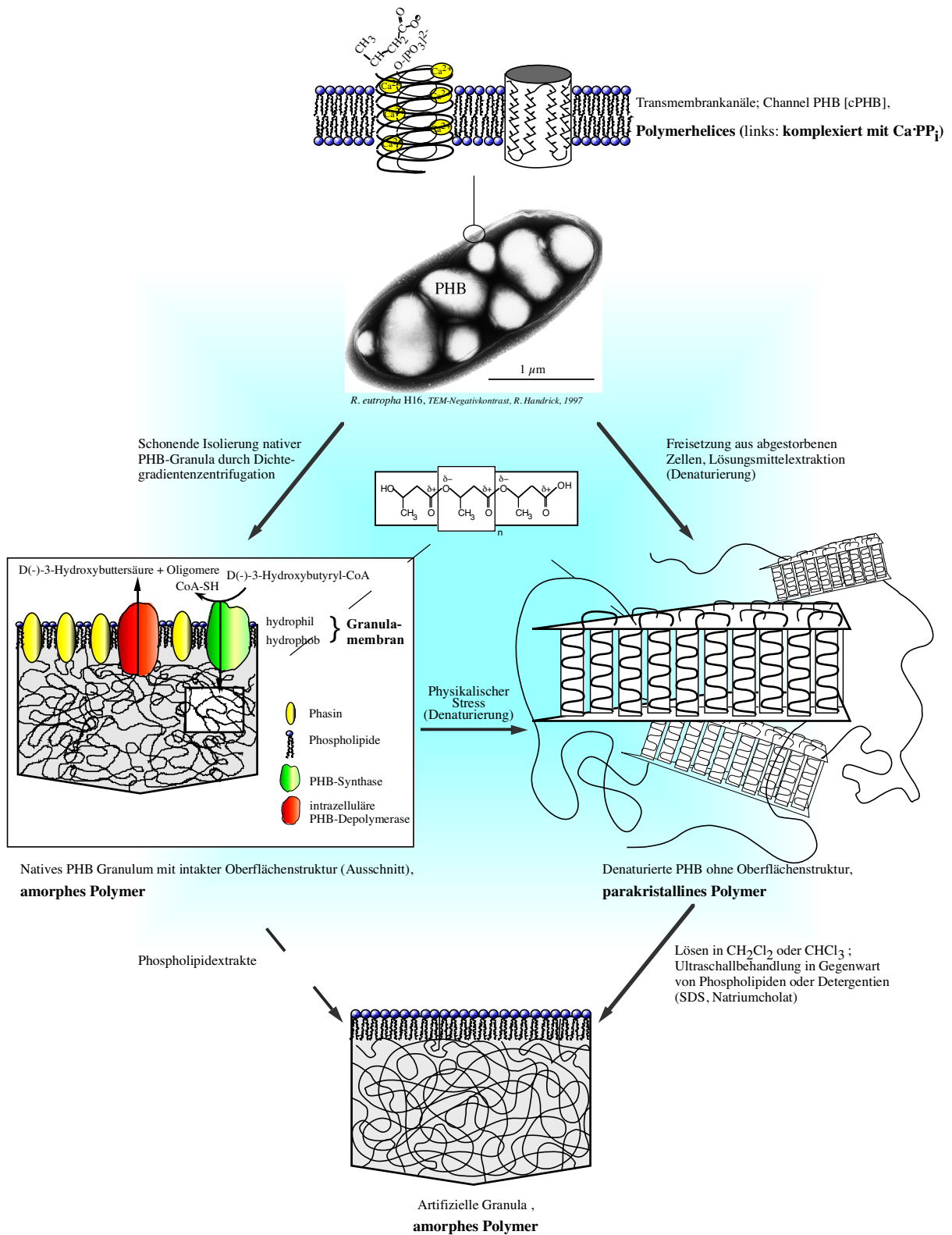
## **1.4. PHA-Stoffwechsel**

### **1.4.1. Synthese von PHA**

Die Synthese von PHA erfolgt auf mindestens vier verschiedenen Wegen. In *R. eutropha* H16 führen drei Schritte vom Acetyl-CoA zum PHA. Katalysiert von der  $\beta$ -Ketothiolase reagieren zwei Moleküle Acetyl-CoA in einer Claisen-Kondensation zu Acetoacetyl-CoA, welches durch eine NADP[H]-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase in D-(-)-3-HB-CoA umgewandelt wird. Der energiereiche Thioester dient der PHA-Synthese als Substrat zur PHA-Polymerisation (MERRICK und

DOUDOROFF, 1961; GOTTSCHALK, 1964a, 1964b; MASAMUNE et al., 1989; GRIEBEL und MERRICK, 1971; SCHINDLER, 1964; SENIOR und DAWES, 1971; OEDING und SCHLEGEL, 1973; SCHUBERT et al., 1988; HAYWOOD et al., 1988a, 1988b und 1989). Bei *Chromatium vinosum* erfolgt die Reduktion des Acetoacetyl-CoA in einer NAD[H] abhängigen Reaktion (LIEBERGESELL und STEINBÜCHEL, 1992). Ein weiterer Weg für die Synthese von PHA<sub>SCL</sub> ist aus *R. rubrum* bekannt. Eine NAD[H]-abhängige Acetoacetyl-CoA-Reduktase katalysiert die Bildung von L-(+)-3-HB-CoA, welches erst mit Hilfe der Enoyl-CoA-Hydratasen in das der PHA-Synthase als Substrat dienende D(-)-Enantiomer umgewandelt werden muß (MOSKOWITZ und MERRICK, 1969).

Wichtig für die Bildung von Copolymeren wie P(3-HB-co-3-HV) ist die geringe Substratspezifität der PHA<sub>SCL</sub>-Synthasen und der Acetoacetyl-CoA-Reduktase, welche im Falle von *R. eutropha* die Bildung von 3-Ketoaleryl-CoA aus Acetyl-CoA und Propionyl-CoA ermöglicht (MASAMUNE et al., 1989; STEINBÜCHEL, 1991a). Die Synthese von PHA<sub>MCL</sub> in fluoreszierenden Pseudomonaden (rRNA-Homologiegruppe I) ist eng mit dem Fettsäurestoffwechsel verwoben (EGGINK et al., 1992). *P. oleovorans* ist nur bei Wachstum auf Alkanen und langkettigen Fettsäuren zur PHA-Akkumulation in der Lage (DE SMET et al., 1983). Der beobachtete Einbau von um eine oder mehrere C<sub>2</sub>-Einheiten gegenüber dem Substrat verkürzten Hydroxyfettsäuren weist auf deren Herkunft aus der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren hin (BRANDL et al., 1988). Andere Pseudomonaden, die auch aus „nicht verwandten“ Substraten (d. h. keine unmittelbaren Vorläufermoleküle von PHA darstellenden Substraten; z. B. Glukose, Glukonat) PHA bilden können, nutzen die Fettsäurebiosynthese, um entsprechend aktivierte CoA-Thioester für die PHA-Bildung bereitzustellen (HAYWOOD et al., 1990; TIMM und STEINBÜCHEL, 1990, 1992). In Anlehnung an die Namen der Organismen, in denen die PHA-Synthesewege erstmals beschrieben wurden, bezeichnet man die zugehörigen Stoffwechselwege als (i) *R. eutropha*-, (ii) *R. rubrum*-, (iii) *P. oleovorans*- und (iv) *Pseudomonas aeruginosa*-Weg (STEINBÜCHEL, 1991a, 1991b, 1993; Übersicht in STEINBÜCHEL und HEIN, 2001). Die PHA-Synthasen werden aufgrund unterschiedlicher Substratspezifitäten und Organisation auf molekularer Ebene in drei Klassen eingeteilt: Synthasen der Klasse I (*R. eutropha*, *R. ruber*) setzen kurzkettige Thioester (C<sub>3</sub> bis C<sub>5</sub>) um (PEOPLES und SINSKEY, 1989b; PIEPER und STEINBÜCHEL, 1992). PHA<sub>MCL</sub>-Synthasen (C<sub>6</sub> bis C<sub>14</sub>-spezifisch) der Pseudomonaden (rRNA-Homologiekategorie I) bilden die Klasse II (HUISMAN et al., 1991; TIMM und STEINBÜCHEL, 1992) und schließlich werden die in ihrer Substratspezifität der Klasse I entsprechenden PHA-Synthasen aus Schwefelpurpurbakterien der Klasse III zugeordnet. Bildner von Klasse III-Synthasen sind auf ein zusätzliches *phaE*-codiertes Protein angewiesen (LIEBERGESELL et al., 1991, 1992; LIEBERGESELL und STEINBÜCHEL 1992, 1993).



**Abb. 1:** Vorkommen von PHB unterschiedlicher physikalischer Konformation. Das Schnittmodell nativer PHB-Granula basiert auf Angaben aus MAYER et al. (1996). Die Existenz und Funktion von cPHB-Kanälen wurde in *E. coli* nachgewiesen (REUSCH und SADOFF, 1988; DAS et al., 1997). Die Gewinnung artifizielle PHA-Granula basiert auf der Methode von HOROWITZ und SANDERS (1994).

Viele *Pseudomonas*-Arten können aus sogenannten „nicht verwandten“ („unrelated“, d. h. nicht als unmittelbare Vorläufermoleküle für die PHA-Synthese in Frage kommenden) Substraten, z. B. Glukonsäure, PHA synthetisieren, deren Grundgerüst zu einem überwiegendem Anteil aus 3-Hydroxydecanoyl-CoA besteht (HAYWOOD et al., 1990, TIMM und STEINBÜCHEL, 1990). Mit Glucose als C-Quelle wird durch *Rhodococcus ruber* ein Copolymer aus 3-HB und 3-HV gebildet (HAYWOOD et al., 1991). Eine auf nicht verwandten Substraten basierende Copolymersynthese [P(3-HB-co-3-HV)] wurde auch mit Mutanten von *R. eutropha* beobachtet (STEINBÜCHEL und PIEPER, 1992). Unlängst wurde mit PhaG in *Pseudomonas putida* ein zwischen Fettsäure *de novo*-Synthese und PHA-Synthese vermittelndes Enzym identifiziert (REHM et al., 1998). Heterologe Expression von *phaG* aus *P. putida* und einer PHA-Synthase aus *P. aeruginosa* in *Pseudomonas fragii* führten in dem ursprünglich PHA-negativen Organismus zur Bildung von PHA<sub>MCL</sub> mit Glukonat als Kohlenstoffquelle (FIEDLER et al., 2000). Bei PhaG handelt es sich um eine (R)-3-Hydroxydecanoyl-CoA-Acyl-Carrierprotein-Transferase, deren Funktion in der Übertragung der 3-HA-Gruppen von Acyl-Carrierprotein aus der Fettsäuresynthese auf CoA unter Bildung entsprechender 3-HA-CoA Substrate für die PHA-Synthase besteht.

Die genetische Organisation der PHB-Synthese wurde erstmals bei *R. eutropha* H16 untersucht (SCHUBERT, 1990; SCHUBERT et al., 1988, 1991; PEOPLES und SINSKEY, 1989a, 1989b) und konnte auch in *R. sphaeroides* (HUSTEDE et al., 1992; HUSTEDE und STEINBÜCHEL, 1993) und *R. ruber* (PIEPER und STEINBÜCHEL, 1992) weitgehend aufgeklärt werden. Die Strukturgene der am PHA-Metabolismus beteiligten Proteine liegen häufig geklustert auf dem bakteriellen Genom vor (Übersicht s. STEINBÜCHEL und HEIN, 2001). In *R. eutropha* H16 sind die Strukturgene der PHA-Synthase (*phaC*), der  $\beta$ -Ketothiolase (*phaA*) und der NADP[H]-abhängigen Acetoacetyl-CoA-Reduktase (*phaB*) in einem Operon organisiert (STEINBÜCHEL et al., 1992). Auch die bisher charakterisierten für die Granula-assoziierten Phasine kodierenden Gene (*phaP*) erscheinen in den entsprechenden *pha*-Loci. In *Chromatium vinosum* konnte dem ORF5 (LIEBERGESELL et al., 1992), welcher zusammen mit einem ORF noch unbekannter Funktion zwischen den Strukturgenen der  $\beta$ -Ketothiolase und der Acetoacetyl-CoA-Reduktase lokalisiert ist, das GA14-Protein (ein Phasin) zugeordnet werden (STEINBÜCHEL et al., 1992). In *Pseudomonas oleovorans* (HUISMAN et al., 1991) und *P. aeruginosa* (TIMM und STEINBÜCHEL, 1992) findet sich ein, vermutlich die intrazelluläre PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerase (*phaZ*) codierender offener Leserahmen, welcher beidseitig von den PHA-Synthasegenen (*phaC1*, *phaC2*) flankiert wird (Bezeichnungen nach STEINBÜCHEL et al., 1992). Obwohl das von *phaZ* codierte Protein keine signifikanten Homologien zu einer extrazellulären PHB-Depolymerase aus *Alcaligenes faecalis* zeigt (SAITO et al., 1989; HUISMAN et al., 1991), postulierte man eine Beteiligung am intrazellulären PHA-Abbau. Es wurde ein Dekapeptid gefunden, dessen Sequenz große Übereinstimmung zum katalytischen Zentrum von Triacylglycerol-Lipasen und Lipoprotein-Lipasen aufweist (PERSSON et al., 1989; HUISMAN et al., 1991). FOSTER et al. (1996;



1999) wiesen in Abbauprobungen mit isolierten nativen PHO-Granula aus *P. oleovorans* die Granulaassoziation der Depolymerase und die Hemmbarkeit durch Serin-Hydrolase-Inhibitoren nach.

#### 1.4.2. Hydrolyse von PHA

Beim Abbau von PHA ist zwischen einer Nutzung extrazellulärer Nährstoffquellen (extrazellulärer Abbau parakristalliner **dPHA**) und der Mobilisierung zelleigener PHA (intrazellulärer Abbau amorpher **nPHA**) zu unterscheiden. Bereits die ersten von CHOWDHURY (1963) durchgeführten Untersuchungen zur mikrobiellen PHA-Mobilisation führten zu der Annahme, daß es sich bei den Schlüsselenzymen des PHA-Abbaues im Falle der extra- und intrazellulären Hydrolyse von PHA in Abhängigkeit von der Struktur des jeweiligen PHA-Substrates [intrazelluläres von einer intakten Monolayer aus Lipiden und Proteinen umgebenes PHA in Form nativer Granula ist amorph (nPHA), extrazelluläres denaturiertes PHA hingegen weist keine Membranstrukturen mehr auf und liegt teilkristallin vor (dPHA); s. Abb. 1] jeweils um verschiedenartige Polymerhydrolasen handeln sollte.

##### 1.4.2.1. Extrazelluläre Depolymerisation von PHA

Die mikrobielle Verwertung außerhalb der Zellen vorliegender PHA erfordert die Expression und Sekretion von extrazellulären PHA-Depolymerasen. Auf dPHA-Agarplatten sind extrazelluläre dPHA-Depolymeraseaktivitäten anhand einer charakteristischen Bildung klarer Hydrolysehöfe zu erkennen. Zur verstärkten Ausscheidung der Depolymerasen kommt es erst gegen Ende des exponentiellen Wachstums. Succinat führt bei *P. lemoignei* in strenger Abhängigkeit vom pH-Wert (< 7,0) zur Katabolitrepression, welche mit steigendem pH offenbar aufgehoben wird (STINSON und MERRICK, 1974). Ursache hierfür ist eine pH-Abhängigkeit des Succinat-Transportes in die Zelle (TERPE et al., 1999). PHA-abbauende Mikroorganismen sind Bestandteil vieler Ökosysteme und kommen im Boden, im Belebtschlamm von Kläranlagen, im Meerwasser und in anaeroben Sedimenten vor (BRIESE et al., 1994a; DOI et al., 1992a; KITA et al., 1995). Den größten Anteil bilden die auf den Abbau von PHB spezialisierten Mikroorganismen (JENDROSSEK, 2001b). Man fand neben Gram-negativen (z. B. *Pseudomonas* sp.) und Gram-positiven (z. B. *Bacillus polymyxa*) Prokaryonten auch eine Vielzahl eukaryontischer dPHB-Abbauer (Vertreter der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus*) (MERGAERT et al., 1992). Die pH-Optima der meisten bakteriellen extrazellulären PHA-Depolymerasen liegen im alkalischen Bereich. Interessanterweise besitzen PHB-Depolymerasen einer Reihe von Pilzen hingegen außergewöhnliche Säuretoleranz und sind über einen pH-Bereich von 3,0 bis 7,0 aktiv (McLELLAN und HALLING, 1988).

Bei der Mehrheit bekannter extrazellulärer PHA-Depolymerasen handelt es sich um Enzyme, die nur denaturierte parakristalline PHA<sub>SCL</sub> (dPHA<sub>SCL</sub> aus 3-HB, 3-HV und deren Copolymere) hydrolysieren. Fluoreszierende Pseudomonaden bildet extrazelluläre dPHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen (SCHIRMER et al., 1995). Die PHO-Depolymerase aus *P. fluorescens* GK13 ist bisher jedoch die einzige näher charakterisierte extrazelluläre dPHA<sub>MCL</sub>-Depolymerase (SCHIRMER et al., 1993, 1995;

JENDROSSEK et al., 1997). Mittlerweile wurden Mikroorganismen beschrieben, welche sowohl dPHA<sub>SCL</sub> als auch dPHA<sub>MCL</sub> verwerten können (SCHIRMER et al., 1995). In *Streptomyces exfoliatus* K10, welcher neben dPHB auch PHO abbauen kann, wies eine isolierte Depolymerase hohe Spezifität für dPHB auf. PHO wurde nicht hydrolysiert, was nahelegt, daß zum Abbau von PHO ein separates Enzym vorhanden sein sollte (KLINGBEIL et al., 1996). Offenbar sind PHA-Depolymerasen spezifisch für entweder dPHA<sub>SCL</sub> oder dPHA<sub>MCL</sub>.

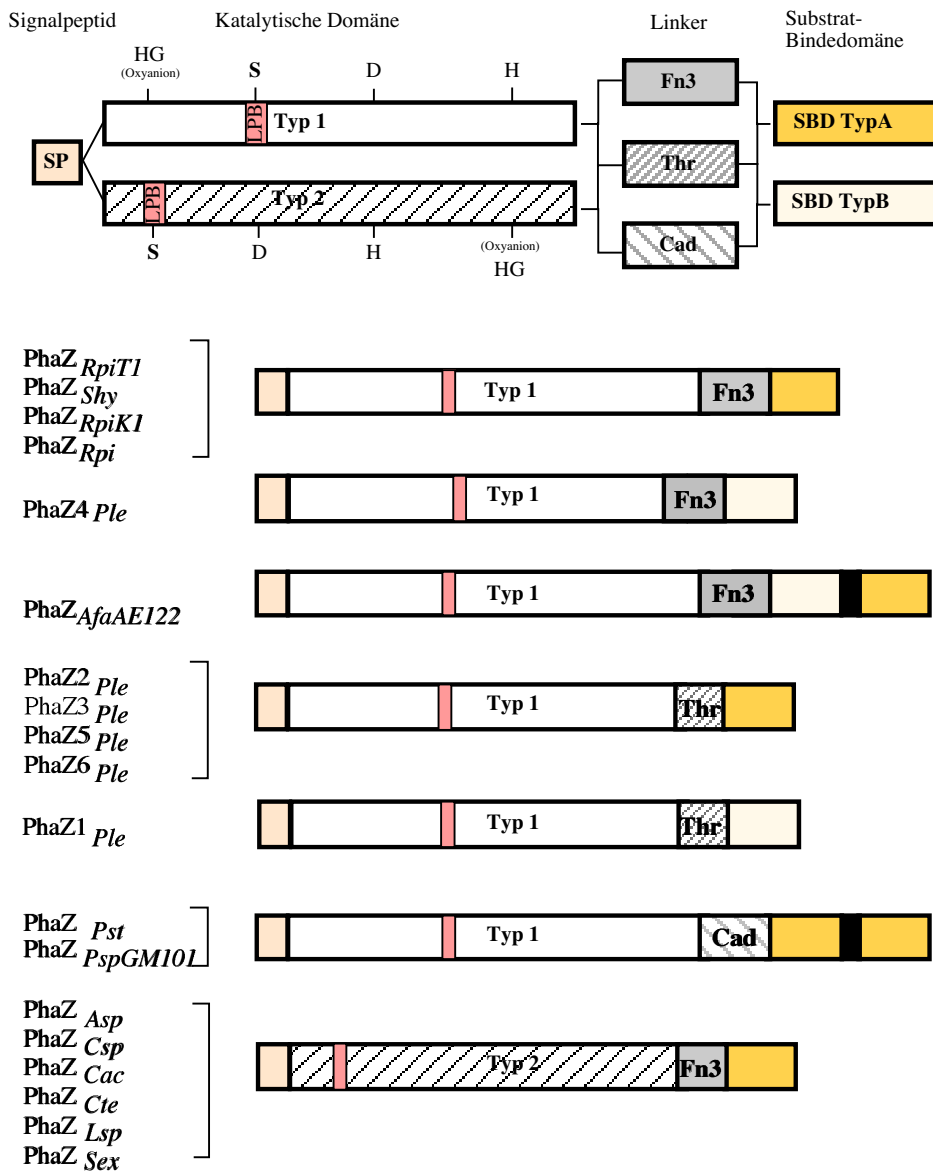
Durch die hydrolytische Aktivität der Depolymerasen wird PHA in lösliche mono-, di- oder oligomere 3-Hydroxybuttersäureeinheiten gespalten. Während die 3-HA-Monomere direkt als Substrat dienen, müssen 3-HA-Oligomere enzymatisch weiter hydrolysiert werden. Aus *P. lemoignei* wurde eine Dimer-Hydrolase isoliert, welche hohe Spezifität für 3-HB-Dimere der D(-)-Konfiguration besitzt (DELAFIELD et al., 1965a). Alle bekannten extrazellulären dPHA-Depolymerasen spalten spezifisch nur Esterbindungen der (D)-Konfiguration (HOCKING et al., 1995; BACHMANN und SEEBACH, 1999; SCHERER et al., 2000). Als typische Exoenzyme zeichnen sie sich durch hohe Stabilität hinsichtlich Ionenkonzentration, pH-Wert und Temperatur aus. Ihr relatives Molekulargewicht liegt unterhalb 70 kDa (JENDROSSEK, 2001b). Am Beispiel der extrazellulären dPHB-Depolymerasen aus *A. faecalis* (KUMAGI et al., 1992), *Alcaligenes paradoxus*, *Comamonas testosteroni* und eines mit SC17 bezeichneten Bodenisolates (NISHIDA und TOKIWA, 1993) wurde gezeigt, daß die Abbaubarkeit von dPHB mit zunehmender Kristallinität des Polymers sinkt. Amorphe Regionen werden bevorzugt hydrolysiert (DOI et al., 1995; TOMASI et al., 1996; KOYOMA und DOI, 1997).

Mindestens zwanzig dPHA-Depolymerase-Gene aus verschiedenen Mikroorganismen konnten bereits kloniert werden. In Anlehnung an die von STEINBÜCHEL et al. (1992) und JENDROSSEK et al. (1993b) vorgeschlagene Nomenklatur tragen sie die Bezeichnung *phaZ*. Mittlerweile sind zwanzig extrazelluläre dPHA-Depolymerasen kloniert und näher charakterisiert (für eine vollständige Übersicht s. 4., Abb. 103, sowie JENDROSSEK, 2001b). *Paucimonas lemoignei* (ehemals *Pseudomonas lemoignei*; JENDROSSEK, 2001a) besitzt mindestens sechs Depolymerase-Gene, deren Genprodukte die PHB-Depolymerasen C (*phaZ1<sub>Ple</sub>*), B (*phaZ2<sub>Ple</sub>*), D (*phaZ3<sub>Ple</sub>*), E (*phaZ4<sub>Ple</sub>*) und A (*phaZ5<sub>Ple</sub>*) sowie die PHV-Depolymerase (*phaZ6<sub>Ple</sub>*) den Stamm zum Abbau von dPHB und dPHV befähigen (NAKAYAMA et al., 1985; JENDROSSEK et al., 1993b; BRIESE et al., 1994b; MÜLLER und JENDROSSEK, 1993; JENDROSSEK et al., 1995b, JENDROSSEK et al., 1996, SCHÖBER et al., 2000). Zwischen den dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei*, *Ralstonia pickettii* (*phaZ<sub>Ppi</sub>*) und *A. faecalis* T1 (*phaZ<sub>Afa</sub>*) besteht 25 bis 83 % Sequenzhomologie (SAITO et al., 1989; KURUSO et al., 1994; JENDROSSEK et al., 1995b). Alle extrazellulären dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen besitzen wie andere Polymerhydrolasen (Chitinasen, Cutinasen) eine funktionelle Domänenstruktur. An ein kurzes, für extrazelluläre Enzyme typisches Signalpeptid am N-Terminus schließt sich die katalytische Domäne an, welche durch eine Linker-Domäne mit der C-terminalen Substratbindungs-Domäne verknüpft ist (Abb. 2) (BRIESE et al., 1994b; JENDROSSEK et al., 1995a, 1995b). Diese Anordnung wird nur in PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen (*P. fluorescens* GK13) durchbrochen, wo die vermutliche

Substratbindungs-Domäne vor der katalytischen-Domäne liegt und kein Linkerpeptid vorhanden ist (SCHIRMER, 1995; SCHIRMER et al., 1995). Innerhalb der katalytischen Domäne finden sich bei allen daraufhin untersuchten PHA-Depolymerasen hochkonservierte Regionen mit einer Lipase-Box der Consensus-Sequenz G-X1-S-X2-G (X1: Leucin in dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen, Isoleucin in PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerase; X2: Serin oder Alanin), wie sie in vielen Serin-Hydrolasen (Lipasen, Proteasen und Esterasen) vorhanden ist (BRADY et al., 1990; JAEGER und WOHLFARTH, 1993; SCHRAG et al., 1991; JAEGER et al., 1999). Alle Serin-Hydrolasen besitzen eine ähnliche Sekundärstruktur aus meist acht durch  $\alpha$ -Helices verbundenen  $\beta$ -Faltblättern, den "α/β-Hydrolase-fold" (OLLIS et al., 1992; NARDINI und DIJKSTRA, 1999). Hierbei bildet das zentrale Serin der Lipase-Box in der räumlichen Proteinstruktur eine katalytische Triade mit Histidin und einer sauren Aminosäure (Aspartat oder Glutamat). Da die Primärstrukturen der PHA-Depolymerasen ebenfalls konservierte Histidin- und Aspartat-Reste sowie eine potentielle Oxyanionentasche (zur Stabilisierung des durch nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppe des Serins auf das Substrat entstehenden tetraedrischen Übergangszustandes) aufweisen, wird angenommen, daß eine katalytische Triade die Basis des Reaktionsmechanismus der PHA-Hydrolyse bildet (JENDROSSEK et al., 1995a, 1995b; SHINOHE et al., 1996; KLINGBEIL et al., 1996). Die Funktionalität der postulierten katalytischen Reste wurde durch Mutageneseexperimente für PhaZ aus *A. faecalis*, *P. lemoignei* (SHINOHE et al., 1996) und *P. fluorescens* (SCHIRMER et al., 1995; JENDROSSEK et al., 1997) nachgewiesen. In Abhängigkeit von der Abfolge der katalytisch aktiven Reste in der Primärsequenz der katalytischen Domäne von dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen lassen sich zwei Depolymerasegrundtypen unterscheiden: In Typ 1 liegt die konservierte Oxyanionsequenz vor den Aminosäuren der katalytischen Triade (S, D, H) und in Typ 2 befindet sich Serin am weitesten N-terminal, gefolgt von D, H und Oxyanion.

Untersuchungen zur dPHA-Hydrolyse und Adsorptionskinetik extrazellulärer dPHB-Depolymerase aus *Alcaligenes faecalis* zeigen, daß die Substratbindedomäne offenbar essentiell für eine Bindung an hydrophobes PHA-Substrat ist, die eigentliche Substratspezifität jedoch durch das aktive Zentrum der katalytischen Domäne vermittelt wird (KASUYA et al., 1996). Eine Reihe von Autoren schlagen für die Bindung der dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen an parakristalline Polymere neben einem hydrophoben Charakter der Bindedomäne zur Anlagerung an Methyl-/Acylseitengruppen der PHA auch eine spezifische Interaktion zwischen konservierten Aminosäuren der C-terminalen Depolymeraseregion und den Esterbindungen des Polymersubstrates vor (SHINOMIYA et al., 1998; KASUYA et al., 1999; YAMASHITA et al., 2001).

Bakterien, die zur dPHA-Depolymerasebildung und Verwertung extrazellulärer dPHA in der Lage sind, können in den bisher bekannten Fällen zugleich intrazellulär nPHA synthetisieren. Nicht jedes, nPHA als endogenes Reservematerial akkumulierende Bakterium ist jedoch zum extrazellulären PHA-Abbau befähigt (DELAFIELD et al., 1965b).



**Abb. 2:** Domänenstruktur extrazellulärer dPHASCL-Depolymerasen (nach JENDROSSEK und HANDRICK, 2002, modifiziert). Abkürzungen: SP, Signalpeptid; LPB, Lipasebox (GLSxG); Fn3, Fibronectin Typ III Domäne; Thr, Threoninreiche Region; Cad, Cadherin ähnliche Region; SBD, Substrat-Bindedomäne; PhaZ, PHA-Depolymerase aus: *P. lemoignei* (*Ple*), *Alcaligenes faecalis* AE122 (*AfaAE122*), *Ralstonia pickettii* (*Rpi*), *R. pickettii* T1 (*RpiT1*), *R. pickettii* K1 (*RpiK1*), *Acidovorax* sp. (*Asp*), *Comamonas* sp. (*Csp*), *C. testosteronii* (*Cte*), *C. acidovorans* (*Cac*), *Streptomyces exfoliatus* (*Sex*), *Streptomyces hygroscopicus* (*Shy*), *Leptothrix* sp. \*\*[synonym mit *Caldimonas manganoxidans*; TAKEDA et al., 2002] (*Lsp*), *Pseudomonas stutzerii* (*Pst*), *Pseudomonas* sp. GM101 (*PspGM101*).

#### 1.4.2.2. Intrazelluläre Depolymerisation von PHA

Obwohl man das Phänomen des intrazellulären Abbaues von PHA schon lange Zeit kennt, ist das Wissen um die sich von den extrazellulären Abbaumechanismen grundlegend unterscheidenden stoffwechselphysiologischen, enzymatischen und genetischen Zusammenhänge noch von vergleichbar geringem Umfang. MACRAE und WILKINSON beobachteten bereits 1958, daß der Speicherpolymergehalt PHB-reicher Zellen von *B. megaterium* bei Inkubation in Phosphatpuffer sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen meßbar abnahm. Ein analoges Verhalten zeigen Zellen von *Micrococcus halodenitrificans* und *R. eutropha* H16, deren Überlebensfähigkeit in

Abwesenheit verwertbarer Kohlenstoffquelle vom PHA-Gehalt der Zellen abhängt (SIERRA und GIBBONS, 1962; BARTHA, 1962; HIPPE, 1967). Mikroorganismen der Gattungen *Rhizobium*, *Spirillum* und *Pseudomonas* ließen in statischer Kultur nach Erreichen eines maximalen PHA-Gehaltes mit fortschreitender stationärer Wachstumsphase wieder einen signifikanten Abbau des Speicherstoffes erkennen (HAYWARD et al., 1959). Daß PHA als endogene Kohlenstoffquelle für Biosynthesen fungieren kann, zeigten SCHLEGEL et. al. in *R. eutropha* H16 (1961b). Die Autoren postulierten intrazelluläre PHA-Hydrolasen. SAITO et al. (1995) beschrieben in *R. eutropha* neben Granula-gebundener Depolymerase auch lösliche PHA-Depolymeraseaktivität. Die in *R. eutropha* bestimmten PHB-Abbauraten sind unter anaeroben Bedingungen besonders hoch. Während unter aeroben Verhältnissen nach Durchlaufen des Tricarbonsäurezyklus ein vollständiger Umsatz von Acetyl-CoA zu H<sub>2</sub>O und CO<sub>2</sub> erfolgt, ist in Abwesenheit von O<sub>2</sub> nur die Umwandlung von Acetyl-CoA zu Acetoacetat möglicherweise mit einer ATP-Gewinnung gekoppelt (DOI et al., 1989).

MERRICK und DOUDOROFF beschrieben 1964 das erste intrazelluläre PHB hydrolysierende Enzymsystem aus der löslichen Proteinfraction von *R. rubrum*. Es besteht offenbar aus drei Komponenten: Die hitzelabile intrazelluläre Depolymerase (I) setzt unter Beteiligung einer als "Aktivator" (II) bezeichneten nicht dialysierbaren hitzestabilen Komponente aus den PHB-Granula D(-)-3-HB und dimere 3-HB-Ester frei. Eine Dimer-Hydrolase (III), welche hohe Spezifität für oligomere 3-HB-Ester besitzt, überführt die löslichen Dimerester in D(-)-3-HB-Monomere. Dimer-Hydrolasen wurden aus *R. rubrum* und *Zoogloea ramigera* isoliert (MERRICK und YU, 1966; TANAKA et al., 1981). Gebildetes 3-HB wird in *R. rubrum* durch die NAD<sup>+</sup>-abhängige D(-)-3-HB-Dehydrogenase zu Acetoacetat oxidiert (MERRICK und DOUDOROFF, 1961; SHUSTER und DOUDOROFF, 1962; SENIOR and DAWES, 1973; NAKADA et al., 1981) und in Form von Acetyl-CoA über den Tricarbonsäurezyklus wieder in den Zellstoffwechsel einbezogen (DAWES und SENIOR, 1973; SENIOR und DAWES, 1973; PREISS, 1989). Die hierfür erforderliche Veresterung von Acetoacetat mit Coenzym A erfolgt in *R. eutropha* und *Azotobacter beijerinckii* mit Hilfe einer CoA-Transferase (Thiophorase), wobei Succinyl-CoA als CoA-Donor fungiert (SENIOR and DAWES, 1973). In *Z. ramigera* wird dieser Schritt durch die ATP-abhängige CoA-Synthase katalysiert (FUKUI et al., 1982).

Die Bildung der Enzyme des PHA-Metabolismus in *Z. ramigera* I-16-M und *R. eutropha* erfolgt nach bisherigen Erkenntnissen konstitutiv, was eine Regulation von PHA-Synthese und PHA-Hydrolyse auf dem Niveau der Enzymaktivitäten wahrscheinlich macht (SAITO et al., 1977; HAYWOOD et al., 1988a, 1988b, 1989; TAIDI et al., 1995). Eine Schlüsselfunktion nehmen die  $\beta$ -Ketothiolase, die NAD(P)[H]-abhängige Acetoacetyl-CoA Reduktase (beides konstitutive Enzyme, HAYWOOD et al., 1988a, 1988b) und die D(-)-3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase ein (DAWES und SENIOR, 1973; OEDING und SCHLEGEL, 1973; SENIOR und DAWES, 1973; TAL et al., 1990). Die D(-)-3-HB-Dehydrogenase, welche durch Pyruvat, Oxalacetat (*R. eutropha*) bzw.  $\alpha$ -Ketoglutarat (*A. beijerinckii*) und hohe NAD[H]-Konzentrationen gehemmt wird, ist bei Nährstoffmangel aktiv und oxidiert die aus

PHB freigesetzten Monomere zu Acetoacetat (OEDING und SCHLEGEL, 1973; SENIOR und DAWES, 1973, HANDRICK et al., 2000). In *Azospirillum brasilense* erfolgt eine Hemmung des Enzyms zusätzlich durch Acetyl-CoA (TAL et al., 1990). Die von der  $\beta$ -Ketothiolase katalysierte Claisen-Kondensation ist reversibel und wird durch hohe CoASH-Konzentrationen inhibiert. Gleichzeitig hemmt Acetoacetyl-CoA die Rückreaktion (OEDING und SCHLEGEL, 1973). Ist keine exogene C-Quelle mehr verfügbar, so steigt der intrazellulären CoASH-Spiegel und führt zur Kompensation der Hemmung der Retro-Claisen-Reaktion. Aus Acetoacetat gebildetes Acetoacetyl-CoA kann nun in Acetyl-CoA umgewandelt werden. Das für *R. eutropha*, *B. megaterium* und *A. beijerinckii* entwickelte Regulationsschema ist nicht generell auf andere Organismen übertragbar (ANDERSON und DAWES, 1990). Interessanterweise konnten DOI et al. (1990a) zeigen, daß in *R. eutropha* unter Stickstoff-Limitierung am Ende der eigentlichen PHA-Akkumulationsphase Synthese und Abbau verschiedener PHA simultan verlaufen. Bei Inkubation PHB-reicher Zellen in N-freiem Medium mit Propionsäure sank der PHB-Gehalt bei gleichzeitiger Bildung eines Copolymers P(HB-co-HV). Bei PHB-speichernden Zellen in "batch-Kultur" wurde außerdem eine Abnahme hochmolekularer PHB beobachtet (TAIDI et al., 1995).

Eine Abbaubarkeit von nPHA durch intrazelluläre nPHA-Depolymerasen ist mit der strukturellen Integrität der Granula (MERRICK et al., 1965) und dem physikalischen Zustand des Polymers verknüpft. Durch Na-Hypochlorit-Extraktion gewonnenes dPHA besitzt überwiegend kristalline Struktur (LUNDGREN et al., 1965), was auf die Zerstörung der Membran zurückzuführen ist (HOROWITZ und SANDERS, 1994), und kann von intrazellulären nPHA-Depolymerasen nicht abgebaut werden (MERRICK und DOUDOROFF, 1964; MERRICK et al., 1965; HIPPE und SCHLEGEL, 1967). Aus der mittels kurzzeitiger Trypsinbehandlung oder schonender NaOH-Extraktion beobachteten Aktivierung des Abbaues von nPHB-Granula aus *B. megaterium* durch *R. rubrum*-Extrakte schlußfolgerten GRIEBEL und MERRICK (1971), daß native PHB-Granula ein Inhibitorprotein tragen, welches durch Trypsin zerstört und durch einen Aktivator so modifiziert wird, daß ein Angriff der Depolymerase erfolgen kann. Die für *P. oleovorans* postulierte nPHAM<sub>MCL</sub>-Depolymerase (PhaZ) wurde in Form der „Selbhydrolyse“ nativer PHO-Granula nachgewiesen. Aufgrund von Hemmversuchen wurde eine Beteiligung von Serin-Resten an der Katalyse postuliert, was eine Verwandtschaft des depolymerisierenden Enzymes mit der Gruppe der Serinhydrolasen nahelegt (FOSTER et al., 1994; 1996; 1999). Das pH-Optimum der nPHO-Hydrolyse liegt bei 9,0 (1,17 mg/h bei 30°C). Die Enzymaktivität ist strikt an das Vorhandensein eines amorphen Substrates gebunden. Parakristalline PHO-Filme werden von Proteinextrakten nativer PHO-Granula nicht angegriffen (FOSTER et al., 1996).

Bisher ist es nicht gelungen, die PHA-Wiederverwertung in ihrer Komplexität an einem Organismus beispielhaft und detailliert zu klären. Die geschilderten Untersuchungen aus jüngerer Zeit (DOI et al., 1990a; TAIDI et al., 1995; SAITO et al., 1995) werfen eine Reihe von Fragen auf. Insbesondere für das Verständnis der Regulation des Auf- und Abbaues von PHA in der Zelle ist es erforderlich, die

beteiligten Komponenten zu kennen und genauer zu charakterisieren. Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch keine nPHA-Depolymerase bekannt war, lag ein Hauptaugenmerk der experimentellen Untersuchungen auf der Reinigung, Charakterisierung der die Polyesterhydrolyse katalysierenden Enzyme, sowie der Identifizierung und Klonierung zugehöriger Strukturgene.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Organismen, Plasmide und Primer

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme, Plasmide und Primer sind in Tab. 1 bis 4 aufgeführt. Bei den eingesetzten Stämmen von *Escherichia coli* handelt es sich um *E. coli* K12-Derivate.

**Tab. 1:** Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	SK-Nr.*	Relevanter Geno-/Phänotyp	Referenz
<i>Alcaligenes faecalis</i> T1	510	dPHA <sub>SCL</sub> -Hydrolyse	TANIO et al., 1982
<i>Bacillus cereus</i>	186	nPHA <sub>SCL</sub> -Synthese und Hydrolyse	SKERMAN et al., 1980; DSM 31
<i>Bacillus megaterium</i>	184	nPHA <sub>SCL</sub> -Synthese und Hydrolyse	JAHNS und KALTWASSER, 1989; DSM 32
<i>Chromobacterium violaceum</i>	198	nPHV-Synthese und Hydrolyse	STEINBÜCHEL et al., 1993; DSM 30191
<i>Comamonas</i> sp.	575	dPHA <sub>SCL</sub> -Hydrolyse	JENDROSSEK et al., 1993a; DSM 6781
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	-	nPHA <sub>SCL</sub> -Synthese und Hydrolyse	RAMSAY et al., 1990; DSM 1034
<i>Paracoccus denitrificans</i>	272	nPHA <sub>SCL</sub> -Synthese und Hydrolyse	BANERJEE und SCHLEGEL, 1966; DSM 413
<i>Paracoccus denitrificans</i> N4	173	nPHA <sub>SCL</sub> -Synthese und Hydrolyse	Stammkultursammlung AG Steinbüchel
<i>Paucimonas lemoignei</i>	404	dPHA <sub>SCL</sub> -und nPHA <sub>SCL</sub> -Hydrolyse	DELAFIELD et al., 1965a, LMG 2207
<i>Pseudomonas medocina</i>	778	nPHA <sub>SCL</sub> -Synthese und Hydrolyse	TIMM und STEINBÜCHEL, 1990; DSM 50017
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	1336	PHA <sub>MCL</sub> -Synthese und Hydrolyse	ATCC 29347 ; DE SMET et al., 1983
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	1194	Wildtyp, prototroph, PHA <sub>SCL</sub> -Synthese und Hydrolyse	WILDE, 1962; DSM 428
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	1293	nPHA <sub>SCL</sub> -Synthese und Hydrolyse	IMHOFF et al., 1984; DSM 158
<i>Rhodospirillum rubrum</i> S1	1294	nPHA <sub>SCL</sub> - Synthese und Hydrolyse	ESMARCH, 1887; DSM 467

SK-Nr.: Stammkulturnummer in der Stammsammlung der Arbeitsgruppe D. Jendrossek.



**Tab. 2:** Verwendete Stämme und Klone von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*.

Stamm	SK-Nr.*	Relevanter Geno/Phänotyp	Referenz
<i>Bacillus subtilis</i> WB800	1735	<i>trpC2</i> , $\Delta$ <i>nprE</i> , $\Delta$ <i>aprE</i> , $\Delta$ <i>epr</i> , $\Delta$ <i>vpr</i> , $\Delta$ <i>bpf</i> , $\Delta$ <i>mpr::ble</i> , $\Delta$ <i>nprB::bsr</i> , $\Delta$ <i>wprA::hyg</i>	WONG, pers. Mitteilung; MURASHIMA et al., 2002
<i>Bacillus subtilis</i> WB800 H4K1pWB980:: <i>phaZ7</i>	1729	nPHA <sub>SCL</sub> -Hydrolyse (pWB800:: <i>phaZ7</i> mit <i>sacB</i> - Signalsequenz); Referenzsequenzierung	diese Arbeit
<i>Bacillus subtilis</i> WB800D6K1pWB980:: <i>phaZ7</i>	1730	nPHA <sub>SCL</sub> -Hydrolyse (pWB800:: <i>phaZ7</i> mit <i>sacB</i> - Signalsequenz)	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> HMS174	1170	pJM9238 (Cm), [ <i>phaCAB</i> PHB- Synthesegene aus <i>Ralstonia</i> <i>eutropha</i> H16], pBluescript KS: <i>phaP</i> (Ap); PHB-Speicherung	KIDWELL et al., 1995
<i>Escherichia coli</i> HMS174	1328	pJM9238 (Cm), [ <i>phaCAB</i> PHB- Synthesegene aus <i>Ralstonia</i> <i>eutropha</i> H16, ohne <i>phaP</i> ], PHB-Speicherung	KIDWELL et al., 1995
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	517	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> <sup>-</sup> [F', <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>h</sup> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, Tn10 (Tc <sup>r</sup> )]	BULLOCK et al., 1987
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	1818	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>dcoR</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rk</i> <sup>-</sup> <i>mk</i> <sup>-</sup> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\lambda$ <sup>-</sup> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA</i> <sup>-</sup> <i>argF</i> )U169, F <sup>-</sup> $\phi$ 80d, <i>lacZ</i> $\Delta$ M15	HANAHAN, 1983, Fa. Gibco BRL, Eggenstein
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ K93	1802	pBKS-:: <i>phaZRr</i> antiparallel zum <i>lac</i> -Promotor orientiert	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ K368	1807	Aktivator- / Protease- abhängige nPHA <sub>SCL</sub> - Hydrolyse; pBKS-:: <i>phaZRr</i>	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ KS <sup>-</sup> <i>phaZ7</i>	1776	nPHA <sub>SCL</sub> -Hydrolyse ( <i>phaZ7</i> +123 bp upstream)	diese Arbeit

SK-Nr.: Stammkulturnummer in der Stammsammlung der Arbeitsgruppe D. Jendrossek.

**Tab. 3:** Verwendete und konstruierte Plasmide.

Plasmid	Relevante Eigenschaft/Genotyp	Referenz/Herkunft
pBluescript KS <sup>-</sup>	Ap <sup>r</sup> , <i>lacPOZ'</i> ; f1(-) origin, ColE1 origin (pUC19 Derivat)	Fa. Stratagene (La Jolla, CA, USA)
pBluescript SK <sup>-</sup>	Wie pBluescript KS <sup>-</sup> , jedoch „multiple cloning site“ in entgegengesetzter Orientierung	Fa. Stratagene (La Jolla, CA, USA)
pBKS <sup>-</sup> [FWD70-REV81]	pBKS <sup>-</sup> ::0,95 kbp PCR-Fragment <i>P. lemoignei</i>	diese Arbeit, SK 2208
pBKS <sup>-</sup> [FWDOUT81-REVNSTOP]	pBKS <sup>-</sup> ::0,6 kbp PCR-Fragment <i>P. lemoignei</i>	diese Arbeit, SK 2209
pBKS <sup>-</sup> [FWD128-REVOUT368]	pBKS <sup>-</sup> ::0,5 kbp PCR-Fragment <i>Plem</i>	diese Arbeit, SK 2210
pBKS <sup>-</sup> [FWDHindIII-REVBamHI]	pBKS <sup>-</sup> ::1 kbp PCR-Fragment <i>P. lemoignei</i>	diese Arbeit, SK 1773
pBKS <sup>-</sup> [FWD-128HindIII-REVOUT368BamHI]	pBKS <sup>-</sup> ::1,3 kbp PCR-Fragment <i>P. lemoignei</i>	diese Arbeit, SK 2211
pBKSBglI	pBKS <sup>-</sup> ::0,6 kbp <i>BglI</i> -Fragment <i>Plem</i>	diese Arbeit, SK 1773
pBKS <sup>-</sup> <i>phaZ7</i>	pBKS <sup>-</sup> ::1,3 kbp HindIII/ <i>BamHI</i> -Fragment <i>phaZ7</i> (umkloniert aus pJOE890:: <i>phaZ7</i> )	diese Arbeit, SK 2212
pBKSZRrSonde	pBKS <sup>-</sup> ::0,46 kbp <i>EcoRV</i> PCR-Fragment <i>phaZRr</i> (FWD 513v1/Rev35v2)	diese Arbeit, SK 1796
pBKS <sup>-</sup> <i>SallphaZRr</i>	pBKS <sup>-</sup> ::2,1 kbp <i>Sall</i> -Fragment <i>R. rubrum</i>	diese Arbeit, SK 2213
pJOE890:: <i>mel</i>	Ap <sup>r</sup> , <i>ter</i> , <i>mel</i> , <i>ori</i> , (Replikation nur mit Insert)	J. ALTENBUCHNER, Universität Stuttgart, pers. Mitteilung
pJOE890:: <i>phaZ7</i> <sub><i>Plem</i></sub>	pJOE890:: <i>phaZ7</i> 1,3 kbp <i>EcoRV</i> PCR-Fragment <i>phaZ7</i>	diese Arbeit, SK 2214
pJOE890:: <i>phaZ7</i> <sub><i>Plem</i></sub>	pJOE890:: <i>phaZ7</i> 2,4 kbp <i>EcoRV</i> PCR-Fragment <i>phaZ7</i>	diese Arbeit, SK 2215
pJOE980[FWDPCR368-REVOUT344]	pJOE:: <i>phaZ7</i> 2,4 kbp <i>EcoRV</i> PCR-Fragment upstream <i>phaZ7</i>	diese Arbeit, SK 2206
pJOE890:: <i>phaZRr</i> -	pJOE890:: <i>phaZRr</i> 2,1 kbp <i>Sall</i> -Fragment <i>phaZRr</i>	diese Arbeit, SK1795
pWB980	Km <sup>r</sup> , Ble <sup>r</sup> , <i>sacB</i> SP, P43 Promotor	WU & WONG, 1999
pWB980 <i>phaZ7</i>	pWB980:: <i>phaZ7</i> 1,3 kbp HindIII/ <i>BamHI</i> PCR-Fragment <i>phaZ7</i>	diese Arbeit, SK 1729
pWB980 <i>phaZ7</i> UP	2,4 kbp HindIII/ <i>BamHI</i> PCR-Fragment upstream <i>phaZ7</i>	diese Arbeit, SK 2216

SK = Stammkulturnummer der Arbeitsgruppe JENDROSSEK

**Tab. 4:** Im Rahmen der Arbeit verwendete Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5' > 3')
<i>phaZ7</i> und flankierende Regionen aus <i>P. lemoignei</i>	
FWD-OUTSIDE	CGCTTACAATTTCCATTTCGC
FWD-PCR368	TCATTGAACCTGGCGACCG
FWD-PCR70	TCCTGCTGGGCGACCAAGAC
FWD-PRÄ	CGGCACCCTCGTCGCTCC
FWD-KRBS-EI	GGAATTCCTGGAGACAAAAGAATGATTTC
FWD-RBSEI	GGAATTCCTGGCGCACTAAATATTATTATTC
PWB980FWD <i>BAMHI-HINDIII</i>	GGTTCTAAATCGTGTTTTTCTTGG
PWB980REV <i>BAMHI-HINDIII</i>	GCAAAACAAGCAACAGTATTAACC
PWB980FWD- <i>SACI-ECORI</i>	ATGGCTGTATTTAAAAGTTCAAGC
PWB980REV- <i>SACI-ECORI</i>	GCAGAGGGCAGGTTTTTTTTG
FWD-IN	CGGTTCGAAAACCTATTACAACAG
SEQ-123 <i>HINDIII</i>	CCAAGCTTGCCAAATCAGCAGAGGGAAGA
FWDPCR368 <i>HINDIII</i>	CCAAGCTTTCATTGAACCTGGCGACCG
OUT344 <i>BAMHI</i>	CAGGATCCTTGTATTGCGCGGAACCCTGCTC
OUT368	GGGATTTGCCGGTATAAGCC
OUT368ORIG	GGGATTTGCCGGTATAAGCC
OUT386B	TCCACTTGGGATTTGCCG
REV1148	GCATAACGCCACCATCACGGG
REV1148 <i>ECORI</i>	CGGAATTCCTGGCATAACGCCACCATCACGGG
T3+2 <i>ECORI</i>	GCCTTAAGGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGG
FWD368	AGGCTTATACCGGCAAATCCC
REV332	GCATCGAATTGGTCGAGCCG
FWD70**	GCTCCGGGCGTGGGTTAC
REV81**	GTCTTGGTGCGGAAGTGG
OUT81	GCCACTTCCGCACCAAGAC
T3/+2	GCAATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
OUT70	GTAACCCACGCCCCGAGC
SEQ-123	GCCAAATCAGCAGAGGGAAGA
OUT344	TTGTATTGCGCGGAACCCTGCTC
FW <i>HINDIII</i>	GGAAGCTTTTTGCGCTGACTTGCGGCACC

**Tab. 4 (Fortsetzung):** Im Rahmen der Arbeit verwendete Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5' > 3')
<b><i>phaZ7</i> und flankierende Regionen aus <i>P. lemoignei</i></b>	
REVBAMHI	CAGGATCCTTAGTACGCGGCTTTAGGACCGG
Z7UP FWD1120 li	GGCGGAATCGGCGGACCATC
Z7UP REV1039 li	TTGCAATATGGGATGGCGGGAACG
Z7UP REV656 re	TTCCCGCCGCCCCAAAGAT
Z7UP FWD522 re	GCCGAACCAGAGCCGCACACG
Z7UP FWD02 re	TCGCCGCGCCATCCTCCAT
Z7UP REV153 re	CACCTGCTTGCCCTTGCTGCCTGAC
Z7UP FWD 781 li	GCTGGATCAACTTGCTGTCTG
Z7UP FWD 1149 re	AGCCAGCGTACTCAATCTTT
<b>degenerierte Primer:</b>	
FWD12/19**	AARGGXACXCARACICARTAYGC
FWD4/10A	GGXACXAAAYTCXGGITTYGT
FWD4/10B	GGXACXAAAYAGYGGITTYGT
REV41**	YTG DAT DAT NGC NCC IG TR TT
<b><i>phaZRe</i> aus <i>R. eutropha</i> H16</b>	
IPHBDEP INSERT-UNI**	ACCGCCAAGACCTTCACC
IPHBDEP INSERT-REV**	GCGCCGGCCCGAGAAGAT
<b><i>phaZRr</i> und flankierende Regionen aus <i>R. rubrum</i></b>	
ID-FWD625	CTGGTGAGTTCGCTTCAGG
ID-FWD132D	CTTGTTTTATGTGCCCGCCGACTG
ID-FWD513	CTGGCCATCGATGCCGATCATGT
ID-FWD132	CTTGTTTTATGTGCCCGCCGACTG
ID-FWD624	CGTTGGAACCCGAAGATGG
ID-FWD1778	GGTCGCCGGTGGTCTGTA
ID-REV212	CGATGATGAACAGCATGTCTG
ID-REV480	CGACATGGAAGTATGGC
ID-REV556	GAGCATCGGCACGGTCTG
ID-REV35	GTCAGAAAGGCGTGACCGGCCTT
ID-REV 979	GCCATAGCCCCACCAGTTC

**Tab. 4 (Fortsetzung):** Im Rahmen der Arbeit verwendete Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5' > 3')
<i>phaZRr</i> und flankierende Regionen aus <i>R. rubrum</i>	
<b>degenerierte Primer:</b>	
ID-FWD613v1	TTRGCNATHGAYGCIGAYCAYGT
ID-FWD613v2**	CTNGCNATYGAYGCIGAYCAYGT
ID-REV29v1	CCDATYAANACRTCNGTIGCYTT
ID-REV29v2	CCDATNAGNACRTCNGTIGCYTT
ID-REV35v1	GTYAARAANGCRTGNCCIGCYTT
ID-REV35v2**	GTNAGRAANGCRTGNCCIGCYTT

Legende: FWD: forward; REV: reverse; OUT: vom Strukturgen nach außen orientiert; Z7UP: stromaufwärts von *phaZ7*; ID, *phaZRr* aus *R. rubrum* zugehöriger Primer. \*\* Einsatz für die Herstellung von Oligonukleotidsonden.

## 2.2. Nährmedien

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, vor dem Einsatz durch 20 minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert. Feste Medien enthielten 1,5 % (w/v) Agar. Für Komplexmedien wurde Japan-Agar, für definierte mineralische Medien Oxoid-Agar Nr. 5 verwendet.

### 2.2.1. Definierte Mineralische Medien

#### Mineralmedium (MM) nach SCHLEGEL et al. (1961) [modifiziert]

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	9,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,02 g
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,2 mg
Spurenelementlösung SL6 (PFENNIG, 1974), 100-fach	0,1 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml
pH 7,0	

Der Ansatz des Mediums erfolgte ausgehend von folgenden getrennt autoklavierten Stammlösungen:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O} / \text{KH}_2\text{PO}_4$	10-fach
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1000-fach
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O} / \text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	1000-fach
$\text{NH}_4\text{Cl}$	100-fach

**Spurenelementlösung SL6 nach PFENNIG (1974; 100-fach konzentriert)**

$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1 g
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,3 g
$\text{H}_3\text{B O}_3$	3 g
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	2 g
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{Na}_2\text{MO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,3 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml

**Mineralmedium nach NAKAYAMA et al. (1985), STINSON und MERRICK (1974), modifiziert**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$	5,8 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,3 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	5 mg
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml
pH 6,8 (HCl)	

***Rhodospirillum rubrum*-Mineralmedium nach PFENNIG (1978), modifiziert**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
Hefeextrakt	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	0,4 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,4 g
Vitamin B <sub>12</sub> -Stammlösung (100 mg/l)	0,08 ml
SL7 (PFENNIG, 1978)	1,0 ml
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O [5 % (w/v)]	1,0 ml
Fe-(III)-Citrat [0,5 % (w/v)]	1,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

Das *R. rubrum*-Mineralmedium (mit Ausnahme der Vitamin B<sub>12</sub>-Stammlösung) wurde nach Lösen aller Komponenten komplett autoklaviert. Ausfällungen lösten sich nach dem Abkühlen unter Rühren. Als C-Quelle wurde Na-Acetat (1,646 g/l) eingesetzt. Die Vitamin B<sub>12</sub>-Stammlösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter, Satorius AG, Göttingen) und erst bei Beimpfen der Medien zugegeben.

**Spurenelementlösung (SL7) nach PFENNIG (1978)**

HCl [25 % (v/v)]	1 ml
ZnCl <sub>2</sub>	70 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	100 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	60 mg
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	200 mg
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	20 mg
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	20 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	40 mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

**Definiertes Medium zur Anzucht von *Bacillus subtilis***

Alle Angaben beziehen sich auf 1000 ml Lösung.

**Lösung 1:**

Casaminosäuren	20 g
Bacto Hefeextrakt	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 g
Lysin	1,5 g
Methionin	1,5 g
Argingin	1,5 g
Glycerol (50%)	20 ml
Thiamin (10 mg/ml)	10 ml
pH 7,5 (HCl)	

**Spurenelementlösung SLBS (20x)**

MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	44,0 mg
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10,0 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10,0 mg
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,5 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,5 mg
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,92 mg
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 ml

**Castenholz Stammlösung (10x)**

Nitrilessigsäure	1,0 g
CaSO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,6 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g
NaCl	0,08 g
KNO <sub>3</sub>	1,03 g
NaNO <sub>3</sub>	6,89 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,11 g
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	4,7 mg

Die Lösungen wurden separat autoklaviert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur vereinigt (50 ml SLBS, 100 ml Castenholz, 850 ml Lösung 1).



**Kompetenz- und Transformationsmedium für *B. subtilis* WB800****SP1-Medium**

NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	18,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
Na-Citrat x 2 H <sub>2</sub> O	1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
D(+)-Glukose	5 g
Casaminosäuren	0,2 g
Hefeextrakt	1 g
Histidin	50 mg
Tryptophan	50 mg
Uracil	50 mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	1000 ml

Die Aminosäuren wurden als separate sterilfiltrierte Stammlösungen (1000 x) zugesetzt.

**SP2-Medium**

SP1-Medium

CaCl <sub>2</sub>	0,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM

**Allgemeine Modifikationen**

Zum Zwecke der Induktion einer PHA-Speicherung wurde der NH<sub>4</sub>Cl-Gehalt aller verwendeten Medien auf 0,05% (w/v) reduziert.

Die Bereitung fester Mineralmedien erfolgte durch getrennten jeweils doppelt konzentrierten Ansatz von Agar- und Nährlösung. Beide Lösungen wurden erst nach separatem Autoklavieren zusammengegeben.

Für heterotrophes Wachstum wurden getrennt autoklavierte oder sterilfiltrierte Kohlenstoffquellen in den jeweils angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Glucose und Fructose wurden als 25 % (w/v) sterilfiltrierte, Natriumgluconat als 40 % (w/v) und Na-Octanoat als 15 % (w/v) autoklavierte Stammlösung mit bidestiliertem Wasser hergestellt. Na-3-hydroxybutyrat wurde ebenfalls als Stammlösung [20 % (w/v) in zweifach destilliertem Wasser] angesetzt und sterilfiltriert.

**2.2.2. Komplexmedien****Luria-Bertani (LB)-Medium nach SAMBROOK et al. (1989)**

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1000 ml
pH 7,5	

Für die Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde die NaCl Konzentration halbiert („low salt“ LB, LSLB). Für die Anzucht von pBluescript-Vektoren tragenden rekombinanten Klonen wurden dem Medium maximal 1 mM IPTG und 1,5 ml 2 % (w/v in N,N-Dimethylformamid) X-Gal zugesetzt.

**Nutrient broth (NB)**

Nutrient broth	8 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1000 ml

**Tryptose-Blood-Agar-Base (TBAB-Agar)**

TBAB-Agar	33 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1000 ml

**Super-Rich-Medium nach HALLING et al. (1977)**

Bacto Tryptose	25 g
Bacto Hefeextrakt	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
H <sub>2</sub> O bidest	ad 1000 ml
pH 7,5	

**PY I –Hochzelldichtemedium für Anzuchten von *Rhodospirillum rubrum***

Merck-Pepton aus Fleisch # 7224	5 g
Difco-Pepton	5 g
NaCl	5 g
Yeast extract	5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	200 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Stammlösung	5 ml
SL 8 modifiziert (Stammlösung)	1ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Stammlösung (500-fach):

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

**Spurenelementlösung (SL8) nach PFENNIG (1977), modifiziert, 1000-fach**

Na <sub>2</sub> -EDTA	5,2 g
FeSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,5 g
ZnCl <sub>2</sub>	70 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	100 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	62 mg
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	190 mg
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	17 mg
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	24 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	36 mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
pH 6,5	

**2.2.3. Isolierung von parakristallinen Polyhydroxyalkanoaten**

Zur Isolierung von denaturierter PHA<sub>SCL</sub> wurde die Natriumhypochlorit-Methode nach JENDROSSEK et al. (1993b) angewendet. 100 g unter PHA Speicherbedingungen mit nur 0,05 % (w/v) NH<sub>4</sub>Cl nach 2.4.1. angezogene, lyophilisierte und fein gemörserte Zellen von *R. eutropha* H16 [2 % (w/v) Na-Gluconat zur PHB-Bildung] und *Chromobacterium violaceum* [0,8 % (w/v) Na-Valerat zur PHV-Biosynthese, STEINBÜCHEL et al., 1993] wurden 3,5 Tage in 4 Litern 5 % (v/v) Natrium-Hypochloritlösung bei Raumtemperatur gerührt. Freigesetztes PHA wurde abzentrifugiert (Beckmann Avanti™ J-25, Rotor JA10, 10800 x g, 20 min, Raumtemperatur), das Pellet 6 x mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und einmal mit 96 % (v/v) Ethanol gewaschen, um Chlorrückstände zu entfernen. Anschließend wurde das Polymer unter Vakuum bei 35°C für 12 h getrocknet (Vakuumofen VTR 5036, Heraeus, Hanau). Zur weiteren Reinigung wurde das PHA in einer Soxhlet-Apparatur mit einem Gemisch aus Aceton/Ether (2:1, v/v) extrahiert. Das nach 3 Tagen in der Extraktionshülse verbliebene reine Polymer wurde entnommen und über Nacht im Vakuumofen getrocknet.

**2.2.4. Herstellung von Polymerstammlösungen**

Ausgehend von fein zermörsertem gesiebten PHB oder PHV (gewonnen nach 2.2.3.) wurde eine 3 % (w/v) Polymerstamm suspension in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> über Nacht gerührt und anschließend mit Hilfe eines MSE Ultrasonic Desintegrator MK2 (20 micron, 1 min/6 ml) bei Verwendung einer 9 mm starken Sonde

unter Kühlung in einem NaCl enthaltenden Eisbad durch Ultraschall weiter homogenisiert, um eine stabile PHB-Suspension zu erhalten. Diese Suspension wurde im Falle von PHB 10 min bei 121 °C sterilisiert und bei 4°C gelagert.

P(3HO) und andere PHA<sub>MCL</sub> wurde in einer Konzentration von 2 % (w/v) in Aceton gelöst und mit Hilfe eines Scheidetrichters kontinuierlich in 0,25 Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> getropft. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer abgezogen und die milchig trübe Suspension für 10 min autoklaviert. Die Absolutkonzentration an Polymer wurde durch Trockenmassebestimmung überprüft.

40 g Poly(ε-caprolacton) (PCL) wurde bei 60°C in 100 ml Aceton gelöst und mittels eines Tropftrichters in 0,5 Volumen auf 60°C temperiertes H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> unter stetigem Rühren eingetropft. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer evaporiert, die PCL-Stammlösung 10 min bei 121 °C sterilisiert und ebenfalls bei 4°C gelagert.

### 2.2.5. Herstellung von Polymeragarplatten

Das Gießen von PHA-Agarplatten erfolgte in Form eines „Sandwich“ aus zwei Schichten. Die untere Schicht bestand aus 1,5 % (w/v) Mineral- oder Komplexagar (20-25 ml). Die PHA-enthaltende Schicht wurde durch Mischung der beschriebenen PHB/PHV- [3 % (w/v)] Stammsuspension mit einfach konzentriertem Mineralagar im Verhältnis 1:10 bzw. mit doppelt konzentriertem Mineralagar im Verhältnis 1:1 mit P(3HO)- [0,8 % (w/v)] Stammlösung hergestellt („overlay“-Agar). Nach Verfestigung der unteren Schicht erfolgte die Zugabe von 8 ml „overlay“-Agar pro Platte.

Zur qualitativen Bestimmung von Enzymaktivitäten mit extrazellulärem PHA wurden spezielle Polymer-Aktivitätsagarplatten präpariert. [15 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8,0; bzw. pH 9,0), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,3 % PHA, 1,5 % Agar]. Im Falle von PCL Polymerendkonzentration bei 0,4 % (w/v).

### 2.2.6. Herstellung von nPHA<sub>SCL</sub>-Agarose-Testplatten

Zum Nachweis von nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymeraseaktivität mittels Tropftest wurden 1 bis 10 µl Enzymlösung oder umgepufferte native Polyacrylamidgele auf in Agarose eingebettet amorphe Polymergranula aufgebracht. Zur Erstellung der Testplatten wurden 45 mg nPHA<sub>SCL</sub> mit je 20 ml 2,5 % Agarose in Tris-HCl (100 mM, pH 9,0, 1 mM CaCl<sub>2</sub>; abgekühlt auf 45°C) suspendiert und in Petrischalen gegossen. Für Tests auf PhaZRR-Aktivität war eine Vorbehandlung der Polymergranula mit 25 µl Aktivator oder Trypsin/Ovomucoid nach 2.10.1.3. erforderlich.

### 2.2.7. Antibiotika

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden nach SAMBROOK et al. (1989) angesetzt, sterilfiltriert und nach dem Aliquotieren bei -20 °C gelagert. Der Zusatz zu den verwendeten Medien erfolgte nach deren Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50 °C in den Tabelle 5 zu entnehmenden Endkonzentrationen.

**Tab. 5:** Antibiotika, Stammlösungen und Endkonzentrationen.

Antibiotikum	Stammlösung (mg/ml)	Endkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ampicillin (Ap)	120 (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ )	100-200
Chloramphenicol (Cm)	34 (in 96 % EtOH)	34
Kanamycin (Km)	100 (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ )	10 - 25 ( <i>B. subtilis</i> ) 50 ( <i>E. coli</i> ) 300-500 ( <i>R. eutropha</i> )
Tetracyclin (Tc)	12,5 (in 50 %, v/v EtOH)	12,5

### 2.3. Stammhaltung und Konservierung

#### 2.3.1. Kurzfristige Lagerung

Alle Organismen wurden auf festen Nährböden gehalten. Nach Inkubation bei entsprechender Wachstumstemperatur erfolgte eine Versiegelung der Petrischalen mit Parafilm und eine anschließende Aufbewahrung bei 5-8 °C.

In etwa dreiwöchigem Abstand wurden die Mikroorganismen bis maximal viermal auf frische Agarplatten überimpft.

#### 2.3.2. Längerfristige Konservierung

Alle verwendeten Stämme wurden langfristig als Lyophilisate aufbewahrt. Zu diesem Zwecke wurden Zellen des betreffenden Stammes von einer dicht bewachsenen Agarplatte [LB (*R. pickettii* T1), NB (*R. eutropha*), 3-HB-MM (*P. lemoignei*)] mit 1,5 ml einer sterilen Lösung aus 10 % (w/v) Skimmlark und 5 % (w/v) meso-Inosit abgeschwemmt. Die entstandene Suspension wurde mit 10-15 sterilen Filterpapier-Testplättchen aufgenommen und in sterilen Zentrifugenröhrchen (Watteverschluss) bei -20 °C eingefroren. Lyophilisiert wurden die Plättchen in einer Gefriertrocknungsanlage vom Typ 1120 (Christ, Osterode). Die Lagerung der getrockneten Plättchen erfolgte in kleinen sterilen Schraubdeckelgläschen mit Watte über getrocknetem Kieselgel (Trockenmittel) bei -70 °C.

Zur Reaktivierung eines konservierten Stammes wurden ein bis zwei Testplättchen in 10 ml geeignetem Nährmedium über Nacht bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert.

Die Aufbewahrung von *E. coli*-Stämmen erfolgte in einer Suspension mit Glycerol. Über Nacht in LB-Medium bei 37 °C angezogene Zellen wurden in Schraubdeckelröhrchen in Gegenwart von 15 % (v/v) Glycerol in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70 °C gelagert. Für alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme erwies sich eine Kryokonservierung in 50 % (v/v) Glycerol generell als geeignete Methode. So konservierte Stämme waren mindestens 2,5 Jahre vital.

### 2.4. Zellkultivierung und Reinheitskontrolle

Mikroorganismen wurden entsprechend den nachfolgenden Angaben kultiviert. Zu Beginn und nach Beendigung eines Versuches wurden Reinheitskontrollen durch Verdünnungsausstriche des

betreffenden Stammes auf Agarplatten durchgeführt. Geprüft wurde die Einheitlichkeit der Koloniemorphologie. Ergänzung fand dieses Vorgehen in einer routinemäßigen mikroskopischen Kontrolle der Zellmorphologie und Kulturhomogenität im Phasenkontrastmikroskop.

#### 2.4.1. Zellanzucht zur Gewinnung von nPHA aus Wildtypstämmen

Die Zellanzucht für PHA-Abbauversuche fand über mehrere Vorkulturen statt. Ausgehend von einer gut bewachsenen NB- bzw. LB-Agarplatte (im Falle von *P. lemoignei* Mineral-Agar mit 0,3 % 3-HB als C-Quelle) wurde eine erste 2 % (w/v) Na-Gluconat [*P. lemoignei*: 0,5 % (w/v) 3-HB; *Chromobacterium violaceum*: sukzessive 2 x 0,3 % (w/v) Na-Valerat; *Pseudomonas oleovorans* 0,5 % (v/v) Natriumoctanoat] enthaltende Mineralmedium-Vorkultur beimpft. Die über Nacht gewachsene erste Vorkultur wurde am Folgetag komplett in eine weitere Vorkultur des zehnfachen Medienvolumens überführt. Für Volumina von 10 bis 500 ml kamen Erlenmeyerkolben (100 - 2000 ml) zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler (Infors AG, Basel, Schweiz) oder in einem Schüttelwasserbad (Gyrotory Water Bath Shaker, Model G76, New Brunswick, USA). Alle Vorkulturen sowie die sich anschließende erste Hauptkultur enthielten 0,05 % (w/v) Ammoniumchlorid und hatten einen pH-Wert von 6,8, um eine maximale PHA-Speicherung zu erreichen. Die Hauptkultur (100 - 2500 ml) wurde in Klettkolben mit Schikanen oder 2 bzw. 4 Liter Zweihalsrundkolben, welche neben einem Probenahmeaufsatz einen Belüftungsaufsatz mit Fritte besaßen inkubiert. Im Falle von *C. violaceum* wurde nach 10 Stunden 0,3 % (w/v) Na-Valerat; bei *P. oleovorans* 0,25 % (v/v) Natriumoctanoat steril nachgefüttert. Die Ernte der PHA-reichen Zellen für die Isolation nativer PHA-Granula (s. 2.12.) erfolgte in der Regel nach 48 h Inkubation. Bis zu einem Kulturvolumen von 100 ml wurde eine Sigma Laborzentrifuge (Sigma 4K10, Rotoren 11140 bzw. 12166, Sigma Laborzentrifugen, Osterode) bei 5000 x g (15 bis 30 min) verwendet. Alle größeren Kulturen wurden in einer Sorvall Zentrifuge (Typ RC-5B, Rotor GS3, Du Pont de Nemours, Newton, Conn., USA) bei 5500 Rpm für 10 bis 30 min unter Kühlung (4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in einem dem Ausgangskulturvolumen analogen Volumen Puffer (100 mM KP, pH 7,0) gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in Puffer resuspendiert.

#### 2.4.2. Anzucht von *E. coli* HMS174 zur Gewinnung rekombinanter nPHB-Granula

*E. coli* HMS174 (pJM9238) und *E. coli* HMS174 (pJM9238, pBlueKS::*phaP*) wurden in 20 ml LB Medium mit 0,2 % (w/v) Glukose und Chloramphenicol (34 µg/ml) sowie Ampicillin (100 µg/ml, nur pBlueKS::*phaP* tragender Stamm) für 8 h bei 30°C und nach Überimpfen in 200 ml Kultur weitere 120 min inkubiert. Im Anschluß wurden 2 x 1 Liter auf 41°C temperiertes LB Medium [2 % (w/v) Glucose] mit je 100 ml der unmittelbar zuvor auf 34°C erwärmten zweiten Vorkultur beimpft und die Ansätze unverzüglich für 20 min bei 39°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Temperatur auf 37,5°C gesenkt und im Falle des *phaP* tragenden Stammes 1 mM IPTG zugesetzt. Nach 48 h bei 37,5°C und Kontrolle der erfolgreichen PHB-Bildung (Kontrolle im Phasenkontrastmikroskop; Nilrotfärbung und Fluoreszenzmikroskopie) wurden die Zellen abzentrifugiert, in 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen

und nach Zellaufschluß (s. 2.5.2.) die nPHB-Granula mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert (s. 2.12.).

#### **2.4.3. Anzucht von *P. lemoignei* zur Gewinnung extrazellulärer PHA Depolymerasen**

Ausgehend von 2 x 50 ml über Nacht inkubierten Vorkulturen ( $OD_{650} > 1$ , NAKAYAMA-Mineralmedium, pH 6,5, s. 2.2.1.) mit 0,5 % (w/v) Natrium-3-Hydroxybutyrat wurden 2 x 500 ml MM-Kulturen mit 0,4 % (w/v) Succinat und 0,1 % 3-HB (pH 6,5) im 500 ml Erlenmeyerkolben angezogen. Mit je 100 ml dieser Vorkulturen wurden 10 x 1 Liter MM-Hauptkulturen (pH 6,8) in 5 Liter-Schikanekolben mit 1,35 % (w/v) Succinat als alleiniger C-Quelle 1:10 inokuliert. Nach 80 h ( $OD_{650} > 3,5$ , pH > 8) wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 x g, Rotor JA10, Beckmann). Die Bildung der PHA-Depolymerasen wurde mit Tropftests auf nPHB- und dPHB Aktivitätsplatten (2.2.5.) sowie im Trübungstest (2.10.1.2.) mit nativen PHB-Granula überprüft. Tropftest mit 1 µl Kulturüberstand zeigten sowohl mit dPHB als auch mit nativen PHA-Granula nach 15 min/ 37°C charakteristische Aufklarungszonen.

#### **2.4.4. Photoheterotrophe Anzucht von *R. rubrum* zur Gewinnung von nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase**

Für präparative Enzymreinigungen wurden 5 x 10 ml PYI-Komplexmedium (2.2.2.) in Pyrex-Schraubdeckelgläschen (10 ml) mit je 250 µl Glycerolstammkultur beimpft und bei 1000 Lux im Licht bei 30°C inkubiert. Nach 36 Stunden erfolgte die vollständige Überführung der Vorkulturen in 5 x 1 Liter MM, 0,16 % (w/v) Natriumacetat (s. 2.2.1.), mit anschließender 18 bis 26 h Inkubation im Licht unter anaeroben Bedingungen. Zur abschließenden photoheterotrophen Anzucht wurden 5 x 20 Liter Glasfermenter (Mineralmedium, 0,16 % (w/v) Natriumacetat, pH 6,8) mit einer  $OD_{680\text{ nm}}$  von 0,1 aus der zweiten Vorkultur beimpft. Die Beleuchtung erfolgte mittels 60 Watt-Glühlampen (3 x 1000 Lux/Kolben). Zum Ausschluß von Sauerstoff wurde unter einer Atmosphäre aus 93 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 2 % H<sub>2</sub> oder 95 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Ansätze wurden kontinuierlich durchmischt und über ein Innenkühlsystem auf 29°C temperiert. Die Einhaltung anaerober Bedingungen konnte anhand purpurfarbener Pigmentierung der Zellen verfolgt werden.

#### **2.4.5. Trübungsmessungen**

Zur routinemäßigen Bestimmung der Kulturdichte wurde die Messung entsprechender Proben im Klett-Photometerkolben an einem Klett-Summerson-Colorimeter (Klett, New York, USA) oder einem Spektralphotometer (Typ PM4, Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) ausgeführt.

Die Ermittlung der optischen Dichte (OD) von Suspensionen nativer Granula erfolgte bei einer Wellenlänge von 650 nm. Die von Bakteriensuspensionen bei 495, 500 oder 600 nm. Bei einer  $OD_{650} > 0,3$  wurden Suspensionen von Mikroorganismen mit isotonischer NaCl (0,9 % w/v) oder den entsprechenden Medien verdünnt. Die verwendeten Plastikküvetten besaßen eine Schichtdicke von 1 cm.

#### 2.4.6. Lithoautotrophe Anzucht von *Ralstonia eutropha* H16

Stämme von *Ralstonia eutropha* wurden hinsichtlich ihrer Verwertung von Formiat (1 % (w/v) in MM) überprüft. Die Fähigkeit von *Ralstonia eutropha* H16 (im Gegensatz zum Megaplasmid freien Stamm *R. eutropha* HF210) lithoautotroph in einer H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>-Atmosphäre zu wachsen, wurde als zusätzliches Kriterium zur Überprüfung der Reinheit des Stammes herangezogen. Auf festem NB-Medium angezogene Zellen wurden auf reine Mineralagarplatten mit 0,01 Volumen einer 5 %-igen (w/v) NaHCO<sub>3</sub>-Lösung übertragen und im Exikator unter einer Atmosphäre aus etwa 80 % H<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> und 10 % O<sub>2</sub> bei 30 °C inkubiert.

Die nach 5 Tagen sichtbaren Kolonien wurden zusätzlich auf definiertes Festmedium mit 0,4 % Glucose übertragen, welche von diesem Stamm charakteristischerweise nicht als C-Quelle zum Wachstum genutzt werden kann.

#### 2.4.7. Anzucht von *P. lemoignei* auf Tyrosin

Zur eindeutigen Identifizierung von *P. lemoignei* wurde festen Mineralnährböden mit 0,3 % PHB Tyrosin in einer Endkonzentration von 0,05 % (w/v) zugesetzt. Tyrosin wurde als 1 % (w/v) Stammlösung (pH~1) angesetzt, 5 min autoklaviert und dem Medium unmittelbar vor dem Gießen der Agarplatten zugefügt. Während des Wachstums gebildetes Melanin führt zu einer charakteristisch dunklen Färbung der Agarplatten und der Kolonien. Die verwendeten Stämme zeigten ohne Zusatz von Poly(hydroxyalkanoaten) oder organischen Säuren kein Wachstum auf Komplexmedien.

#### 2.4.8. Reinheitskontrolle für *Rhodospirillum rubrum*, photoheterotrophe Anzucht

*R. rubrum* wurde auf festen Nährböden mit komplexen Medien (s. 2.2.2.) aerob im Dunkeln, oder anaerob im Licht auf Rhodospirillaceen-Medium (s. 2.2.1.) bei jeweils 30°C angezogen. Die photoheterotrophe Anzucht erfolgte unter einer Atmosphäre von etwa 93 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 2 % H<sub>2</sub> im Exikator bei zweiseitiger Beleuchtung mit etwa 1000 lux. Bei aerober Anzucht konnte man nach etwa 2 Tagen im Zentrum schwach rot gefärbte Kolonien erkennen. Unter anaeroben Bedingungen lag die Inkubationszeit bei 5 bis 7 Tagen. Die hierbei gebildeten Kolonien wiesen eine homogen purpurrote Färbung auf. Morphologisch unterschieden sich die für LB-Medien charakteristischen spirillenförmigen Zellen von den deutlich kürzeren nur ein- bis zweifach gekrümmten Zellen auf Mineralmedien.

### 2.5. Zellaufschluß

In Abhängigkeit von der gewonnenen Probenmenge erfolgte der Aufschluß der Zellen entweder durch Ultraschall (bis 10 ml), oder bei größeren Probenvolumina mittels einer French Presse, sowie einer Kombination der „Freeze-thawing“-Methode und enzymatischem Aufschluß. Die gewaschenen Zellpellets wurden in 5 Volumina Puffer (KP 100 mM, pH 7,0 oder Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert.



### **2.5.1. Zellaufschluß durch Ultraschall**

2-40 ml der resuspendierten Zellen wurden in Reagenzglaschen der Fa. Pyrex überführt und mit einem MSE Ultrasonic Desintegrator (Typ MK2, Measuring & Scientific Equipment, Crawley, Sussex, England) bei 150 W mit einer 9 mm starken Sonde für 2 min/ml unter ständiger Kühlung im Eis-NaCl- bzw. Aceton-H<sub>2</sub>O-Gemisch beschallt (Cycles: 30, Amplitude: 40%). Einem Beschallungsintervall von maximal 2 min folgte eine ebensolange Abkühlungspause. Für den Aufschluß kleiner Proben (< 2 ml) wurde eine 3 mm starke Mikrosonde verwendet.

### **2.5.2. Zellaufschluß mittels French Presse**

Der Aufschluß größerer Probenmengen erfolgte durch dreimalige Passage einer vorgekühlten French Presse (Fa. AMINCO, Silver Spring, Maryland, USA) bei einem Druck von 95 MPa. Den Proben wurde 10 µg/ml DNase I (Boehringer Mannheim) zugesetzt. Es erfolgte stetes Kühlen der Probe im Eisbad.

Zur Herstellung von Rohextrakten und zur Trennung löslicher und partikulärer Fraktionen wurden die aufgeschlossenen Zellsuspensionen auf ein Glycerolpolster (90 %, v/v) aufgebracht und bei 36000 Rpm (160000 x g, Schwenkbecherrotor SW41; 4 °C) 45 min in der Ultrazentrifuge (Sorvall OTD-50B, Du Pont de Nemours, Newton, Conn., USA) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für anschließende Untersuchungen (Proteinbestimmung, Enzymaktivitäten) bei 0-4 °C in Eis gelagert. Zur Gewinnung nativer PHA-Granula wurde die partikuläre Fraktion weiterverwertet (s. 2.12).

### **2.5.3. Kombiniertes Zellaufschluß**

Insbesondere für Kulturen von *R. rubrum* erwies sich ein alternatives Aufschlußverfahren als geeignet. 5 ml frisches Zellpellet wurde in 10 ml einer Aufschlußlösung aus 20 mM Puffer (z.B. KP, pH 7,0; Tris-HCl, pH 8,0), 5 mM EDTA, 20 % (w/v) Saccharose sowie 0,2 mg/ml Lysozym aufgenommen und 45 min bei 8°C unter Durchmischen inkubiert. Nach Zugabe von 780 µl 5 M NaCl wurde der Ansatz bei -70°C eingefroren und unter stetigem Durchmischen nach Zugabe von 10 Volumen 20 mM Puffer in einem auf 37°C temperierten Wasserbad rasch aufgetaut und anschließend auf 4°C gekühlt. Die abschließende Passage einer vorgekühlten French Presse (Fa. AMINCO, Silver Spring, Maryland, USA) bei einem Druck von 95 MPa führte zum vollständigen Zellaufschluß. Den Proben wurde erforderlichenfalls 1 µg/ml DNase I (Boehringer Mannheim) zugesetzt.

## **2.6. Anreicherung und Reinigung von Proteinen**

### **2.6.1. Ammoniumsulfatfällung**

Für die Aufkonzentrierung von Proteinlösungen wurde den betreffenden Proben unter stetiger Durchmischung auf Eis kontinuierlich fein gemahlene Ammoniumsulfat bis zu einer

Sättigungskonzentration von maximal 90 % zugesetzt. Nach 20 min wurde das ausgefallene Protein bei 15000 x g (Avanti™ J-25 Zentrifuge, Beckmann; 11500 U/min, Rotor SS34 oder 9600 Upm, Rotor JA 10) bei 4 °C bis zu 30 min pelletiert und in 10 bis 30 % des Ausgangsvolumens resuspendiert. Zur Entfernung des verbliebenen Ammoniumsulfates wurde unter mindestens dreifachem Pufferwechsel jeweils gegen mindestens das 10fache Puffervolumen dialysiert (Visking® Dialysistube 36/22; Durchmesser 27 mm, Serva, Heidelberg) oder in Amicon-Konzentratorrührzellen über regenerierten Zellulosemembranen diafiltriert (Membran YM10, 10 kDa Ausschlußgrenze).

Die fraktionierter Ammoniumsulfatfällung diente der initialen Reinigung von Proteingemischen. Die Ansätze wurden wie angegeben beginnend mit der niedrigsten gewünschten  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Konzentration successive gefällt, ausgefallenes Protein durch Zentrifugation abgetrennt und der verbliebene Überstand nach GREEN und HUGHES (1955) bis zum Erreichen der nächsten Sulfatsättigungsstufe aufgesalzen. Abschließend wurde die Probe bis zur Ausfällung des zu reinigenden Proteins mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  versetzt, nach dem angegebenen Protokoll konzentriert und einem Pufferwechsel unterzogen.

### 2.6.2. Ultrafiltration

Die Konzentrierung und Diafiltration von proteinhaltigen Lösungen bis 2,5 ml erfolgte in Amicon Centricon® Konzentratoren bis 15 ml in Amicon Centriplus® Konzentratoren, (YM-Membranen, Ausschlußgrenzen 3, 10 oder 30 kDa), durch Zentrifugation im Festwinkel- oder Swing-out-Rotor mit 5000 x g bei 4°C. Zur quantitativen Rückgewinnung des Proteins wurden die Röhrchen mit 20 bis 250 µl des erforderlichen Puffers in invertierter Lage bei 1200 x g „gewaschen“. Größere Volumina wurden in einer Amicon Diflaco-Kammer (MILLIPORE GmbH, Schwalbach) über Flachmembranen aus regenerierter Zellulose (YM10) eingeengt.

### 2.6.3. Säulenchromatographie

Für die präparative säulenchromatographische Proteintrennung wurden C-Typ Säulen verschiedener Durchmesser (0,5; 1,0; 1,6; 2,6 und 8 cm) der Firma Amersham Pharmacia Biotech GmbH (Freiburg) verwendet. Neben fertig gegossenen kamen selbst gepackte Chromatographiesäulen zum Einsatz. Das Säulenmaterial wurde über einen Glasfilter und eine passende Absaugflasche nacheinander mit den angegebenen Lösungen gewaschen und im entsprechenden Säulenpuffer äquilibriert. Das Absaugen der einzelnen Lösungen sowie das abschließende Entgasen vor dem luftblasenfreien Befüllen der Säulenzylinder erfolgte bei 150 mbar Unterdruck. Alle verwendeten Puffer wurden über 0,2 µm Filter filtriert. Die verwendete Flußraten variierten mit dem Bettvolumen sowie dem Säulenmaterial und lagen zwischen 0,4 und 2 ml/min. Vor dem Auftrag der Proben erfolgte Routinekontrolle des pH-Wertes (pH-Einstabmeßkette mit Temperaturfühler, Mettler Toledo GmbH, Schweiz) und der Ionenstärke (Konduktivimeter) in Säuleneluat. Die Chromatographie erfolgte an einem Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC®)-System (Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) bestehend aus der LCC-501 Plus Steuereinheit, zwei Hochpräzisionspumpen P-500, einem Gradientenmixer,

zwei elektrisch gesteuerten Mehrkanalventilen MV-7 und MV-8, einem Konduktivitätsmonitor, UV-Detektionseinheit UV-1, dem Fraktionssammler FRAC-100 sowie einem analogen Schreiber (Rec112) zur Dokumentation. Details einzelner Reinigungsverläufe sind unter 3. ausführlich beschrieben.

#### **2.6.4. Ionenaustausch-Chromatographie**

Die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer Nettoladung bei definiertem pH erfolgte über Kationen- oder Anionentauschermaterialien.

##### **2.6.4.1. Kationenaustausch-Chromatographie**

Zur Trennung basischer Proteine bei  $\text{pH} < 7,0$  wurde CM-Sepharose CL6B [Bettvolumen (BV) 50-150 ml] als schwacher und Mono-S (Mono S<sup>TM</sup> HR 5/5 Fertigsäule, BV 1 ml, Ausschlußvolumen 0,8 ml) sowie S-Sepharose (BV 10-40 ml) als starke Kationentauscher eingesetzt. Der Probenauftrag und die Bindung der Proteine erfolgte bei pH 4,7 bis 6,5 in entsprechend eingestelltem 10 mM Succinat-NaOH Puffer [mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 5 % (v/v) Glycerol für PhaZ7] oder 25 mM MES-Puffer (pH 6,0) im Falle von PhaZRr. Vor der Elution wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen der Säule mit 2 BV des Auftragspuffers abgetrennt. Die Elution erfolgte entweder mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-200 mM) oder mit einer Kombination aus linearem und Stufen-Gradienten bei Flußraten von 0,75 bis 1,5 ml/min (je nach Säulenmaterial und Säulengröße). Da die in der vorliegenden Arbeit gereinigten PHA Depolymerasen bei pH Werten unter 7,0 eine geringere Stabilität aufwiesen, wurde in den Fraktionssammelröhrchen 250 mM Tris/HCl pH 10,0 so vorgelegt, daß nach Verdünnung mit dem gewählten Probenvolumen ein pH von mindestens 8,0 erreicht wurde.

##### **2.6.4.2. Anionenaustausch-Chromatographie**

Als Anionentauschermaterial wurden DEAE-Sepharose und Mono-Q<sup>TM</sup> (HR 10/10 Fertigsäule, BV 10 ml, Ausschlußvolumen 8 ml) sowie Q-Sepharose Fast Flow eingesetzt. Äquibriert wurde mit 10 mM Kaliumphosphat (pH 7,0) oder 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) Diese Chromatographieart diente im Falle der basischen Proteine einer indirekten Reinigung durch Abtrennung von Fremdproteinen, welche bei gegebenem pH-Wert am Tauschermaterial banden während die zu untersuchenden PHA Depolymerasen bereits während des Probenauftrages und dem sich anschließenden Waschschrift mit Auftragspuffer eluierten. Gebundene Proteine wurden durch NaCl-Gradienten (0-1 M) eluiert.

#### **2.6.5. Chromatofokussierung an Mono-P**

Für die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer divergierenden isoelektrischen Punkte und zur experimentellen Bestimmung des isoelektrischen Punktes gereinigter Proteine wurde neben der trägerfreien Flüssigfokussierung in einer Rotofor®-Apparatur (s. 2.6.8.) die Chromatofokussierung an Mono P<sup>TM</sup> (HR 5/20, BV 4 ml, Ausschlußvolumen 3,8 ml) durchgeführt. Die Säule wurde mit 25 mM 1,3-Diaminopropan/HCl-Puffer bei pH 10,5 äquilibriert. Der Probenauftrag erfolgte mit 0,5 ml/min. Nach dem Waschen mit 5 Bettvolumen Äquilibrierungspuffer wurden die gebundenen Proteine in 46 ml 1:60 verdünntem Pharmalyte<sup>®</sup>-Polybuffer pH-Bereich 8,0-10,0 (Amersham Pharmacia Biotech

GmbH, Freiburg), eingestellt auf pH 8,0 (HCl), durch den absteigenden pH-Gradienten mobilisiert. Für die Reinigung von PhaZ2 und PhaZ7 aus *P. lemoignei* wurde die Säule maximal mit 2,5 mg Protein geladen, um eine optimale Trennung zu gewährleisten. Für größere Proteinmengen wurde eine sukzessive Reinigung vorgenommen und die Säule zwischen den einzelnen Läufen eines Reinigungsdurchganges durch Injektion von 4 ml 2 M NaCl gewaschen. Zwischen verschiedenen Reinigungsdurchgängen wurde die Säule mit je 1 BV 2 M NaCl, 2 M NaOH und 75 % (v/v) Essigsäure unterbrochen von je 4 BV H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> vollständig regeneriert. Vor einer längeren Lagerung wurde das Säulenmaterial mit 10 BV 100 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 6 BV H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gespült und mit 20 % (v/v) Ethanol versetzt.

### 2.6.6. Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC)

Zur analytischen Hydrophoben-Interaktions-Chromatographie (HIC) wurde ein HiTrap®HIC Test Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) bestehend aus Butyl-Sepharose 4 FF, Octyl-Sepharose 4 FF, Phenyl-Sepharose 6 FF mit Säulenvolumina von 1 ml (0,86 ml Ausschlußvolumen) verwendet. Die Säulen wurden mit 0,5 und 1,0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 50 mM KP-Puffer (pH 7,0 – 8,2) äquilibriert und die Proben gegen den jeweiligen Auftragspuffer dialysiert. Der Probenauftrag erfolgte mit maximal 0,75 ml/min. Nicht gebundenes Protein wurde durch Spülen mit 5 ml Auftragspuffer ausgewaschen. Gebundene Proteine wurden durch das Anlegen eines absteigenden linearen Salzgradienten bei verringerter Pufferionenstärke (1,0 bzw. 0,5 bis 0 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 5 mM KP-Puffer, pH 7,0 – 8,2) oder durch Verringerung der Polarität der Lösung mit Hilfe eines ansteigenden Ethylenglykol- oder Glycerolgradienten (0-80 %, v/v) eluiert.

### 2.6.7. Gelfiltrationschromatographie

Für die Größenbestimmung von gereinigten Enzymen sowie die präparative Reinigung der PHB Depolymerase aus *R. rubrum* wurden Gelfiltrationen an Superdex 75 prep grade (XK 16/60, 120 ml BV, optimaler Trennbereich 3-70 kDa) und Superdex 200 (HiLoad 16/60, 60 ml BV, optimaler Trennbereich 10-600 kDa) durchgeführt. Die Säulen wurden mit 2 BV Puffer [z. B. 25 mM 1,3-Diaminopropan (pH 11,5), 1 M NaCl (Minimierung von Wechselwirkungen mit der Gelmatrix)] äquilibriert. Die Probe wurde vor dem Säulenauftrag durch Diafiltration (2.6.2.) auf 1-2 ml Gesamtvolumen konzentriert, bei 13000 Upm 30 Sekunden abzentrifugiert und mit 0,4 ml/min (60 ml BV) bzw. 0,75 ml/min (120 ml BV) auf die Säule geladen. Die Elution erfolgte isokratisch mit dem Auftragspuffer. Nach dem Lauf wurde das Säulenmaterial mit 1 BV 0,5 M NaOH, gefolgt von 2 BV H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen und vor einer Lagerung mit 2 BV 20 % (v/v) Ethanol gespült.

### 2.6.8. Isoelektrische Fokussierung

Für die Aufreinigung und die Bestimmung des isoelektrischen Punktes von Proteinen wurde eine isoelektrische Fokussierung im elektrischen Feld mit Hilfe einer Rotofor™ IEF Kammer (BioRad, München) durchgeführt. Mit Hilfe eines Ampholyt-Gemisches wurde hierzu in Flüssigkeit ein von der

Anode zur Kathode ansteigender pH Gradient aufgebaut, in welchem die Proteine bis zum Erreichen eines ihrem isoelektrischen Punkt entsprechenden pH Wertes wanderten. Die Anionentauschermembran (Kathode) wurde über Nacht in 0,1 M NaOH, die Kationentauschermembran (Anode) in 0,1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> äquilibriert. 15 min vor Versuchsbeginn wurde der Keramik-Kühler der Anlage mit einem Umlaufthermostaten auf 0-4°C temperiert. Die Probe wurde gegen 2,5 mM Tris/MES-Puffer (pH 7,0) dialysiert, auf 2 ml eingengt und in 18 ml (analytische Fokussierkammer) bzw. 60 ml (präparative Kammer) in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge mit Ampholyt [Bio-Lyte 3/10, 40 %, pH 3,5-9,5] versetzt:

Protein (mg/ml Fokussieransatz)	Bio-Lyte (% v/v)
>2	2,0
1	1,5
0,5	1,0
0,25	0,5

Das Protein-Ampholyt-Gemisch wurde luftblasenfrei in die vorgekühlte Kammer gefüllt. Die Fokussierung wurde bei 500 V und einer konstanten Leistung von 8 W im Falle der analytischen und 12 W im Falle der präparativen Kammer gestartet. Stromstärke und Spannung während des Laufes waren bei vorgegebener konstanter Leistung variabel. Mit dem Erreichen einer konstanten Spannung (etwa 1500 Volt nach 3-4 h) wurde die aufgetrennte Probe mit Hilfe des mitgelieferten Nadelbestecks über eine Wasserstrahlpumpe in 20 Fraktionen separiert. Anschließend wurde der pH-Wert jeder Fraktion gemessen und nach Dialyse gegen 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) die Aktivitäten nach 2.10.1.2. ermittelt.

### 2.6.9. Proteintrennung durch Saccharosedichtgradientenzentrifugation

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurden je 2,8 ml einer 20, 11, 6 und 1 % (w/v) Saccharosestammlösung (10 mM Tris/HCl; pH 7,4; 1 mM CaCl<sub>2</sub>) in Polyallomer-Röhrchen (14 x 89 mm für SW41 Rotor, Beckmann Instruments, Palo Alto, California, USA) pipettiert und die Gradienten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Vor Gebrauch wurden die Ansätze über Nacht bei 4°C aufgetaut, wobei sich ein linearer Gradient zwischen 1 und 20 % (w/v) Saccharose einstellte. Zu trennende Enzymproben wurden vor dem Experiment gegen 10 mM Tris/HCl (pH 7,4; 1 mM CaCl<sub>2</sub>) diafiltriert, da in den verwendeten Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie an CM-CL6B 5 % (w/v) Glycerol enthalten war, welches die Kontinuität des Gradienten beeinträchtigte. Die zu untersuchende Probe wurde gemeinsam mit je 250 µg der Markerproteine (Alkoholdehydrogenase aus Hefe, Mw = 150 kDa; Chymotrypsinogen A, Mw = 25 kDa oder Cytochrom C, Mw = 12,5 kDa; SIGMA, Deisenhofen) in einem Volumen von 500 µl auf die Gradienten aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte bei 36000 Upm bei 4°C für 16 h (RotorSW41, Ultrazentrifuge OTD 65 B, Du Pont de Nemours, Newtown, Conn., USA).

Anschließend wurde eine mit einer Peristaltikpumpe verbundene Pasteurpipette (ausgezogene Spitze) vorsichtig auf den Boden des Gradientenröhrchens abgesenkt und der Gradient in je 205 µl Aliquots fraktioniert. Die Saccharosekonzentration wurde refraktometrisch bestimmt. Zur Kontrolle wurde eine Eichgeraden der optischen Refraktion mit bekannten Konzentrationen erstellt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch analytische SDS-PAGE (2.8.1.) und mit Hilfe der für die PHA-Depolymeraseaktivitäten unter 2.10.1.1. und 2.10.1.2. beschriebenen optischen Tests.

#### **2.6.10. Proteinfragmenttrennung mittels Reversed-Phase-High-Performance-Liquid-Chromatographie (RP-HPLC)**

Nach proteolytischem Verdau erhaltene Peptidfragmente wurden für die N-terminale Aminosäuresequenzierung mit Hilfe der HPLC getrennt. Es wurde eine analytische „narrowbore“ Reverse-Phase (C18) Säule des Typs Hypersil ODS (120 Ångström, 150 x 2,1 mm, Partikelgröße 3 µm, Life sciences Hypersil, Astmoor, England) eingesetzt, welche wahlweise an einer Pharmacia LKB µ Separation Unit (Amersham Pharmacia, Freiburg) oder einer Gynkotec-HPLC-Anlage (Gynkotec, Germering) bestehend aus Gina50-Autosampler, L-6200 Intelligent Pump (Merck, Hitachi, Darmstadt) sowie einem UV-visible Spektrum Photodiodenarray Detector (PDA) (UVD 340S) zur Detektion der Proben bei 215, 256 und 280 nm betrieben wurde. Die zu trennende lyophilisierte Probe des tryptischen Verdau (2.15.1.) wurde in maximal 100 µl entgastem und über 0,2 µm Filter gereinigtem Puffer A (0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) aufgenommen und über eine Probenschleife auf die Säule geladen. Nach einem 15 minütigen isokratischen Schritt bei 7 % (v/v) Puffer B [0,085 % (v/v) TFA in Acetonitril] und einer Flußrate von 0,1 ml/min, durch den Salzreste des Proteaseverdau sowie kürzere hydrophile Peptide ausgewaschen wurden, erfolgte die Elution durch einen linearen Gradienten auf 50 % B in 105 min. Es schloß sich ein zweiter steilerer Gradient zur Elution stärker hydrophober Peptide (100 % B in 20 min) an. Durch isokratisches Spülen mit 100 % Laufpuffer B (15 min) wurde noch verbliebene Probe eluiert. Die Peptidpeaks wurden unter Berücksichtigung des Totvolumens manuell in sterilen 500 µl Eppendorfreagiergefäßen fraktioniert.

Da nach Lys-C Verdau von PHB Depolymerase aus *R. rubrum* (2.15.2.) eine Reihe offenbar stärker hydrophober und größerer Peptide entstanden waren, wurden die im zweiten Teil des Standardlaufes gewonnenen, schlecht getrennten Proben vereinigt, getrocknet, erneut in Puffer A resuspendiert und unter veränderten Bedingungen rechromatographiert. An den isokratischen Schritt (15 min, 7 % B) schloss sich nach rascher Erhöhung des Anteils von B auf 35 % (10 min) ein 90 minütiger Gradient bis 100 % Puffer B an. Vor jeder Lauf-Serie wurde ein Leergradient aufgenommen. Gewonnene Rohdaten wurden mit der Chromeleon® Chromatography Systems Data Software Version 4.1 oder der SMART® System Software aufgezeichnet und ausgewertet. Bis zur Sequenzierung bzw. der MALDI-TOF-MS wurden die Proben bei -20°C gelagert.

### 2.6.11. Gelpermeations-Chromatographie (GPC)

Die Ausführung dieser Methode, eingesetzt zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung verschiedener Proben isolierter PHB-Granula, erfolgte an einer PSS-Gelpermeationschromatographieranlage mit 3 in Reihe gekoppelten Säulen (Säule 1: PSS SDV 10  $\mu$  line, Säule 2: PSS SDV 1000 A, Säule 3: PSS SDV 100 A) und einem RI-Detektor (PSS Chromatographieservice GmbH, Mainz). PHA-Proben wurden mit 3 M Natriumacetat/Essigsäure auf pH 4,55 titriert [pks (3-HB) = 4,55] und 48 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  lyophilisiert. Die trockenen Proben wurden in mit  $\text{CaSO}_4$  getrocknetem Chloroform 2 Stunden bei  $45^{\circ}\text{C}$  gelöst (Probenkonzentration: 1 mg lyophilisierte Granula/ml Lösungsmittel). Die GPC-Säulen wurden mittels Poly(1,4-isopren)-Standard (PSS Chromatographieservice GmbH, Mainz) extern kalibriert. Es wurden 100  $\mu\text{l}$  Probe injiziert. Die Elution erfolgte bei  $23^{\circ}\text{C}$  isokratisch mit Chloroform bei einer Flußrate von 1 ml/min. Zur Aufzeichnung und Verarbeitung der erhaltenen Meßdaten wurde PSS-Wingpc (PSS Polymer Standards Service GmbH).

### 2.6.12. Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Zur genauen Bestimmung der Massen von Proteinen und Peptidfragmenten sowie zur Überprüfung der Reinheit vor Beginn der N-terminalen Sequenzierung wurde die MALDI-TOF-Massenspektrometrie eingesetzt. Dabei wurden die mit einer Trägermatrix kokristallisierten Peptide unter Vakuum durch Laserbeschuß in die Gasphase überführt, positiv oder negativ ionisiert und anschließend in Richtung einer Anode (negative Ionisierung) oder Kathode (positive Ionisierung) beschleunigt (KARAS und HILLENKAMP, 1988). Nach dem Durchqueren der Gitterelektrode flogen die Moleküle bis zum Auftreffen auf den Detektor mit gleichmäßiger, der Molekularmasse proportionalen Geschwindigkeit. Die Messungen erfolgten an einem Hewlett Packard LD-TOF System (Modell G2025A; GSG Mess- und Analysengeräte Vertriebsgesellschaft mbH, Karlsruhe) mit „time lag focussing“ (TLF) und LeCroy 9350 CM 500 MHz Speicheroscilloscop. Das Gerät war mit einem 337 nm-UV-Laser ausgestattet.

Die in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  oder nach der Trennung über RP-HPLC in Acetonitril/TFA (s. 2.6.10.) vorliegenden Proben wurden im Vakuum auf eine Konzentration von 0,5-2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingengt. Zwei Einbettungsverfahren wurden verwendet. Bei der „thinlayer“-Technik für die Peptidfragment-Trennung wurde die Proteinprobe mit 1 Volumen saure Matrix-Lösung bestehend aus 20 mg/ml a-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (Sinapinsäure, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und 10 mg/ml Nitrocellulose in Aceton/Isopropanol, 1:1 (v/v) gemischt, je 1  $\mu\text{l}$  der Mischung auf einen MALDI-Probenträger aufgetropft und bei Raumtemperatur getrocknet (VAN und MAN, 1994). Im Falle der „sandwich“-Methode wurde auf 0,5  $\mu\text{l}$  getrocknete Matrix je 0,5  $\mu\text{l}$  Proteinprobe und erneut 0,5  $\mu\text{l}$  Matrixmaterial aufgetragen. Zur Massenbestimmung von PhaZ7 aus *P. lemoignei* und PhaZ aus *R. rubrum* wurde Sinapinsäure gesättigt in 40:60 (v/v) Acetonitril/ 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure als Matrix eingesetzt.

Die Messungen erfolgte bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV mit optimierten TLF-Einstellungen für den erwarteten Massenbereich der Probe sowie optimaler Laserenergie. Jeweils 100-150 Einzelspektren eines Probenträgerplatzes wurden zu einem Gesamtspektrum addiert. Die Zuordnung der Massen erfolgte durch externe Kalibrierung im Falle der nativen Proteine mit Carbonic Anhydrase B (carbonic anhydrase II (29,023 Da). Zur Kalibrierung der Messung von kurzen Peptiden nach Proteaseverdau (s. 2.15.) wurden Angiotensin I (1282 Da), Bovine Insulin (5733,6 Da) und Bovine Insulin B Chain (3495,94 Da) verwendet. Der relative Massenfehler lag bei 0,1 %. Für die Bestimmung der Molekülmasse der Gesamtproteine wurde jeweils separat der absolute Fehler ermittelt.

Die Messungen wurden unter Anleitung und mit Unterstützung von Dipl. Ing. J. Schmucker an der FHG Stuttgart durchgeführt.

### **2.6.13. N-terminale Aminosäuresequenzierung**

Die N-terminale Aminosäuresequenz von gelösten oder nach Western-Blot auf PVDF immobilisierten Proteinen sowie ausgewählter Peptidfragmente nach Verdau und HPLC-Aufreinigung (2.6.9.) wurde durch automatisierten Edman-Abbau auf Procise Protein Sequencern des Typs 476 und 491 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) bestimmt. Die Geräte waren mit Mikrocartridges ausgerüstet und wurden im „Fast Cycle-Mode“ mit den vom Hersteller gelieferten Verbrauchsmaterialien betrieben. Flüssigproben wurden auf Biopren-beschichteten Glasfaserfiltern immobilisiert. Die für eine erfolgreiche Sequenzierung benötigte Proteinmenge lag bei 30 pmol. Die Analysen wurden von der Firma Prosequenz Bioanalytik (Stuttgart) sowie am Institut für Immunologie der Georg August Universität (Göttingen) und am Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart durchgeführt.

## **2.7. Proteinbestimmungen**

### **2.7.1. Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) [modifiziert]**

Der Proteingehalt ganzer Zellen und isolierter PHB-Granula wurde mit Hilfe der Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (1951) ermittelt. Die Werte für Granula aus Zellen nach Inkubation mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und für entsprechenden Granula der Kontrolle ohne  $\text{NH}_4\text{Cl}$  wurden jeweils in einem kompletten Lowy-Ansatz bestimmt.

Stammlösungen:	A:	10 % $\text{Na}_2\text{CO}_3$
	B:	1 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
	C:	2 % K-Na-Tartrat

Die Stammlösungen waren bei 4 °C mehrere Monate haltbar.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Lösungen D und E angesetzt.



Gebrauchslösungen:	D:	Lösung A	20 ml
		Lösung B	1 ml
		Lösung C	1 ml
		H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml
	E:	Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz 1:3 mit H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (v/v) verdünnt	

0,25 ml der bei -20 °C gelagerten Granulasuspension (falls erforderlich vorher mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> entsprechend verdünnt) wurden mit 0,1 ml NaOH (2 N) versetzt und in mit Aluminiumkappen verschlossenen Reagenzglasern im siedenden Wasserbad 10 min erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 5 ml Gebrauchslösung D hinzugegeben, gut durchmischt und 17 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß folgte die Zugabe von 0,5 ml Gebrauchslösung E und eine weitere 15 minütige Inkubation bei RT. Der bereits im vorherigen Schritt gebildete Kupfer-Protein-Komplex führte zur Reduktion der Folin-Ciocalteus-Reagenz und einem Umschlag der gelben Färbung der Lösung hin zu einem blauen Farbton. Durch Messung der Extinktion der Proben bei  $\lambda = 578$  nm (Zeiss Photometer PM4, Fa. Zeiss, Oberkochen) und Vergleich mit den zugehörigen Werten einer Eichkurve (BSA) im Bereich 0 – 200  $\mu$ g Protein/ml ließ sich der Proteingehalt der Proben ermitteln. Die Messung wurde in 1 ml Plastikkuvetten gegen einen Reagenzienleerwert (0,25 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> an Stelle einer Probe) ausgeführt. Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 2.7.2. Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Nach Zellaufschluß und Abzentrifugation von Zelltrümmern und noch intakten Zellen wurde der lösliche Überstand (Rohextrakt) der zu untersuchenden Bakterienkulturen mittels dieser Methode auf ihren Proteingehalt untersucht. Die verwendete Bradford-Reagenz war wie folgt zusammengesetzt:

Serva Blau G 250	100 mg
EtOH (unvergällt, 96 %)	50 ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 % v/v)	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

Das Lösen von Serva Blau erfolgte in Ethanol. Nach Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> wurde die Gebrauchslösung filtriert und lichtgeschützt aufbewahrt.

30  $\mu$ l Probe wurden in Plastikkuvetten mit Bradford-Reagenz auf 1 ml Gesamttestansatz aufgefüllt und 15 min bei RT inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert bestehend aus 30  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und 970  $\mu$ l Bradford-Reagenz. Im Zuge der Reaktion wird ein Farbstoff-Protein-Komplex gebildet, dessen Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt. Der Farbstoff allein zeigt bei 465 nm die stärkste Absorption.

Die Eichkurve wurde im Bereich von 0 bis 30  $\mu$ g BSA aufgenommen. Alle Bestimmungen wurden mindestens als doppelt ausgeführt.

## 2.8. Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

### 2.8.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970)

Zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurden diskontinuierliche SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970) durchgeführt. Die Gele bestanden aus einem 4,5 %-igen Sammelgel und einem 12 %-igen (Proteintrennung), 14 %-igen oder 16 %-igen (Trennung kleiner Proteine, Peptidtrennung) Trenngel. Für die durchgeführten vertikalen Elektrophoresen fanden Minigelkammern der Fa. Biometra, Göttingen Verwendung. Die Gelgröße betrug 100 x 100 x 1 mm.

Zur Herstellung der Gele und Puffer wurden folgende Lösungen verwendet:

Acrylamidlösung:	30 % (w/v) Acrylamid (2x kristallin)
	0,8 % (w/v) Bisacrylamid

Die Lösung wurde filtriert und dunkel bei 4 °C aufbewahrt.

SDS-Lösung:	20 % (w/v) SDS
-------------	----------------

Ammoniumpersulfat (APS) - Lsg.	40 % (w/v) Ammoniumpersulfat
--------------------------------	------------------------------

Trenngelpuffer:	1 M Tris/HCl, pH 8,7
	0,273 % (v/v) TEMED

Sammelgelpuffer:	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8
	2 % (w/v) SDS
	0,354 % (v/v) TEMED

Denaturierungspuffer: (dreifachkonzentriert)	SDS-Lösung	15	ml
	Glycerol (87 % v/v)	15	ml
	2-Mercaptoethanol	1,5	ml
	Bromphenolblau	75	mg
	H <sub>2</sub> O bidest	ad 50	ml

SDS-Elektrophoresepuffer:	Tris	12,1	g
	Glycin	7,5	g
	SDS	1,0	g
	H <sub>2</sub> O bidest	ad 1000	ml
	pH ca. 8,7	(nicht einstellen)	

Der Gelansatz erfolgte gemäß Tabelle 6.

**Tab. 6:** Mischungsschema für verwendete SDS-Minigele.

Lösung [ml]	Trenngel (12 %)	Sammelgel (4,5 %)
Acrylamid-Lsg.	3,00	0,75
Trenngelpuffer	2,78	-
Sammelgelpuffer	-	2,83
SDS-Lsg.	0,038	-
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1,63	1,37
APS-Lsg. (40 %)	0,0125	0,0125

Die Trenngellösungen (ausgenommen APS-Lösung) wurden zusammenpipettiert und durchmischt. Zur Initiation des Polymerisationsprozesses wurde die APS-Lösung hinzugegeben und die Gele zwischen vorbereitete Minigelplatten gegossen. Um eine gerade horizontale Oberfläche zu erhalten, wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach 20 min konnte das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet werden. In das Sammelgel wurde ein Kamm (5 oder 10 zählig) zur Formung der Geltaschen eingebracht. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Gel (fixiert in der Gelkammer) mit SDS-Elektrodenpuffer überschichtet und der Kamm vorsichtig entfernt. Zur Beseitigung von Luftblasen und Gelbruchstücken wurden die Taschen mit Elektrodenpuffer gespült.

Die mit Denaturierungspuffer (3 oder 5 fach konzentriert) versetzten Proben wurden 3 min bei 100 °C inkubiert. Die Darstellung Granula-assoziierter Proteine erforderte einen Waschschrift der Probe mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und im Anschluß an die Behandlung mit Denaturierungspuffer eine Zentrifugation bei 14000 Rpm (Biofuge), welche der Trennung des Polymers von der Proteinfraction diente. Zur Ermittlung der Probenauftragsmenge (5-er Kamm ca. 4 µg , 10-er Kamm 1-2 µg Protein pro Tasche) wurde auf Werte der Proteinbestimmungen nach LOWRY bzw. BRADFORD (s. 2.7.1. und 2.7.2.) zurückgegriffen. Die Stromstärke während der Passage des Sammelgels betrug 10 mA/Gel und wurde bei Eintritt in das Trenngel auf 20 mA/Gel erhöht.

### 2.8.2. Tricine-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Tricine-SDS-PAGE)

Für die Trennung von kleinen Proteinen und Peptiden wurde die Tricine-SDS-PAGE angewandt.

**Tab. 7:** Puffer für Tricine-SDS-PAG.

Puffer	Tris [M]	Tricine [M]	pH	SDS [%]
Anodenpuffer	0,2	-	8,9	-
Kathodenpuffer	0,1	0,1	8,25	0,1
Gelpuffer	3,0	-	8,45	0,3

Der pH-Wert des Anoden- und Gelpuffers wurde mit HCl eingestellt, der Kathodenpuffer benötigte keine Korrektur. Für die Gele wurden folgende Stammlösungen verwendet (Tab. 8).

**Tab. 8:** Gelstammlösungen für Tricine-SDS-PAG.

Gesamtkonzentration, Vernetzungsgrad	Acrylamid [%] (w/v)	Bisacrylamid [%] (w/v)
49,5 % T*, 3 % C**	48	1,5
49,5 % T*, 6 % C**	46,5	3,0

\*T Gesamtkonzentration beider Monomere (Acrylamid und Bisacrylamid).

\*\*C Vernetzungsgrad/Gesamtkonzentration T.

Alle Lösungen konnten bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, mit Ausnahme der Acrylamid/Bisacrylamidlösung, die dunkel bei 4°C gelagert wurde. Die Herstellung der Gele erfolgte nach Tabelle 9.

**Tab. 9:** Mischungsschema für Tricine-SDS-PAG.

	Sammelgel		Spacergel		Trenngel	
	4 % T, 3 % C	10 % T, 3 % C	10 % T, 3 % C	16,5 % T, 3 % C	10 % T, 3 % C	16,5 % T, 3 % C
49,5 % T, 3 % C	1 ml	6,1 ml	6,1 ml	10 ml	6,1 ml	10 ml
Gelpuffer	3,1 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Glycerol	-	-	-	3,25 ml	3,25 ml	3,25 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st. ad	12,5 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

Die Trennleistung lag im Bereich von 5 bis 100 kDa. Das Trenngel wurde mit n-Butanol überschichtet und nach Polymerisation ein ca. 2 cm Sammelgel gegossen. Zur Polymerisation wurde 15 µl TEMED und 30 µl APS (40%) hinzugegeben.

Die Proben wurden für 30 min bei 40°C in 1 Volumen Denaturierungspuffer (zweifach) inkubiert:

Denaturierungspuffer (zweifach)		
Tris	100	mM
SDS	8	% (w/v)
Glycerol	24	% (w/v)
Mercaptoethanol	4	% (v/v)
Serva Blue G (Brilliant Blue G)	0,02	% (w/v)
pH	6,8	(HCl)

Serva Blue G wanderte im Gel (im Gegensatz zu Bromphenol-Blau) schneller als die kleinsten Peptide. Für die Elektrophorese wurden Biometra-Kammern mit 10 x 10 x 0,1 cm Platten verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 15-20 mA pro Gel gestartet. Nach Einwandern der Proben wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Zur Detektion der Proteinbanden wurde die Silberfärbung eingesetzt (2.8.3.).

### 2.8.3. Unspezifische Proteinfärbung mit Silber nach BLUM et al. (1987)

Zur Detektion geringer Proteinmengen wurde eine Silberfärbung der SDS-Polyacrylamidgele vorgenommen. Diese Methode beruht auf der Reduktion von am Protein komplexgebundenen Silberionen durch die Einwirkung von  $S_2O_3^{2-}$ . Die reduzierten Silberionen bewirken einen Farbumschlag, der die Proteinbande sichtbar werden läßt. Der Einsatz von Thiosulfat verhindert die Bildung unlöslicher Silbersalze im Verlaufe der Entwicklung durch Komplexbildung.

Fixierer:	Methanol	500	ml
	Eisessig	120	ml
	Formaldehyd (37 %, v/v)	0,5	ml
	H <sub>2</sub> O <small>bidest</small>	ad 1000	ml
Thiosulfat-Lösung:	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,2	g
	H <sub>2</sub> O <small>bidest</small>	ad 1000	ml
	stets frisch angesetzt		
Imprägnierlösung: (frisch angesetzt!)	AgNO <sub>3</sub>	1	g
	Formaldehyd (37 %, v/v)	0,75	ml
	H <sub>2</sub> O <small>bidest</small>	ad 1000	ml

Entwicklerlösung: (frisch angesetzt)	$\text{Na}_2\text{CO}_3$	60	g
	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	20	ml
	[0,02 % (w/v)]		
	Formaldehyd (37 %, v/v)	0,5	ml
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000	ml
Stopplösung:	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	18,6	g
	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000	ml

Nachfolgend aufgeführte Schritte wurden unter ständiger Bewegung auf einer Wippe durchgeführt:

1. 30 min in Fixierer inkubieren
2. dreimal 20 sec in 50 % (v/v) EtOH waschen
3. 1 min in Thiosulfatlösung inkubieren
4. dreimal 20 sec in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  waschen
5. 20 min in Imprägnierlösung inkubieren
6. dreimal 20 sec in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  waschen
7. in Entwickler inkubieren, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar werden
8. dreimal 20 sec in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  waschen
9. 10 min in Stopplösung inkubieren
10. zweimal in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  waschen

Anschließend wurden die Gele in Plastikfolie eingeschweißt und mit Hilfe eines Durchlichtscanners dokumentiert. Eingeschweißte Gele wurden bei 5-8 °C gelagert.

#### 2.8.4. Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie Blue

Die Färbung von auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen geblotteten Peptiden erfolgte nach WEBER und OSBORN (1969). Die Färbelösung enthielt 2,5 g/l Serva Blau G, 400 ml/l Methanol und 100 ml/l Eisessig. Nach einer Färbezeit von 5 min wurden die Membranen in 90 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Eisessig entfärbt, in Wasser gespült und getrocknet. War es erforderlich, Proteine bereits vor einem Blot auf PVDF-Membranen im Gel zu färben, wurde ein alternatives Färbeprotokoll nach THOMPSON und LARSON (1992) verwendet. Die Gele wurden für 30 min in einer Färbelösung inkubiert, welche Isopropanol anstelle des sonst verwendeten Methanols enthielt, womit einer irreversiblen Fixierung der Proteine in der Gelmatrix vorgebeugt werden konnte. Die Gele wurden mit 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt und die betreffenden Proteine ließen sich auf PVDF-Membranen (s. 2.9.1.) blotten oder einzelne Banden in Centricon<sup>®</sup> Röhren elektroeluiert [analog 2.17.6., jedoch in 2,5 ml YM10-Centricon<sup>®</sup> (MILLIPORE GmbH, Schwalbach) unter Verwendung von SDS-Elektrophoresepuffer (2.8.1.)].

Alternativ konnten Proteine aus bereits nach WEBER und OSBORN (1969) gefärbten Gelen für einen Western-Blot vor der Inkubation in Transfer-Puffer (s. 2.8.4.) durch Äquilibrieren in 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 1 % (w/v) SDS für 45 min wieder gelelektrophoretisch mobilisiert werden.

### 2.8.5. Negativfärbung von SDS-Gelen nach FERNANDEZ-PATRON 1995 (modifiziert)

Zur Detektion von Proteinbanden für den „In-Gel“ Verdau nach SDS-PAGE wurde als Alternative zur Coomassie-Färbung die Negativfärbung mittels Zinksulfat etabliert. Die Gele wurden nach 1-minütiger Inkubation in H<sub>2</sub>O für 20 min in einer Imprägnierlösung aus 0,2 M Imidazol und 0,1% (w/v) SDS inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Gelmatrix durch Schwenken in 0,2 M Zinksulfat bis sich der Hintergrund deutlich weiß von den ungefärbten Proteinbanden absetzte (1-5 min). Abschließend wurden die Gele dreimal in Wasser gewaschen. Proteinbanden wurden ausgeschnitten und die Gelblöckchen in H<sub>2</sub>O bei 4°C gelagert.

### 2.8.6. Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE

Durch die Hitzebehandlung der Proben im SDS-Denaturierungspuffer entstehen offenkettige Polypeptide (Disulfidbrücken reduziert), welche infolge der Anlagerung von SDS eine negative Nettoladung aufweisen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der so behandelten Proteine im SDS-PAGE ist somit nur von deren Größe nicht aber ihrer ursprünglichen Nettoladung abhängig.

Als Marker wurde der LMW Calibration Kitt (Fa. Pharmacia, Freiburg) mit 6 Proteinen (molekulare Massen nach Herstellerangaben) verwendet (Tabelle 6).

**Tab. 10:** Größe der Proteine des LMW-Standards.

Marker	Molekulargewicht [Da]
Phosphorylase b	94000
Albumin	67000
Ovalbumin	43000
Carbo-Anhydrase	30000
Trypsin-Inhibitor	20100
α-Lactalbumin	14000

Die Elektrophoresebedingungen sind unter 2.8.1. wiedergegeben. Im Anschluß an die Proteinfärbung (s. 2.8.3.-2.8.5.) wurden die R<sub>F</sub>-Werte der Proteine nach :

$$R_f = \frac{\text{Laufstrecke der Proteinbande}}{\text{Laufstrecke Bromphenolblau}}$$

ermittelt, und durch eine halblogarithmische Auftragung der Molekulargewichte der Markerproteine gegen den zugehörigen R<sub>F</sub>-Wert ergab sich eine Eichkurve. Aus dieser ließ sich das Molekulargewicht des untersuchten Proteins ermitteln.

### 2.8.7. Native-Gradienten-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung und Molekularmassenbestimmung nativer Proteine wurden Gele mit einem linearem Polyacrylamidgradienten (4 – 20 % w/v) eingesetzt. Der Gellauf erfolgte in Minigelkammern der Firma Biometra, Göttingen (Trenngel: 60 x 85 x 1 mm). Je 3 ml „Leichte Lösung“ und 3 ml „Schwere Lösung“ wurden in einen kleinen Gradientenmischer gefüllt, mit 3 µl TEMED sowie 15 µl einer 10 % (w/v) APS-Lösung versetzt und das Gel unter zügiger Durchmischung der Lösungen gegossen. Acrylsäurereste wurden durch eine Vorelektrophorese (20 min, 100 V, 4 °C) entfernt. Die Elektrophorese der mit 0,1 Volumen Beschwerungslösung versetzten Proben erfolgte je nach Aufgabenstellung für 10 - 24 h bei 100 V und 4°C. Gellösungen wurden lichtgeschützt bei 4 °C für maximal 5 Tage gelagert.

<u>Gelpuffer</u> <sup>a)</sup>		
Tris	250	mM
MgCl <sub>2</sub>	250	µM
pH	8,5	(HCl)
<u>„Leichte Lösung“ (4 % w/v)</u>		
Acrylamid	4,0	g
Bisacrylamid	0,2	g
Octylglucosid	0,1	g
Gelpuffer	ad 100	ml
<u>„Schwere Lösung“ (20 % w/v)</u>		
Acrylamid	20,0	g
Bisacrylamid	1,0	g
Octylglucosid	0,1	g
Glycerol (87 % v/v)	8,6	ml
Gelpuffer	ad 100	ml
<u>Beschwerungslösung</u>		
Saccharose	4	g
Bromphenolblau	5	mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 10	ml
<u>Elektrodenpuffer</u> <sup>a)</sup>		
Tris	100	mM
Glycin	100	mM
pH	8,7	

<sup>a)</sup> Für die Trennung der stark basischen extrazellulären PHA-Depolymerasen in der anodischen PAGE wurde 1,3-Diaminopropan-Puffer (100 mM, pH 10,5), für kathodische PAGE MES/Tris (50 mM, pH 6,5) eingesetzt.



## 2.9. Immunologische Methoden

### 2.9.1. Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot)

Für eine N-terminale Sequenzierung einzelner Proteine und Peptide nach SDS-PAGE (s. 2.8.1.) als auch für den immunologischen Nachweis von Proteinbanden mit Hilfe polyklonaler Antikörper war eine Immobilisierung der Proteine auf proteinbindenden Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen nach TOWBIN et al., 1979 (modifiziert) erforderlich. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 10 min bei Raumtemperatur in Transferpuffer [40 mM Tris, 19 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol] äquilibriert. Im Pufferbad wurde ein luftblasenfreies „Sandwich“ aus 3 Lagen Whatman-3MM-Chromatographiepapier (Biometra, Göttingen), 2 Lagen PVDF-Membran (PALL GmbH, Dreieich), dem Trenngel und 3 Lagen Whatman-3MM-Chromatographiepapier hergestellt, welches mit der Unterseite auf die Anode der Semy-Dry-Fast-Blot-Apparatur B33 (Biometra, Göttingen) aufgebracht wurde. Die PVDF-Membran wurde vor Verwendung in Methanol behandelt, um die Benetzbarkeit zu erhöhen und anschließend gemeinsam mit dem ebenfalls auf Trenngelgröße zugeschnittenen Chromatographiepapier 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot erfolgte bei 4°C mit 4,5 mA/cm<sup>2</sup>. Die Blot-Dauer richtete sich nach den Größen der zu transferierenden Proteine sowie dem Vernetzungsgrad der Gele und betrug zwischen 40 bis 100 min. Die Membran wurde abschließend 30 Sekunden in Wasser gespült.

### 2.9.2. Gewinnung polyklonaler Antikörper gegen PhaZ5 aus *P. lemoignei* und intrazelluläre Depolymerase aus *R. eutropha* H16

Ausgehend von einer im Rahmen der vorliegenden Arbeit gereinigten Charge Depolymerase A (PhaZ5) aus dem Kulturüberstand von *P. lemoignei* (Wildtyp) nach Ionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose CL6B (s. 2.6.4.) und Diafiltration gegen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> wurde 1 mg Protein lyophilisiert und am Department of Biological Sciences, Division of Cellular, Molecular and Microbial Biology der University of Calgary zur Immunisierung einer Maus nach einem 6 Wochen-Protokoll eingesetzt. Die erhaltenen polyklonalen Anti-PhaZ5-Maus-Antikörper wurden ohne weitere Reinigung für den immunologischen Nachweis extrazellulärer dPHB Depolymerasen aus *P. lemoignei* eingesetzt.

### 2.9.3. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Für die Detektion von auf PVDF immobilisierten Proteinen (2.9.1.) wurden folgende Pufferlösungen hergestellt:

TBS (Tris buffered saline)-Lösung:

Tris/HCl (pH 7,5)	100 mM
NaCl	150 mM

TTBS-Lösung:

Tween 20	0,1 % (v/v) in TBS
----------	--------------------

Blocking-Puffer:

Tween 20	0,05 % (v/v) in TBS
Präserum	0,1 % (v/v)
*alternativ: 5 % (w/v) Skimmilch	

Reaktionspuffer:

Tris/HCl (pH 9,0)	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

Die PVDF-Membran wurde nach erfolgtem Western-Blot 2 x 10 min in 40 ml TBS gewaschen und anschließend 60 min in 50 ml Blocking-Lösung (50 µl Präserum) inkubiert. Die Anlagerung des primären Antikörpers (max. 50 µl Antiserum/ 25 ml Blocking-Puffer erfolgte routinemäßig über Nacht (mindestens jedoch für 60 min) unter leichter Durchmischung. Ungebundenes Protein wurde durch viermaliges Waschen in jeweils 50 ml TTBS entfernt. Zur Anlagerung des sekundären, mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-Antikörpers (SIGMA, Deisenhofen) wurden 80 µl einer 10<sup>-2</sup> verdünnten Antikörperlösung in 40 ml TTBS suspendiert und die PVDF Membran 60 min in der Suspension inkubiert. Einem erneuten viermaligen je 15 min dauernden Waschschrift mit je 50 ml TTBS und 1 x 15 min 50 ml TBS (zur Entfernung des Detergens) folgte die Färbung des Blots mit 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP, 40 µl, 5 %, w/v in N,N-Dimethylformamid) und 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT, 50 µl, 100 mg in 1,3 ml 70% N,N-Dimethylformamid) in 20 ml Reaktionspuffer. Positive Signale zeigten violette Färbung. Mit Erreichen des gewünschten Färbegrades wurde die Reaktion durch gründliches Spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gestoppt und die Membranen nach Trocknung bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

**2.9.4. Nachweis von Glykoproteinen**

Der Nachweis von Glykoproteinen erfolgte mit Hilfe eines Immunotest („DIG Glycan Detection Kit“, Boehringer Mannheim). Nach einer Oxidation der Hydroxylgruppen mit Perjodsäure wurde das Steroid-Hapten Digoxigenin an die gebildete Aldehydgruppe gebunden. Gebundenes Digoxigenin wurde anschließend durch mit alkalischer Phosphatase konjugierte Antikörper detektiert. Unter alkalischen Bedingungen (100 mM Tris/HCl, pH 9,5; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl,) erfolgte der Umsatz von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP, 40 µl, 5 %, w/v in N,N-Dimethylformamid) und 4-Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT, 50 µl, 100 mg in 1,3 ml 70%, N,N-Dimethylformamid). Positive Spots zeigten violette Färbung. Der Test wurde nach Firmenprotokoll durchgeführt. Die Oxidation der Zuckerreste erfolgte jedoch erst nach einer Proteinimmobilisierung auf PVDF-Membranen (Western-Blot, s. 2.9.1.). Neben Creatinase (Negativkontrolle) dienen PhaZ2, PhaZ5 aus *P. lemoignei* und Transferrin als Qualitätsreferenzen.

## 2.10. Bestimmung von Enzymaktivitäten

### 2.10.1. Bestimmung von PHA Depolymeraseaktivitäten

Für die Bestimmung der hydrolytischen Aktivität der untersuchten Depolymerasen wurden zwei prinzipiell verschiedene Testverfahren eingesetzt – die Trübungsmessung und die Titration.

#### 2.10.1.1. Turbidimetrischer Test zur Bestimmung der PHA Depolymeraseaktivität

Die PHA Depolymeraseaktivität konnte durch photometrische Messung der Trübungsabnahme einer Polymersuspension bei 650 nm (Plastikküvetten,  $d = 10$  mm) im Photometer (KV365, Kontron Instruments, USA) bestimmt werden. Der Testansatz bestand aus:

dPHA <sub>SCL</sub> -Suspension (0,3 %, w/v)	60 $\mu$ l
oder:	
nPHA <sub>SCL</sub>	0,5 mg
Enzymlösung	5-50 $\mu$ l
Tris/HCl (100 mM, pH 8,0), 1 mM CaCl <sub>2</sub>	ad 1 ml

Im Falle von PHA<sub>MCL</sub> wurden pro 1 ml Test 100  $\mu$ l einer 0,5 % (w/v) Stammlösung eingesetzt. Abhängig vom Versuchsansatz wurde Tris/HCl (100 mM), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 9,0 verwendet. Die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit wurde anhand der Geradensteigung ermittelt und die Enzymaktivität nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz unter Einbeziehung des apparenten Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) für die jeweils verwendete Polymer-Suspension ermittelt (s. 2.12.1.). 1 U Depolymeraseaktivität im turbidimetrischen Test wurde definiert als Hydrolyse von 1  $\mu$ g Polyestersubstrat pro Minute bei 40°C.

#### 2.10.1.2. Mikrotiterplattenreadertest zur Bestimmung der PHA Depolymeraseaktivität

Zur routinemäßigen Bestimmung der PHA Depolymeraseaktivität wurde das unter 2.10.1.1. beschriebene turbidimetrische Testverfahren an die Möglichkeiten eines Mikrotiterplattenreadersystems angepaßt, um eine größere Zahl von Proben effektiver und bei geringerem Materialverbrauch quantifizieren zu können. Die Messung erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten (NUNCLON™, NUNC™, Brand Products, Dänemark) mit Hilfe eines Power Wave<sub>x</sub> MTP-Readers mit KC4 Software (Bio-tek® Instruments, Inc., USA). Die Datenaufnahmerate variierte mit der Anzahl zu vermessender Proben und lag minimal bei 3 Hz (96 Proben).

Für den Test wurden 5-20  $\mu$ l Enzymlösung in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe von vorgewärmter Polymersuspension (ad 200  $\mu$ l, 40°C). Entsprechende Ansätze ohne Enzym dienten der Leerwertkontrolle. Zur Bestimmung der dPHA Depolymeraseaktivitäten enthielt die Polymerlösung Natriumhypochlorit-gereinigte dPHA<sub>SCL</sub> bzw. Chloroform/Methanol-gereinigte PHA<sub>MCL</sub> (Endkonzentration 500  $\mu$ g/ml) in 100 mM Tris/HCl (pH

8,0), 1 mM CaCl<sub>2</sub>. Die nPHA Depolymeraseaktivität wurde mittels über Glycerolgradienten-Dichtezentrifugation (2.12.) gereinigter nPHA Granula (500 µg/ml) in 100 mM Tris/HCl (pH 9,0), 1 mM CaCl<sub>2</sub>) bestimmt. Suspensionen nativer Granula für einen Aktivitätstest mit PHA Depolymerase aus *R. rubrum* mußten vor dem Test einer Behandlung nach 2.10.1.3. unterzogen werden.

#### **2.10.1.3. Bestimmung der Aktivität der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum***

Für die Bestimmung der Aktivität der nPHB Depolymerase aus *R. rubrum* S1 war eine Aktivierung der verwendeten nativen PHB Granula durch Proteasebehandlung erforderlich. Hierfür wurden 10 mg native Granula in 20 ml Aktivitätspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,0; 1 mM MgCl<sub>2</sub>) mit 11 µl Trypsinstammlösung (1,25 mg/ml, SERVA Feinbiochemika GmbH, Heidelberg) versetzt und 10 min bei 40°C inkubiert. Die Aktivierung wurde durch die Zugabe von 11 µl Ovomucoidlösung (25 mg/ml) gestoppt. So präparierte Granula waren bis zu 6 h stabil. Alternativ wurden an Stelle des Trypsins 5 bis 20 µl partiell gereinigter Aktivator aus *R. rubrum* eingesetzt. In jenen Fällen wurde den Ansätzen nach der Vorinkubation kein Ovomucoid zugesetzt. Die Messungen erfolgten im Mikrotiterplattenreader nach 2.10.1.2.

#### **2.10.1.4. Qualitativer Test auf hydrolytische Aktivität**

Natriumhypochlorit-gereinigte dPHA<sub>SCL</sub>, Chloroform/Methanol-gereinigte PHA<sub>MCL</sub> (Endkonzentration 500 µg/ml) oder Lipase-Substrate (s. 2.10.1.4., 2.10.4.), wurden in 200 µl 5 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1 mM CaCl<sub>2</sub> mit 1 mg/ml Orange I pH-Indikator suspendiert bzw. emulgiert. Durch Zugabe von in 5 mM Tris-HCl (pH 9,0) vorverdünnten Enzymen wurde die Reaktion gestartet und die Ansätze bei gegebener Temperatur (Standart 37°C) inkubiert. In entsprechenden Kontrollen wurde die mögliche chemische Hydrolyse der Substrate überprüft. Freisetzung von Säuregruppen bewirkte den Farbumschlag des Indikators nach gelb.

#### **2.10.1.5. Bestimmung von Hydrolaseaktivitäten durch Titration**

Da eine Bestimmung der Enzymaktivitäten mittels der unter 2.10.1. beschriebenen turbidimetrischen Routinetests nur einen indirekten Richtwert lieferte, wurde alternativ basierend auf der Methode von BACHMANN (1997) eine Versuchsanordnung zur quantitativen Bestimmung der Depolymeraseaktivitäten durch Titration der während der Polymerhydrolyse freiwerdenden Säurereste erstellt. Der Titrastat bestand aus pH Mikroelektrode, pH Meter 620, Impulsomat 614, Dosimat 665, 10 ml Bürette (Meterohm, Herisau, Schweiz). Ein Standard-Reaktionsansatz (4-10 ml) enthielt 250 µg/ml PHA in destilliertem Wasser bei 40°C. Der pH-Wert wurde durch die Zugabe von 10 µl Aliquots 2 mM NaOH (abhängig vom Experiment) konstant auf den Wert 9,0; 8,0 bzw. 7,5 eingeregelt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,5 bis 50 µg Depolymerase (verdünnt in 10 bis 100 µl H<sub>2</sub>O) gestartet und die Aktivität mit Hilfe des angeschlossenen Schreibers dokumentiert.

#### **2.10.1.6. Aktivitätstest mit ataktischem PHB**

Die Hydrolyse ataktischer PHB-Filme bei Inkubation mit Fraktionen von PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen wurden über den Masseverlust der Filme ermittelt (HANDRICK et al., 2001). Je 20 mg auf

Polyethylenträger aufgebracht aPHB-Film ( $A = 87,5 \text{ mm}^2$ ) wurde in 1,5 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM  $\text{CaCl}_2$  2 x 10 h vorinkubiert, um Kronenether-Rückstände aus der Synthese zu entfernen. Anschließend wurden die Proben mit der angegebenen Depolymerasen in 1,5 ml frischem Puffer inkubiert. In Intervallen von 20 h wurden die immobilisierten aPHB-Filme entnommen, getrocknet und die Massenänderung durch Differenzwägung (Mikroanalysenwaage; Sartorius AG, Göttingen; Meßbereich ) bestimmt. Die Messung wurde nach weiteren 8 h Trockne zur Sicherstellung der Massenkonstanz wiederholt. Anschließend erfolgte sukzessive Inkubation der Filme in frischer Enzymlösung für je weitere 20 h. Der Überstand wurde jeweils abgenommen, mit 1 Vol. Aceton versetzt und lyophilisiert. Ausgewählte Proben wurden analog 2.11.7. in der ESI-MS analysiert.

### 2.10.2. Bestimmung von 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase-Aktivität nach SHUSTER und DOUDOROFF (1962) [modifiziert]

Eine Messung der 3-HB-DH-Aktivität erfolgte im optisch-enzymatischen Test. Der Testansatz entsprach Punkt 2.11.1. Jedoch wurden anstelle des kommerziell erhältlichen Enzyms 5 bis 50  $\mu\text{l}$  Probe eingesetzt und die Reaktion mit 50  $\mu\text{l}$  D/L-3-Hydroxybutyrat (Stammlösung 100 mM) als Substrat gestartet.

### 2.10.3. Bestimmung von Esterase-Aktivitäten

Die Esterase-Aktivität wurde sowohl mit *p*-Nitrophenylbutyrat (*p*NPB = Butansäure-4-Nitrophenyl-Ester) als auch *p*-Nitrophenylacetat (*p*NPA= Ethansäure-4-Nitrophenyl-Ester) untersucht (nach WINKLER und STUCKMANN, 1979, modifiziert). Hydrolyse dieser künstlichen Substrate führt zur Freisetzung des *p*-Nitrophenolats, dessen intensive Gelbfärbung bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$  in folgendem Testansatz gemessen wurde:

<i>p</i> NPB bzw. <i>p</i> NPA (10 mM in 96 % EtOH)	10-30 $\mu\text{l}$
Probe	5-50 $\mu\text{l}$
Tris/HCl (100 mM, pH 7,9)	ad 1000 $\mu\text{l}$

Wahlweise wurden den Ansätzen Detergentien zugesetzt (Natriumcholate, SDS, TritonX100 oder Tween20). Aufgrund einer leichten Autohydrolyse der Esterverbindungen wurden die Ansätze bis zum Erreichen eines konstanten Verlaufes vorinkubiert. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  (405 nm, pH 7,9; 30 °C) des *p*-Nitrophenolations betrug  $14,925 \text{ [mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]$ .

### 2.10.4. Lipasetest (Triolein/Tributyryn) nach KOUKER und JAEGER (1987), modifiziert

Die Hydrolyse von Triolein (1,2,3-Tris-[*cis*]-9-octadecenoylglycerol) in Gegenwart des Farbstoffes Rhodamin B führt zur Entstehung von bei UV-Bestrahlung (366 nm) orangefarben fluoreszierenden Höfen auf Testagarplatten. Für die Herstellung entsprechender Testplatten wurden 7 ml Triolein oder Tributyrin zu 500 ml autoklaviertem auf 60°C abgekühltem Tris/HCl-Agar (100 mM, pH 8,0, 1,5 %

(w/v) Agar) gegeben und mit einem Ultra-Turax-Homogenisator (Janke und Kunkel KG, Staufen) emulgiert. Nach Zusatz von 5 ml einer 1 mg/ml Rhodamin B Stammlösung in H<sub>2</sub>O (sterilfiltriert) wurden die Platten gegossen. In Abhängigkeit von der Probenkonzentration wurden bis zu 10 µl Enzymlösung auf die Platten aufgetropft und bei 30, 37 oder 40°C inkubiert. Im Falle von PhaZ7 wurden auch Platten mit pH 9,0 verwendet.

Alternativ wurde die Lipaseaktivität in Flüssigkeit durch einen Titrationsassay im pH-Statens (s. 2.10.1.5.) überprüft. Hierfür wurden 150 µl Tributyrin, Triolein oder Olivenöl (SIGMA, Deisenhofen) für Lipasetests in 15 ml 1 % (w/v) Gummi arabicum oder 50 mM Natriumcholat mit Hilfe eines Ultrasonic Desintegrators suspendiert und auf den gewünschten Start-pH titriert. Für den jeweiligen Test wurden 4 ml der Suspension eingesetzt und bis zu 50 µg Enzym zugegeben.

Als Positivkontrollen in allen Tests dienten neben kommerzieller Lipase aus Schweineleber (Boehringer, Mannheim), Lipase aus Schweinepankreas, Phospholipase A2 (Rinderpankreas), Sphingomyelinase/Phosphodiesterase (*Bacillus cereus*) [SIGMA, Deisenhofen], CalB Lipase aus *Candida antarctica* (Chirazyme®; Roche AG, Schweiz) und Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* (NARDINI et al., 2000) sowie Esterasen aus *Pseudomonas fluorescens* (KREBSFÄNGER et al., 1998) und *Streptomyces diastatochromogenes* (KHALAMEYZER und BORNSCHEUER, 1999).

### 2.10.5. Proteasetest

Zur Detektion der Proteaseaktivitäten wurde auf drei Testverfahren zurückgegriffen.

Bei der Bestimmung der Proteaseaktivität nach KLINGENBERG (1991) wurde durch Caseinhydrolyse freigesetzten aromatischen Aminosäuren bei 280 nm nachgewiesen. Hierzu wurden 450 µl Caseinlösung (0,25 %, w/v, in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 bzw. 9,0) mit 50 µl (max. 25 µg) Protein versetzt und 30 min bei 30 bzw. 40°C inkubiert. Verbliebene Peptide wurden durch die Zugabe von 500 µl TCA (10 %, w/v) gefällt und bei 13000 Upm (Biofuge A, Haereus, Osterode) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in einer Quarzküvette bei 280 nm gemessen.

Casein diente ebenfalls in einem Plattentest als Substrat. Lösungen aus 10 % (w/v) Skim Milk und 2,6 % Agar in 100 mM Tris/HCl bei pH 8,0; 8,5 und 9,0; bzw. 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 wurden separat autoklaviert und im Anschluß 1:1 gemischt. Die Platten wurden bis zu 24 h bei 30°C bzw. 40°C inkubiert. Durch die Hydrolyse des milchigen Substrates entstanden klare Höfe. In beiden Fällen dienten Proteinase K und E sowie Trypsin als Positivkontrollen.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die Hydrolyse des Proteasesubstrates *N*-α-Benzoyl-L-arginin-4-nitranilid (BAPNA) untersucht. Die Spaltung dieses Substrates verlief nach:



Das Entstehen von 4-Nitranilin konnten durch eine Zunahme der Absorption bei 405 nm (intensive Gelbfärbung) nachgewiesen werden. Eine Überprüfung der Testbedingungen erfolgte mit Trypsin.

### **2.10.6. Abbau von Polycaprolacton**

Neben einem orientierenden Test der Proteine auf PCL-Testagar (s. 2.2.5.) wurden Trübungstests und Titrationsexperimente durchgeführt. Ansätze für die photometrische Messung der PCL-Depolymeraseaktivität enthielten 25 bis 50 mg PCL in 0,9 ml Tris/HCl (100 mM, pH 8,0 bzw. 9,0). Der Reaktionsstart erfolgte mit 100 µl Enzymlösung und die Trübungsabnahme wurde bei 650 nm verfolgt. Titrationstests erfolgten wie unter 2.10.1.5. beschrieben, wobei anstelle der PHA-Substrate 250 µg/ml PCL zum Einsatz kamen.

### **2.10.7. Cutinasetest**

Maximal 5 mg sukzessive in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und Tris-HCl (100 mM, pH 9,0) gewaschenes Cutin (BONNEN und HAMMERSCHMIDT, 1989; zur Verfügung gestellt von Prof. DEISING, Universität Halle-Wittenberg) wurden in 200 µl 0,5 mM Tris-HCl (pH 9,0) mit 1 mg/ml Orange I pH-Indikator bei 37°C für 80 bis 168 Stunden suspendiert. Als Positivkontrolle wurden 5 µg Pancreas Lipase (KOLATTUKUDY, 2001) sowie 50 µl Kulturüberstand einer Kultur von *Pseudomonas mendocina* (SEBASTIAN und KOLATTUKUDY, 1988). Die Reaktion wurde im Titristaten (s. 2.10.1.5.) bei wahlweise pH 8,0 oder 9,0 überprüft.

### **2.10.8. Stärkeabbautest**

Für einen Test auf Stärkehydrolyse wurden Testagarplatten mit 1 % (w/v) Maisstärke und 1,3 % (w/v) Agar No 5 (Oxoid) in 100 mM Tris/HCl bei pH 8,0; 8,5 und 9,0; bzw. 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, hergestellt. Nach Auftropfen von maximal 10 µl Enzymlösung (bis 50 µg Protein) wurden die Testansätze bei 40°C bis zu 12 h inkubiert. Ein Stärkeabbau wurde durch Überschichten der Platten mit Jod (1,3 %, w/v)/ KJ (2 %, w/v) in Form von nicht angefärbten Aufklärungszohnen sichtbar. Als Positivkontrolle diente Amylase aus Hefe.

### **2.10.9. Nachweis von Amidase/Nitrilase-Aktivitäten**

Zum Nachweis freiwerdender Ammonium-Ionen wurde der Aquaquant® Detektionskit (Merck, Darmstadt) eingesetzt. Das Testsystem beruht auf dem colorimetrischen Nachweis von 2,2'-Isopropyl-5,5'-methyl-indophenol. Die Tests erfolgten gemäß Herstellerangaben im Mikrotiterplattenphotometer bei 690 nm. Es wurden maximal 25 µg Enzym pro 200 µl Test eingesetzt.

## **2.11. Analyse von Produkten der enzymatischen Polyesterhydrolyse**

### **2.11.1. Enzymatischer Nachweis von 3-HB**

Das im Verlaufe der PHB-Hydrolyse *in vitro* freigesetzte Monomer D(-)-3-Hydroxybutyrat wurde im gekoppelten optisch-enzymatischen Test quali- und quantitativ bestimmt. Das Enzym 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (3-HB-DH) setzt D(-)-3-HB als Substrat in Gegenwart von NAD zu

Acetoacetat ( $\beta$ -Ketosäure) um. NAD wird zu NADH reduziert. Die Bildung der reduzierten Form (NADH) (und damit die im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 umgesetzte Menge des Monomers) wurde bei 366 nm im Form einer Extinktionszunahme gemessen. Die Bestimmung der Extinktionsänderung erfolgte mittels Anfangs- und Endwertbestimmung in 1 ml Plastikkuvetten gegen einen Reagenzienleerwert, der anstelle einer Probe nur Testpuffer enthielt.

MgCl <sub>2</sub>	1 mM
NAD (33 mM)	100 $\mu$ l
Probe	20-200 $\mu$ l
3-HB-Dehydrogenase (5 mg/ml, Boehringer Mannheim)	2,5 $\mu$ l
Tris-HCl (33mM, pH 8,0)	ad 1000 $\mu$ l

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und der Ansatz 1 h bei 30 °C bis zur Bestimmung der End-OD inkubiert. Falls erforderlich wurden die Proben mit Puffer verdünnt.

### 2.11.2. Darstellung von Diazomethan als Methylierungsreagenz

Für die Herstellung von Diazomethan wurde eine Destillationsapparatur bestehend aus einem Reaktionsgefäß (500 ml Zweihalsrundkolben mit Magnetrührstab im Ölbad) welches direkt mit einem Tropftrichter und über eine Destillierbrücke (Kühlung auf  $-30^{\circ}\text{C}$  durch einen Kryostaten) mit einem 500 ml Zweihalsrundkolben zum Auffangen des Produktes verbunden war. Zum Druckausgleich wurde an der dafür vorgesehenen Öffnung am produktseitigen Ausgang der Destillierbrücke ein Druckausgleichsballon angebracht. Die zweite Öffnung des Produktkolbens wurde mit einem Stopfen verschlossen und in Trockeneis/Aceton gekühlt. In den Reaktionskolben wurden 16,5 g KOH, 23,5 ml H<sub>2</sub>O, 23,5 ml Diethylether und 85 ml Carbitol (Diethylenglycolmonoethylether) vorgelegt, das Ölbad auf  $60^{\circ}\text{C}$  temperiert und die Destille auf  $-30^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Der Tropftrichter wurde mit 250 ml 480 mM Diazald (*N*-Methyl-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamid; Sigma Aldrich, Deisenhofen) in Diethylether befüllt und die Reaktion durch vorsichtiges Zutropfen des Diazald unter stetiger Durchmischung gestartet. Nach Verbrauch wurde der Tropftrichter erneut mit 250 ml Diazald-Lösung befüllt und die Reaktion fortgeführt. Abdestilliertes Diazomethan in Diethylether wurde in dunklen Flaschen mit Korkverschluß (100 ml Aliquots) im explosionsgeschützten Gefrierschrank bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

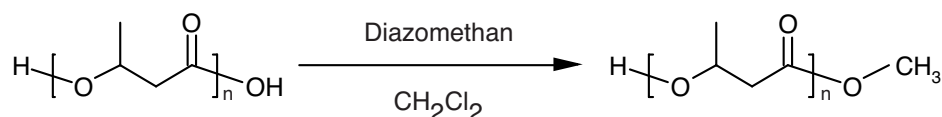
### 2.11.3. HPLC-Analytik oligomerer 3-Hydroxybuttersäureester nach BACHMANN et al. (1999) [modifiziert]

Um neben der Geschwindigkeit des Abbaues von Substratestern auch Einblick in das Spektrum der gebildeten kurz-kettigen 3-Hydroxybutyrat-Oligomere zu erhalten, wurde für die Analytik der in den Titrationsexperimenten (2.10.1.5.) erhaltenen Abbauprodukte neben der ESI-Massenspektrometrie (2.11.7.) die Normalphasen High Performance Liquid Chromatography (HPLC) eingesetzt. Sie erlaubte eine Auftrennung nach Kettenlänge und Molekulargewicht. Die HPLC-Anlage (Kontron, Eching) bestand aus 2 HPLC-Pumpen 420, einem Mischer M491, UV-Detektor 430, RI-Detektor ERC



7014, einem Autosampler 465, einem auf 25°C temperierten Säulenofen und einem Personalcomputer mit MT2-Software zur Steuerung. Die Detektion erfolgte bei 210 nm, wobei die mit der Kettenlänge wachsende Zahl chromophorer Gruppen in den Oligomeren additiven Gesetzen gehorchte (MUKAI et al., 1993; BACHMANN, 1997). Die ermittelten Peakflächen ließen Rückschlüsse auf die molaren Verhältnisse der vorhandenen Oligomere zu. Lagen zum Beispiel Dimer und Tetramer äquimolar vor, so zeigte das Tetramer ein zweifach stärkeres Signal (relative Peakflächeneinheiten).

Die dem Titrationsansatz entnommenen Proben wurden unmittelbar auf pH 7,0 titriert, mit 1 Volumen eiskaltem Aceton versetzt und bei -70°C schockgefroren, um die Reaktion zu stoppen. Anschließend wurden die Proben in einen 100 ml Rundkolben transferiert und unter Vakuum gefriergetrocknet. Der verbliebene Rückstand wurde in 5 ml destilliertem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mit 0,1 % (v/v) Essigsäure aufgenommen und in einen 10 ml Spitzkolben überführt. Im Rotationsverdampfer wurde die Lösung bei 250 mbar auf mindestens 500 µl eingeengt. Hydroxyfettsäuren bzw. Polyhydroxyfettsäure-Oligomerester wurden einer Methylierungsreaktion durch kontinuierliches Zutropfen von in Diethylether gelöstem Diazomethan unterzogen (Abb. 3). Die Reaktion war abgeschlossen, wenn die gelbe Färbung erhalten blieb. Das Lösungsmittel wurde bei Raumtemperatur abgedampft und die entstandenen Methylester in 100 µl Dichlormethan gelöst.



**Abb. 3:** Umsatz von 3-Hydroxybuttersäure-Oligomeren zu entsprechenden Methylestern mit Diazomethan.

Der Erfolg der Methylierung wurde durch DC-Analysen (2.11.4.) kontrolliert. Die Separation der Methylester erfolgte in der HPLC mit einer Normalphasen-Kieselgel-Säule (Lichrosorb Si-60, 250 x 4 mm, 7 µm; Chrompack/VARIAN, Darmstadt). Es wurden maximal 50 µl Probe in Dichlormethan mit Hilfe des Autosamplers injiziert. Die Elution erfolgte isokratisch mit n-Hexan/2-Propanol (96:4; v/v) bei einem Fluß von 3 ml/min und einem Gegendruck von 80 bis 100 bar. Die Retentionszeit stieg mit zunehmender Kettenlänge der Methylester.

#### 2.11.4. Nachweis von PHA-Oligomeren mittels Dünnschichtchromatographie

Der Erfolg der Methylierung von Hydrolyseprodukten nach 2.11.3. wurde durch Dünnschichtchromatographie überprüft. Mit Hilfe von 10 µl Mikrokapillaren wurden 2 bis 50 µl der in Diethylether gelösten Probe auf Kieselgelplatten mit UV-Indikator (AlugramSIL G<sub>254</sub>, Silicagel 60 F<sub>254</sub> auf Aluminiumträgerfolie, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte mit Petrolether/Aceton (3:1) oder Hexan/2-Propanol (96:4) als Laufmittel im 250 ml Schraubdeckelglas. Nach dem Lauf wurde die Lauffront mit Bleistift markiert, die DC-Platte getrocknet und durch Aufsprühen von 0,1 % (w/v) Anilinonaphthalinsulfonsäure oder Kaliumpermanganat (gesättigt in H<sub>2</sub>O) gefärbt. Im UV-Licht detektierte Spots wurden mit Bleistift markiert. Eine Identifikation der getrennten Produkte erfolgte über den R<sub>f</sub>-Wert mit Hilfe von Referenzsubstanzen.

### 2.11.5. Synthese monodisperser 3-HB-Oligomersubstrate

Die Darstellung von monodispersen Oligomeren kurzer Kettenlängen ( $n \leq 8$ ) für Abbauuntersuchungen zur Verifizierung des Enzymmechanismus erfolgte über ein selektives Segmentkupplungsverfahren selektiv geschützter Edukte (SEEBACH et al., 1994; BACHMANN und SEEBACH, 1998). (*R*)-3-Hydroxybuttersäure wurden aus Poly-[(*R*)-3-HB] mikrobiellen Ursprungs durch saure Hydrolyse gewonnen. Die Hydroxygruppe und die Carboxygruppe wurden vollständig benzyliert und der erhaltene Ester in Gegenwart von NaOH/H<sub>2</sub>O/Methanol zur (*R*)-3-Benzoyloxybuttersäure verseift. (*R*)-3-Hydroxybuttersäure-*tert.*-butylester wurde aus (*R*)-3-Benzoyloxybuttersäure synthetisiert. Mit Hilfe von Thionylchlorid wurde (*R*)-3-Benzoyloxybuttersäure in das entsprechende Säurechlorid überführt und mit *tert.*-Butanol/Pyridin zum *tert.*-Butylester umgesetzt, welcher hydrogenolytisch (Katalysator: 10 % Palladium auf Aktivkohle, H<sub>2</sub>, Ethanol zur Abspaltung der Benzylgruppe) entschützt werden konnte, so daß (*R*)-3-Hydroxybuttersäure-*tert.*-butylester entstand. Enantiomerenreine Benzylgeschützte Säure wurde mittels Thionylchlorid in Gegenwart katalytischer Mengen *N,N*-Dimethylformamid in das Säurechlorid überführt und mit *tert.*-Butyl-geschütztem Alkohol in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bei 0°C zum vollgeschützten Dimer kondensiert. (Die Bezeichnungen „Dimer“, „Trimer“, etc. beziehen sich auf die Anzahl der jeweils kondensierten 3-HB-Einheiten.) Ausgehend von (*R*) oder (*S*) konfigurierten Edukten konnten alle vier vollgeschützten Stereoisomere des 3-Hydroxybuttersäure-Dimers dargestellt und in einer sich anschließenden Destillation gereinigt werden. Zur Herstellung von Tetrameren wurde von vollgeschützten Dimeren ausgehend entweder selektiv durch Trifluoressigsäure in wasserfreiem Methylenchlorid die *tert.*-Butylesterschutzgruppe abgespalten oder der Hydroxyterminus wie bereits beschrieben hydrogenolytisch entschützt. Die dimere Säure wurden analog zur Dimersynthese (jedoch unter Verwendung von Oxalylchlorid anstelle des Thionylchlorids und Pyridinzugabe bei -78°C zur Minderung einer baseninduzierten Eliminierung einzelner 3-HB-Einheiten) in das entsprechende Säurechlorid überführt und mit dem *tert.*-Butyl-geschützten Alkohol gekuppelt. Die erhaltenen Produkte waren wiederum voll geschützt, wiesen jedoch die doppelte Kettenlänge des Ausgangspolymers auf. Entschützt wurde analog zur Herstellung des Dimeres. Die Darstellung von Oktameren erfolgte nach der gleichen Methode ausgehend vom partiell entschützten Tetramer. Alle weiteren Oligomere konnten durch eine Kombination entsprechend geschützter Edukte analog dem beschriebenen Verfahren gewonnen werden (Abb. 4). Zur Klärung der Frage, ob es sich um einen *endo*- oder *exo*-hydrolytischen Esterasemechanismus handelte und zur Überprüfung der Stereospezifität, wurden neben Oktameren mit ein bis vier terminalen (*S*)-3-HB-Einheiten auch zyklische Oligomere (Oligolide) eingesetzt. Die Darstellung von Oligoliden erfolgte nach PLATTNER et al., 1993 sowie INANAGA et al., 1979. Ölartige Produkte wurden chromatographisch (FC), Feststoffe durch Tieftemperaturumkristallisierung gereinigt. Die Produktqualität wurde per Infrarotspektroskopie, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR und MALDI-MS (Monodispersität) geprüft. Die Synthese aller in dieser Arbeit verwendeten offenkettigen, zyklischen und konfigurationsdefinierten 3-Hydroxybuttersäure-Oligomere erfolgte in der Arbeitsgruppe von

Professor D. Seebach durch B. M. Bachmann und P. Waser im Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich.

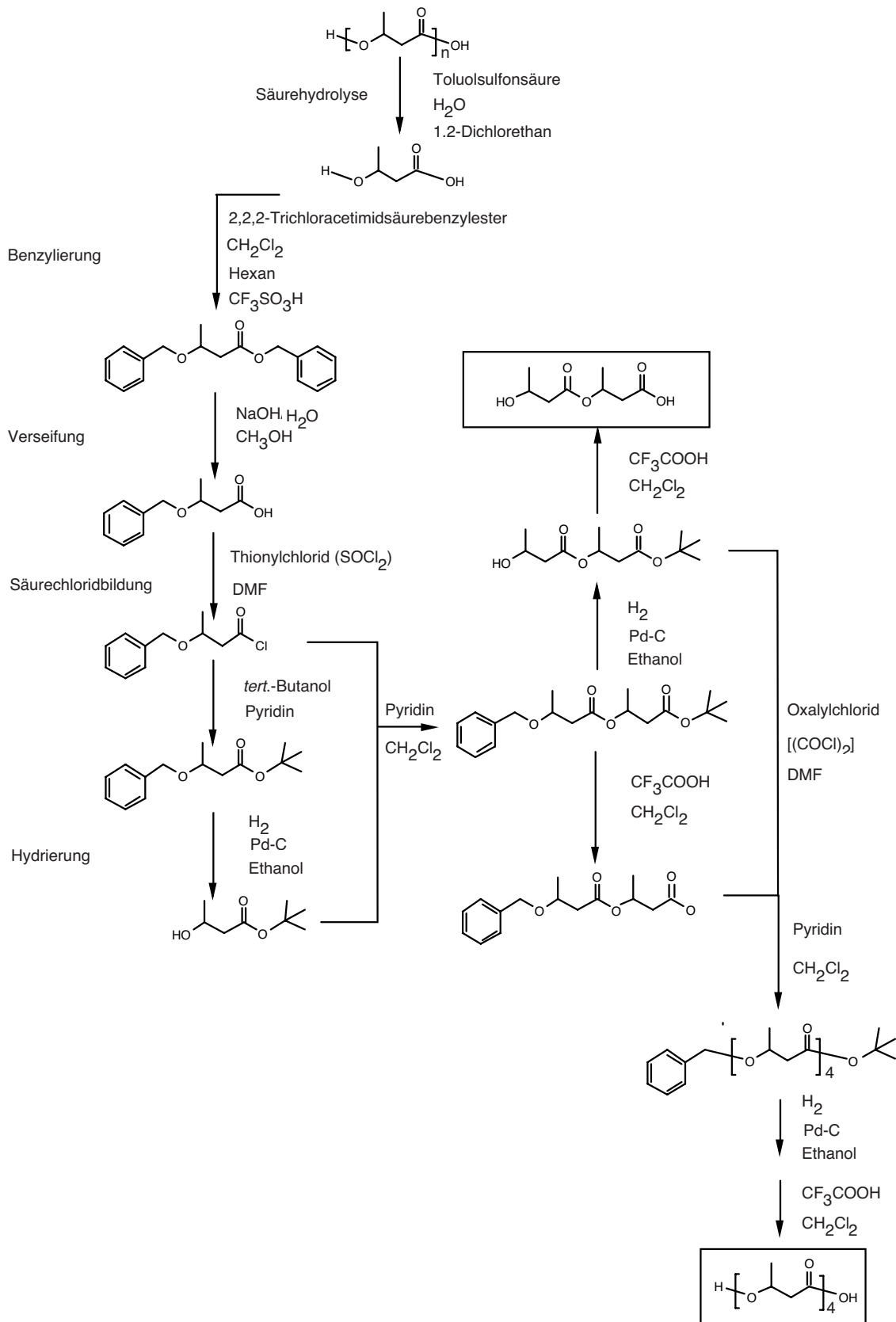


Abb. 4: Schutzgruppensynthese von 3-Hydroxybuttersäure-Oligomeren nach BACHMAN (1997).

### 2.11.6. Gaschromatographie

Zur Bestimmung des PHA-Gehaltes von Zellen und der Monomerenzusammensetzung wurden die Methoden nach BRANDL et al. (1988), TIMM und STEINBÜCHEL (1990) modifiziert. Grundlage einer solchen Analyse ist die säurekatalysierte Methanolyse der PHA, welche zur Entstehung der monomeren 3-Hydroxyalkanoatmethylester führt. Diese Fettsäuremethylester (FAME) lassen sich gaschromatographisch trennen.

Zur Vermeidung von Nebenreaktionen mit Wasser mußten alle eingesetzten Chemikalien einen höchstmöglichen Grad an Trockenheit aufweisen. Chloroform (Fa. Merck, Darmstadt) wurde durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  getrocknet und destilliert. Methanol (Reinheitsgrad: „zur Chromatographie“, 0,01 % (v/v) Wasser) und konzentrierte Schwefelsäure (Reinheitsgrad: „p.A.“) wurden ebenfalls von Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

#### 2.11.6.1. Vorbereitung der Analyse von PHA aus ganzen Zellen

Zu Beginn der Arbeit wurden je 10 ml später 100 ml Probe (Kulturdichten zwischen 100 und 300 Kletteinheiten) aus der zu untersuchenden Kultur abgenommen und mittels Zentrifugation sedimentiert (s. 2.5.). Das Pellet wurde in einem Probenvolumen 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Es schloß sich ein Lyophilisationsschritt (48 h, Gefriertrocknungsanlage Typ: VaCo II, Fa. Zirbus, Osterode) zur Trocknung an. Die Lagerung der Lyophilisate erfolgte bei Raumtemperatur. Überschritt die Lagerungsdauer 3 Tage, wurde vor einer weiteren Aufbereitung der Proben erneut lyophilisiert.

#### 2.11.6.2. Vorbereitung der Proben zur Bestimmung des PHB-Gehaltes nativer Granula

Die nach Zellaufschluß (2.5.2.) und Dichtegradientenzentrifugation (2.12.) erhaltenen PHB-Granula aus *Ralstonia eutropha* H16 wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen, zentrifugiert (13000 Rpm, 15 min) und analog den Proben aus ganzen Zellen lyophilisiert (2.11.6.1.). Exakte Wägung des Lyophilisates bezogen auf das jeweils eingesetzte Volumen Granulasuspension diente der Ermittlung der in Experimenten zur *in vitro*-Aktivität nativer Granula eingesetzten Granulamenge (mg/ml).

#### 2.11.6.3. Saure Methanolyse nach BRANDL et al. (1988)

Die weitere Behandlung der Proben verlief einheitlich. Bis 10 mg des lyophilisierten Materials wurden in Schraubdeckelröhrchen mit Teflon-Dichtung (Fa. Pyrex, Frankreich) auf einer Analysenwaage (Fa. Sartorius, Göttingen) exakt eingewogen. Im Anschluß wurden 1 ml angesäuertes Methanol [15 % (v/v)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ] und 1 ml des getrockneten und destillierten Chloroforms zugesetzt, die Röhrchen fest verschlossen und gut durchmischt. Die Reaktion erfolgte bei  $100\text{ }^\circ\text{C}$  im Ölbad. Nach 140 min Inkubation und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 1 ml Benzoesäuremethylester-Eichstammllösung (2 mg/ml Chloroform) hinzugegeben und die Ansätze zur Auswaschung von hydrophilen Zellbestandteilen und Verunreinigungen mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  versetzt und die Ansätze kräftig durchmischt. Um die Phasentrennung zu beschleunigen, wurde bei 4500 Upm (Sorvall-Zentrifuge, Schwenkbecherrotor Typ 11140) zentrifugiert. Die Abnahme der die gelösten

Methylester enthaltenden organischen (unteren) Phase erfolgte mittels über der Bunsenbrennerflamme ausgezogener Pasteurpipetten. Kleine Schraubdeckelröhrchen, deren Deckel zum Schutz vor Evaporation mit einer Teflon-Dichtung versehen worden waren, dienten der Probenaufbewahrung. Bei -20 °C gelagerte Proben blieben mindestens 5 Tage stabil.

#### **2.11.6.4. Analysenbedingungen**

Die quali- und quantitative Beschaffenheit der 3-Hydroxyalkanoatmethylester wurde an einem mit Flammen-Ionisations Detektor (FID) ausgerüsteten Gaschromatographen der Fa. SRI Instruments, Torrance, USA) mit Trägergas-Split-Option bestimmt. Als Trennsäule wurde eine Kapillarsäule (WCOT-Fused Silica 25MXO, coating CP-SIL5CB/DF= 0,4 mm, Innendurchmesser 0,25 mm, Länge 25 m, Fa. Chrompack) eingesetzt. Wasserstoff (Reinheitsgrad: 99,999 %, Fa. Messer, Griesheim) und synthetische Luft dienten als Brenngase. Die automatische Gasdruckregelung wurde auf folgende Werte eingestellt: H<sub>2</sub> 21 PSI, O<sub>2</sub> 8 PSI, N<sub>2</sub> (Reinheitsgrad: „4,6“, über Oxysorbkartusche Sauerstofffrei) 14 PSI. Die Flußrate des Trägergases betrug 30 ml/min (Splitverhältnis 1:20). Die Injektortemperatur lag bei 150°C, die des FI-Detektors 100°C. War neben dem internen Standard (Benzoessäuremethylester) ausschließlich 3-Hydroxybuttersäuremethylester zu quantifizieren, wurde die Temperatur ausgehend von 80°C (5 min) mit einer Rate von 15°C/min auf 180°C erhöht. Für komplexere Proben längerkettiger Fettsäuremethylester (FAME C5-C10) wurde zur besseren Trennung ein Gradient von 8°C/min bei einer Gesamtanalysezeit auf 15 min verwendet.

Injiziert wurde 1 µl der Chloroformphase mittels Autosampler (SRI Instruments, Torrance, USA).

#### **2.11.6.5. Peakidentifizierung und Peakquantifizierung**

Eine Zuordnung der 3-Hydroxyalkanoatmethylester konnte über die Auswertung der Retentionszeiten vorgenommen werden. Die hierfür benötigte Standardreferenzlösung wurde wie folgt erstellt: Je 10 mg der nach der Natriumhypochlorid-Methode extrahierten reinen Polymere PHB, PHV und P(3HO) wurden analog zu Punkt 2.11.6.3. der sauren Methanolyse unterzogen. Zu Beginn jeder neuen GC-Meßreihe wurde mit den erhaltenen FAMES ein Referenzchromatogramm aufgenommen. Einer endgültigen Absicherung der Identität der Probenpeaks diene die zeitgleiche Injektion von 1 µl Standardlösung und 1 µl Probe. Bei identischen FAMES ist nur ein Peak zu erwarten.

Zur mengenmäßigen Erfassung des Gehaltes an Gesamtspeicherstoff in Prozent vom Trockengewicht der Zellen bzw. mg PHB pro mg lyophilisierter nativer PHB-Granula, wurden Eichgeraden der 3-Hydroxyalkanoat-Methylester im Bereich von 0,5-10,0 mg eingesetztes Polymer erstellt. Injiziert wurde ein dem Probenvolumen adäquates Volumen der in Chloroform gelösten Standardmethylester. Für Standard und Probe wurden die gleichen Temperaturprogramme verwendet. Mit zunehmender Konzentration des Standard-3-Hydroxyalkanoates stiegen die Peakflächeninhalte linear an. Durch lineare Regression ließ sich aus den Peakflächen unbekannter Proben die Menge des monomeren 3-Hydroxyalkanoates in mg ermitteln. Die Integration der relevanten Peakflächen erfolgte über die PEAK-Simple GC-Software. Zur Korrektur des Volumenfehlers bei der Injektion diene Benzoessäuremethylester, BME (JAN et al., 1995). Die von den Autoren vorgeschlagene Zugabe des

internen Standards zum Chloroform bereits vor der Methanolyse (2.11.6.3.) erwies sich als ungünstig. Stieg der 3-Hydroxyalkanoat-FAME Gehalt in der Probe lag die Menge detektierten BMEs signifikant niedriger als in Referenzproben ohne oder mit weniger 3-HA-FAME. Offenbar kann in den Ansätzen unter den beschriebenen Bedingungen eine entsprechende Umesterung stattfinden. Aus diesem Grunde erfolgte die Zugabe von 1 ml BME-Eichstammlösung (2 mg/ml Chloroform) zum Methanolyseansatz erst nach erfolgter Methanolyse bei Raumtemperatur.

### **2.11.7. Elektronenspray Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS)**

Zur Analyse der Produkten des enzymatischen Abbaues von PHB, PHV und verschiedenen oligomeren 3-Hydroxyfettsäureestern wurde die besonders schonende ESI-Massenspektrometrie angewandt (KURCOK et al., 1992; JEDLINSKI et al., 1995). Die Messungen erfolgten an einem „LCQ ion trap mass spectrometer“ (Finnigan, San Jose, CA, USA). Im Titrationsexperiment (s. 2.10.1.5.) oder im turbidimetrischen Test (s. 2.10.1.1.) gewonnene lyophilisierte Probe wurden in Chloroform/Methanol, 10:1 (v/v)] gelöst und mit Hilfe der Injektorpumpe kontinuierlich bei 3 µl/min in die Elektronenspray Ionisations-Einheit injiziert. Zur Herstellung des Probenaaerosols wurde trockener Stickstoff verwendet. Das Gerät wurde bei einer Kapillartemperatur von 200°C und einer Spannung von 4,25 kV betrieben. Eine Kontrolle der Identität verschiedener Peaks erfolgte anhand ihrer Fragmentierungsmuster nach ESI-MS<sup>n</sup>-Analysen (KOWALCZUK et al., 2000). Anhand ihrer Massen ausgewählte monoisotopische Ionen wurden in der Ionenfalle isoliert und bei 33 % Ejections-Radiofrequenz- (RF) amplitude bei Standard Heliumdruck kollisionsaktiviert. Routinemäßig wurde im Negativ-Ionen Modus gearbeitet. Eine Quantifizierung der absoluten Mengen der detektierten Produkte aus den Spektren war nicht möglich. Aus der Signalintensitätsverteilung der Ionen konnten jedoch aufgrund eines beschriebenen linearen Zusammenhanges die relativen Anteile der einzelnen 3-HB-Oligomere (mol %) am Gesamt-Oligomerspektrum abgeleitet werden (MONTAUDO et al., 1996; FOCARETE et al., 1999). Die Untersuchungen wurden in enger Zusammenarbeit mit Grazyna Adamus und Dr. Marek Kowalczuk (Polnische Akademie der Wissenschaften, Zentrum für Polymerchemie, 41-800 Zabrze, Polen) durchgeführt.

### **2.11.8. Abschätzung des PHA Gehaltes von Zellen –Nilrotfärbung (STEINBÜCHEL et al., 1999)**

Ein Aliquot der zu untersuchenden Bakterienkultur wurde in 0,9% NaCl gewaschen und mit 25 µl Nilrot (1 µg/ml Aceton) resuspendiert. Vorhandene PHA Granula konnten im Anschluß unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Axioskop, Zeiss, Oberkochen) unter Verwendung der Filtereinstellungen BP 546 nm, FT 580 nm, LP 590 nm mit 1000-facher Vergrößerung dargestellt werden. Die PHA-Granula erschienen bei dieser Methode als orangerot fluoreszierende Einschlußkörper. Als Negativkontrolle diente *R. eutropha* H16 PHB-4 (SCHLEGEL et al., 1970), eine PHB-negative Mutante von *R. eutropha* H16.

## **2.12. Isolierung nativer PHB-Granula nach WIECZOREK et al. (1996) [modifiziert]**

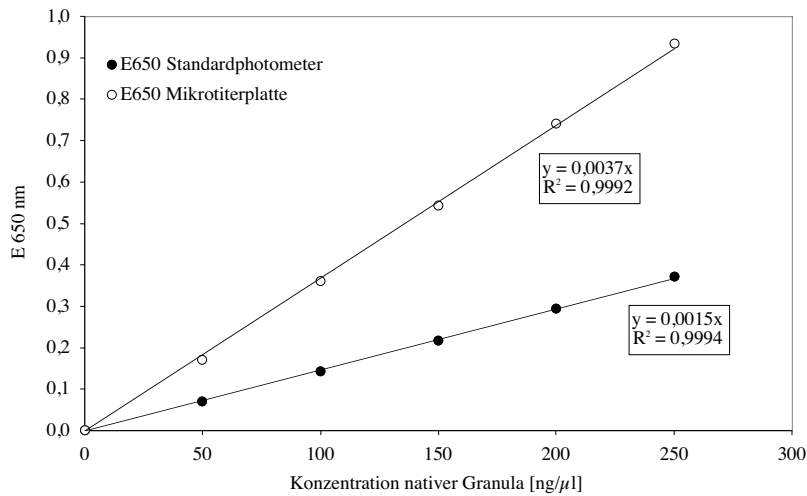
Alle Schritte wurden bei 5-8 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Das nach dem Zellaufschluß (2.5.2.) erhaltene Probenmaterial wurde im Glycerol-Dichtegradienten separiert. Ein erster Glycerolgradient, hergestellt durch Überschichtung von 5 ml 87 % (v/v) mit 10 ml 50 % (v/v) Glycerol in Tris/HCl, pH 8,0 (eingefroren bei -70 °C, langsam aufgetaut bei 4 °C) wurde mit je 15 ml Rohextrakte überschichtet. Nach 40 min Zentrifugation bei 20000 Rpm (100000 x g, Temperatur 4 °C, Rotor AH629) in einer Ultrazentrifuge des Typs Sorvall OTD-50B (Du Pont de Nemours, Newton, Conn., USA) akkumulierten die Granula in Form einer weißen Bande im Bereich von des 87 % Glycerolpolsters, wohingegen größere Zelltrümmer pelletierten. In Abhängigkeit von der Probendichte und der daraus resultierenden Bandenkonsistenz wurden die PHA-Granula entweder mittels Perestaltikpumpe unter Verwendung einer Kanüle von 1,5 mm Innendurchmesser, oder mit Hilfe einer automatischen Pipette mit geweiteter (abgeschnittener) Spitze abgenommen und mit 1 Volumen Tris/HCl (pH 8,0) versetzt. Jeweils 10 ml dieser Granulasuspension wurde auf einen zweiten Glycerolgradienten [hergestellt durch Überschichten von je 5 ml 87 %, 80 %, 60 % und 40 % (v/v) Glycerol in Tris/HCl (pH 8,0); nach Einfrieren bei -70 °C bei 4 °C aufgetaut] aufgetragen und bei 20000 Rpm (100000 x g, 4 °C) in der Ultrazentrifuge 40 min zentrifugiert. Die resultierenden PHA-Banden wurden analog zum ersten Gradienten abgenommen, falls erforderlich mit 60 % (v/v) Glycerol [in Tris/HCl (100 mM, pH 8,0)] verdünnt, wodurch ein Sedimentieren der PHA-Granula unterbunden und die Lagerung auf Eis und bei -20°C möglich wurde.

### **2.12.1. Charakterisierung nativer PHA-Granula - Bestimmung von Zusammensetzung, Trockenmasse, apparentem Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichtsverteilung**

Für den Einsatz als Substrat in enzymatischen Tests war eine Charakterisierung der nach 2.12. gewonnenen PHA-Granula erforderlich. Die Bestimmung der Trockenmasse erfolgte ausgehend von 250 µl Granula-„Stammlösung“. Um das als Stabilisator und im Dichtegradienten (2.12.) eingesetzte Glycerol zu entfernen, wurde die Probe mit 10 ml H<sub>2</sub>O verdünnt und die Granula bei 5000 x g (Sigma-Laborzentrifuge) pelletiert. Die Pellets wurden in zuvor ausgewogene 2,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 3 mal mit je 2 ml Wasser gewaschen. Zur Trockne wurden die gewaschenen PHA-Granula lyophilisiert (Christ Gefriertrocknungsanlage, Christ, Osterode). Nach 2 Tagen waren die Proben massenkonstant. Es wurden je 4 Parallelansätze vermessen. Die erhaltenen Werte variierten für native Granula aus *R. eutropha* H16 je nach Präparation zwischen 0,6 bis 0,91 µg/µl und wurden für jede nach 2.12. gewonnene Granulacharge neu ermittelt.

Der Extinktionskoeffizient wurde durch eine Eichreihe bis 250 µg native PHA-Granula pro ml 100 mM Tris/HCl (pH 9,0) sowohl im Standard-Photometer (10 mm Plastikkuvetten) als auch im Mikrotiterplattenreader (96-Well- Mikrotiterplatten, NUNCLON™, NUNC™, Brand Products,

Dänemark; Power Wave<sub>x</sub> MTP-Reader mit KC4 Software, Bio-tek<sup>©</sup> Instruments, Inc., USA) bestimmt (Abb. 5).



**Abb. 5:** Bestimmung des Extinktionskoeffizienten nativer PHB-Granula aus *R. eutropha* H16 im Standardphotometer (1 cm Küvettendurchmesser) und im Mikrotiterplattenreader (Power Wave X, Bio-Tek<sup>®</sup> Instruments, Inc., USA; Mikrotiterplatten: NUNCLON<sup>™</sup>, NUNC<sup>™</sup>, Brand Products, Dänemark).

Für native PHB-Granula (nPHB) aus *R. eutropha* H16 ergab sich ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon = 1,5 \mu\text{l} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ . Der Extinktionskoeffizient denaturierter PHB (dPHB) lag bei  $3,2 \mu\text{l} \times \mu\text{g}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

Die getrockneten PHA-Granula wurden im Anschluß an die saure Methanolyse (2.11.6.3.) zur gaschromatographischen Analyse nach 2.11.6.4. eingesetzt und Menge sowie Zusammensetzung des reinen PHA-Anteiles bestimmt. Der Proteingehalt wurde nach LOWRY et al. (1951) ermittelt (2.7.1.). Für die verwendeten Granulapräparationen ergaben sich Polymergehalte von 79 bis 86 % (w/w).

Die Molekülmasse sowie die Polydispersität ( $M_w/M_n$ ) wurden durch Gelpermeationschromatographie (2.6.11.) bestimmt. Für die nativen PHB-Granula aus *R. eutropha* H16 wurden folgende Werte ermittelt:  $M_n = 1,09 \times 10^6$ ,  $M_w = 1,96 \times 10^6$ ,  $M_w/M_n = 1,8$ ,  $M_z = 2,67 \times 10^6$ ,  $M_v = 1,96 \times 10^6$ . Auch hier traten Abweichungen in Abhängigkeit von der jeweiligen Präparation auf.

### 2.13. Herstellung artifizieller PHA-Granula nach HOROWITZ und SANDERS (1994), modifiziert

Sogenannte artifizielle PHA Granula, in welchen der Polyester ähnlich den *in vivo* vorkommenden nativen PHA-Granula in amorpher Form vorliegt, wurden mit Hilfe von Detergentien hergestellt, die aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften in der Lage sind, in wässriger Lösung um das hydrophobe Polymer eine stabilisierend wirkende Hülle zu bilden. Durch Natriumhypochloritbehandlung und Lösungsmittelextraktion mit Aceton/Diethylether (2.2.3.) gereinigtes (Protein-freies) PHA (12,5 % w/v) gelöst in Chloroform bei 65°C wurde mit 10 Volumen Natriumcholat-, CTAB- oder SDS-Lösung (50 mM) versetzt und durch Ultraschall (UW200 Sonifier, Brandelin GmbH, Berlin; Ultraschallsonde 9 mm, Zyklus: 50, Amplitude: 40 %) emulgiert. Verbliebenes Lösungsmittel wurde im Rotations-



verdampfer bei 65°C abgezogen. Zur Gewinnung hochreiner artifizieller Granula wurde die Suspension analog der für native PHA-Granula beschriebenen Methode durch Dichtegradientenzentrifugation gereinigt (nur erster Gradient, s. 2.13.). Die erhaltene Granulasuspension blieb bei 8°C bis zu einer Woche stabil.

#### **2.14. Isolierung, Fraktionierung und Nachweis polarer und unpolarer Lipide**

Für die Lipidextraktion wurden bis zu 10 g Probenmaterial (hartgekochtes Hühnereigelb, gewaschene trockene Pellets von *E. coli*, *B. subtilis*, *Sphingomonas sp.*) lyophilisiert, mit einem Mörser zerkleinert und mit je 20 ml Chloroform:Methanol (1:1, v/v) dreimal sukzessive extrahiert. Zur Abtrennung partikulärer Rückstände wurden die Extrakte über Glaswolle abfiltriert. Die Ansätze wurden in 2,5 ml Aliquots auf Pyrex-Schraubdeckelröhrchen mit je 1 Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> versetzt, gründlich durchmischt und zur Beschleunigung der Phasentrennung 10 min bei 4000 Upm zentrifugiert (Laborzentrifuge SIGMA 4K10, Schwenkbecherrotor 11140; Fa. SIGMA Laborzentrifugen, Osterode). Die polare Oberphase wurde verworfen und die verbliebene Lösungsmittelphase erneut mit 1 Volumen Wasser ausgeschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde die untere Phase abgenommen (jeweils alle Lösungsmittelphasen einer Probe vereinigt) und über ein Chloroform-getränktes Papierfilter in einen 50 ml Schliffkolben filtriert. Am Rotationsverdampfer erfolgte die Konzentrierung der Proben bis zum Erhalt eines ölartigen Rückstandes. Dieser alle Lipide enthaltende Rückstand wurde in 2 ml CHCl<sub>3</sub> gelöst.

Zur Fraktionierung des Lipidextraktes wurde eine Glassäule nacheinander mit 10 ml Chloroform und 2,5 g Kieselgel (Partikelgröße 63-100 µm) gepackt. Nach Sedimentation der Kieselgelpartikel wurde überständiges Lösungsmittel durch Öffnen des Säulenauslaufes entfernt und das Säulenbett mit einer Glaswollfritte geschützt. 2 ml Lipidextrakt in CHCl<sub>3</sub> wurden mittels Glaspipette aufgetragen und nach dem Eindringen in den Gelstock apolare Lipide (z.B. Cholesterin und Triglyceride) durch Spülen mit 30 ml Chloroform ausgewaschen. Das Eluat wurde in 50 ml Schliffkolben gesammelt. Zur Elution polarer Lipide (Phospholipide, Sphingolipide) folgte ein Elutionsschritt mit 30 ml Methanol. Die gesammelten Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingeengt. Der verbliebene Rückstand wurde in 5 ml (apolare Lipide) bzw. 2,5 ml (polare Lipide) Chloroform:Methanol (2:1, v/v) aufgenommen und bis zur Verwendung in GC-Analysenröhrchen bei -20°C gelagert.

Die Kontrolle der Reinigung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC). Die DC-Kieselgelplatten mit UV-Indikator (AlugramSIL G<sub>254</sub>, Silicagel 60 F<sub>254</sub> auf Aluminiumträgerfolie, Merck, Darmstadt) wurden nach Auftrag von 10 µl Probe (bzw. Lipidstandard: Cholesterin, Cholesterinester, Triglyceride, Oleat, Lecithin) in Petrolether [40-60°] : Diethylether (70:30, v/v) vertikal aufsteigend entwickelt. Die Detektion erfolgte im UV-Licht.

Für den Einsatz als Substrat wurden mittels Ultraschall Emulsionen von je 25 µl Lipidextrakt in 1 ml Testpuffer (erforderlichenfalls in Gegenwart der gewünschten Emulgatoren, Detergentien: 1 % (w/v)

Gummi arabicum; 50 mM Natriumcholat; 0,01 % (v/v) Tween20 bzw. Tween80) hergestellt. Lipolytische Aktivität wurde nach 2.10.1.4. sowie 2.10.1.5. bestimmt.

## **2.15. Generierung interner Peptidfragmente zur Aminosäuresequenzierung**

### **2.15.1. Proteolytischer Verdau der nPHB-Depolymerase aus *P. lemoignei***

Für die proteolytische Spaltung wurde von 500 µg PhaZ7 nach Mono-P (s. 2.6.4.) der Protein-assoziierte Pharmalyte<sup>®</sup> polybuffer durch Diafiltration (YM03, Centricon<sup>®</sup>, MILLIPORE GmbH, Schwalbach) gegen 1,25 M (Endkonzentration) NaCl abgetrennt und die Probe durch dreimaliges Waschen mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> entsalzt. Das in der Evaporator-Zentrifuge (Fröbel CON-1000, UniTech Laborgeräte GmbH, Martinsried) getrocknete Protein wurde zur Reduktion in 25 µl Harnstoff (8 M in 0,4 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, AmberliteMB-Ionentaucher ) und 5 µl DTT (45 mM) für 12 h bei 45°C inkubiert. Die anschließende Alkylierung erfolgte mit 5 µl 100 mM Jodacetamid für 15 min bei Raumtemperatur im Dunklen. Zum mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 100 µl aufgefüllten Ansatz wurden 16,6 µg Trypsin (sequencing grade, SIGMA, Deisenhofen; Proteasestammlösung: 1 µg/µl in 0,01 % TFA) zugesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ovalbumin, Lactoglobulin oder BSA sowie Ansätze mit und ohne Protease bzw. mit und ohne PhaZ7 dienten als Qualitätskontrollen. Vor der Auftrennung mit Hilfe der HPLC (Peptide nach Trocknung in der Speedvak-Zentrifuge in 100 µl HPLC Laufpuffer A nach 2.6.10. aufgenommen) wurde die Spaltungseffizienz im 14 % SDS-Gel (2.8.1.) überprüft.

### **2.15.2. Proteolytischer Verdau der PHB Depolymerase aus *R. rubrum***

150 µg über YM10-Membranen entsalztes und lyophilisiertes Enzym nach Mono-S (s. 2.6.2. und 2.6.4., 3.10.2.4) wurde analog 2.15.1. in Gegenwart von Harnstoff und DTT für 12 h denaturiert und 15 min mit mit Jodacetamid behandelt. Anschließend wurde der Ansatz mit 25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 1 mM EDTA auf 115 µl aufgefüllt und mit 16,5 µl Acetonitril versetzt. Der proteolytische Verdau fand nach Zugabe von 50 µl einer 0,05 µg/ml Stammlösung der Endoproteinase Lys-C für 12 h bei 37°C statt. Als Qualitätskontrolle diente Ovalbumin (Sigma, Deisenhofen). Zur Konzentrierung wurden die Proben in der Evaporator-Zentrifuge (Fröbel CON-1000, UniTech Laborgeräte GmbH, Martinsried) getrocknet, in 100 µl Wasser resuspendiert und der Erfolg der Spaltung im 16 % SDS-PAG überprüft (s. 2.8.1.). Die präparative Trennung der erhaltenen Peptide zur Gewinnung von Proben für die Aminosäuresequenzierung (Edman-Abbau, s. 2.6.13.) erfolgte mittels HPLC (s. 2.6.10.).

### **2.15.3. In-Gel Verdau von Proteinen**

Durch Negativfärbung (s. 2.8.5.) detektierte Proteinbanden wurden ausgeschnitten, und die bis zu 125 µg Protein enthaltenden Gelblöckchen im 2 ml Eppendorfgefäß mit Hilfe eines Teflonbeschichteten Pistills mazeriert, um eine größer Oberfläche zu erhalten. Über Nacht gelagerte Proben wurden 30 min in frischem sterilem Wasser inkubiert. Durch zweimaliges Überschichten (je 5 min)

mit 25 mM Tris, 100 mM Glycin, 100 mM DTT (pH 8.0) bei Raumtemperatur wurden die Blöckchen vollständig entfärbt. Die Gelblöckchen wurden abzentrifugiert und die Überstände entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (2 x 500  $\mu\text{l}$ , 15 min). Die Proteine wurden für 30 min bei 60°C mit 350  $\mu\text{l}$  8 M Harnstoff (gereinigt über Amberlite-Ionentauscher) in 0,4 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und 70  $\mu\text{l}$  45 mM DTT denaturiert und reduziert. Die folgende Alkylierung in 70  $\mu\text{l}$  Jodacetamid (100 mM) erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lösung gegen 50 % (v/v) Acetonitril in 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ausgetauscht (2 x 20 min). Die Gelblöckchen wurden in 150  $\mu\text{l}$  Acetonitril geschrumpft und im Vakuum getrocknet, um das spätere Eindringen der Proteaselösung in die Gelmatrix zu erleichtern. Die trockenen Gelstücke wurden in 50  $\mu\text{l}$  der Verdaulösung (25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 12,5  $\mu\text{g}$  Trypsin) wieder gequollen. Das Verhältnis Protease zu Protein lag bei 1:10 (w/w). Nach 15 min wurde der Ansatz mit 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  auf 300  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, so daß die Gelstücke vollständig bedeckt waren. Der Verdau erfolgte für 12 h bei 37°C. Um die entstandenen Peptide aus der Gelmatrix herauszulösen, wurde der Ansatz bis zu einer Endkonzentration von 60 % mit Acetonitril und 0,1 % TFA aufgefüllt und im Ultraschallbad 2 x 10 min beschallt. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, im Vakuum auf 5  $\mu\text{l}$  eingengt und für die Peptidtrennung mittels Reverse-Phase-HPLC in 95  $\mu\text{l}$  0,1 % (v/v) TFA in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  aufgenommen.

#### **2.15.4. Chemische Spaltung von Proteinen durch Bromcyan (TARR, 1986, modifiziert)**

Bromcyan (BrCN) spaltet Polypeptidketten spezifisch C'-terminal nach Methioninresten. Aus Methionin entsteht unter sauren Bedingungen über die Zwischenstufe des Homoserinlactons Homoserin. Da interne Methioninreste statistisch relativ selten in Proteinen vorkommen, können größere Peptidfragmente für die Sequenzanalyse (Edman-Abbau, s. 2.6.13.) gewonnen werden, welche zudem nicht wie in der unter 2.15.1./2.15.2. beschriebenen proteolytischen Methode durch Proteasefragmente verunreinigt sind.

Eine Menge von 1 mg PhaZ7 wurde in einem abschließenden Reinigungsschritt im 12 % SDS-PAG (s. 2.8.1.) aus dem Gel elektroeluiert [Banden in 2,5 ml YM10-Centricon® (MILLIPORE GmbH, Schwalbach) analog 2.17.6.2., jedoch unter Verwendung von SDS-Elektrophoresepuffer (2.8.1.)], entsalzt (Diafiltration mit YM10-Membran, s. 2.6.2.) und durch Ultrafiltration konzentriert. Aliquots von 200  $\mu\text{g}$  PhaZ7 wurden nach vollständiger Trocknung (Evaporator-Zentrifuge, Fröbel CON-1000, UniTech Laborgeräte GmbH, Martinsried) in 200  $\mu\text{l}$  (70%, v/v) Formiat mit ca. 10 mg Bromcyan (2 Kristalle) 19,5 h unter  $\text{N}_2$  inkubiert. Nach erfolgter Reaktion wurden die Proben 1:10 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und in tiefgefrorenem Zustand zur Trockne eingengt (Evaporator-Zentrifuge, Fröbel CON-1000, UniTech Laborgeräte GmbH, Martinsried). Die entstandenen Peptidfragmente wurden im 15 % Tricine/SDS-PAG getrennt (s. 2.8.2.) und auf PVDF geblottet (s. 2.9.1.). Nach Coomassiefärbung (2.8.4.) wurden detektierte Banden ausgeschnitten und der Aminosäuresequenzanalyse durch Edman-Abbau unterzogen (s. 2.6.13.).

## 2.16. Elektronenmikroskopie

### 2.16.1. Elektronenmikroskopische Trägernetze

Für die Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate wurden Kupfer- und Nickelgrids (Science Services, München) mit einem Durchmesser von 3,05 mm und einer mesh-Zahl von 300 bzw. 400 verwendet.

### 2.16.2. Herstellung von Kohle-Trägerfolien

Die Herstellung der Kohlefolien erfolgte nach BRADLEY (1954) durch indirekte Widerstandsbedampfung mit konisch zugespitzten Kohlestäben (Spektralkohle höchster Reinheit, Ringsdorf, Bonn-Bad Godesberg) in einer Hochvakuum-Bedampfungsanlage (E 306, Edwards High Vacuum Ltd., Crawley, Sussex, Großbritannien) auf frisch gespaltenen Glimmer (Plano, W. Plannet GmbH, Marburg). Die Stärke der erhaltenen Folien schwankte in Abhängigkeit von der Bedampfungsdauer zwischen 5 und 20 nm.

### 2.16.3. Darstellung der PHA-Einschlußkörper

Für die Darstellung von PHB-Granula innerhalb der Zellen von *Rhodospirillum rubrum* mittels Negativkontrastierung wurde eine Methode entwickelt, in deren Ergebnis es zur partiellen Lyse der Zellwand kommt. Je 5 ml Probe wurden abzentrifugiert (20 min, 4 °C, 4500 Upm, Laborzentrifuge SIGMA 4K10, Schwenkbecherrotor 11140; Fa. SIGMA Laborzentrifugen, Osterode) und das Pellet in 500 µl Aufschlußlösung [50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 150 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0,5 M Saccharose] resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl einer Lysozymstammlösung (0,5 µg/µl) wurde der Ansatz bei Raumtemperatur inkubiert und zu verschiedenen Zeiten Proben zur Kontrastierung entnommen. Kontrastiert wurde sowohl mit Phosphorwolframsäure als auch mit Uranylacetat.

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung von mittels der Dichtegradientenzentrifugation gereinigten nativen PHA-Granula wurden diese in Tris/HCl (50 mM, pH 7,0) auf eine OD<sub>650</sub> von etwa 15 verdünnt. Die Kontrastierung erfolgte mit wiederum mit Phosphorwolframsäure.

### 2.16.4. Negativkontrastierung nach VALENTINE et al. (1968)

Aus einem kohlebedampften Glimmerstück (2.16.2.) wurde ein Quadrat von etwa 3 mm Kantenlänge ausgeschnitten und mit einer Pinzette in einer solchen Orientierung in einen Tropfen der zu untersuchenden Suspension getaucht, daß die Kohlefolie partiell auf der Tropfenoberfläche abflotieren konnte. Die Verweildauer der Folie auf dem Probentropfen wurde in Abhängigkeit von Größe und Konzentration der in der Suspension befindlichen Partikel zwischen 15 und 60 Sekunden variiert. Die Zahl der adsorbierten Partikel stieg mit der Zeit an (MAYER und SPIESS, 1976). Im Folgeschritt wurde auf die gleiche Art in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gewaschen, was insbesondere bei Proben mit höheren Salzkonzentrationen zu besseren Ergebnissen führte. Auf einem Tropfen Kontrastierungslösung wurde der Kohlefilm schließlich vollständig abflottiert, mit einem Trägergrid

(2.16.1.) wieder aufgenommen (stumpfe Gridfläche zur Kohlefolie orientiert) und überschüssige Kontrastierungslösung mittels eines Filterpapiers sofort entfernt.

Als Kontrastierungsmittel dienen wässrige Lösungen von 2-4 %-iger Phosphorwolframsäure, pH 7,0 und 2-4 % (w/v) Uranylacetat (pH 4,5), welche vor Verwendung bei 13000 Rpm (Biofuge A, Haereus) abzentrifugiert wurden, um eventuell ausgefallene Kontrastierungsmittelkristalle zu sedimentieren.

### **2.16.5. Elektronenmikroskopische Abbildung/Größenbestimmungen**

Die elektronenmikroskopische Abbildung der negativkontrastierten Proben erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop des Typs EM 301 (Fa. Philips). Die Beschleunigungsspannung betrug 80 kV. Die exakte Vergrößerung wurde mit einer Kreuzgitterreplika (Balzers AG, Liechtenstein) bestimmt, welche 2160 Gitternetzlinien/mm aufwies. Vor jeder Aufnahme wurde die Vergrößerung kurz auf den Maximalwert und erst im Anschluß daran auf die verwendete „Soll“-Vergrößerung eingestellt, um für jede Aufnahme vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Die „Soll“-Vergrößerungen des Eichgitters und der Proben einer zugehörigen Meßreihe waren identisch. Als Negativmaterial wurden 6,5 x 9 cm Planfilme (Agfa-Scienta 23 D 56, Agfa Gevaert, Leverkusen) verwendet. Die Bestimmung der Größen vom photographischen Abzug mittels Feinmeßschieber erlaubte eine auf 0,1 mm genaue Messung (entspricht bei einer Gesamtvergrößerung von 7480-fach +/-8 nm).

## **2.17. Genetische Methoden**

### **2.17.1. Vorbehandlung von Geräten und Lösungen**

Zur Inaktivierung von Nukleasen und zum Schutz vor Kontaminationen wurden alle hitzestabilen Geräte und Lösungen durch Autoklavieren (20 min, 121°C) sterilisiert. Temperatursensitive Materialien wurden mit 70 % (v/v) Ethanol gespült bzw. nicht autoklavierbare Lösungen sterilfiltriert (0,2 µm Filter).

### **2.17.2. Gesamt-DNA-Isolierung**

#### **2.17.2.1. Isolierung chromosomaler DNA aus Gram-negativen Bakterien nach AUSUBEL et al. (1987)**

Für die Gewinnung chromosomaler DNA aus Gram-negativen Bakterien wurden 100 ml NB- (*R. eutropha*, *Alcaligenes faecalis* T1) oder LB- (*E. coli*) bzw. Stinson-Merrick-MM-Succinat- (*P. lemoignei*) Kultur nach 24 bis 48 h Inkubation bei Erreichen einer  $OD_{600nm} = 3$  abzentrifugiert und in 1 Kulturvolumen TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen (10 min, 6500 x g, 4°C). Das Pellet wurde in 9,5 ml TE resuspendiert und zur Zellyse mit 0,5 ml 10% (w/v) SDS und Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) bei 37°C für 1,5 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,8 ml 5 M NaCl (Endkonzentration 0,7 M) und 1,5 ml CTAB-Lösung (10 % w/v, CTAB in 0,7 M NaCl). Durch 20 min Inkubation bei 65°C wurden Proteine denaturiert und in wiederholter

Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) abgetrennt. Hierfür wurde jeweils 1 Volumen des Lösungsmittelgemisches zugesetzt und die Phasen nach vorsichtiger Durchmischung bei 3500 x g (4°C, 30 min) wieder getrennt. Die wässrige Phase wurde vorsichtig separiert und erneut extrahiert. Erschien die Oberphase klar, wurde abschließend durch Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) verbliebenes Phenol entfernt und die DNA durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol bei -20°C gefällt. Um möglichst hochmolekulare DNA zu erhalten, schloß sich anstelle einer Zentrifugation das Wickeln der DNA auf eine U-förmig gebogene Pasteurpipette an. Die DNA wurde in 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurde die DNA in 2 ml RNaseA (10 µg/ml)-TE-NaCl-Puffer (pH 7,5) aufgenommen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 2.17.2.2. Isolierung chromosomaler DNA aus *R. rubrum* und Gram-positiven Bakterien

100 ml photoheterotroph in PY I angezogene Zellen von *R. rubrum* bzw. LB Kulturen von *Rhodobacter sphaeroides* oder *Bacillus subtilis* wurden bei Erreichen einer  $OD_{680nm} = 2,5$  abzentrifugiert und in 1 Kulturvolumen TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen (6500 x g, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in 10 ml Aufschlußlösung [100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris, 20 % (w/v) Saccharose, 5 mg/ml Lysozym, pH 7,5] bei 37°C bis zu 12 h inkubiert. Durch Zugabe von 1/10 Volumen 10% (w/v) SDS and 5 µl RNaseA (10 mg/ml) bei 37°C lysierten die Zellen nach 15 min bis 3 h, was anhand des Aufklarens der Suspension makroskopisch überprüft wurde. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit Proteinase K (0,1 mg/ml Endkonzentration) und Pronase E (0,5 mg/ml) bei 45°C (max. 2 h). Die Proteasen wurden nach Zugabe von 5 M NaCl (Endkonzentration 0,7 M) und 1,5 ml 10 % (w/v) CTAB in 0,7 M NaCl bei 65°C (20 min) inaktiviert. Der Ansatz wurde mit 1/2 Volumen 0,7 M NaCl aufgefüllt und analog zu 2.17.2.1. mehrfach mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, nachfolgend mit 0,6 Volumen Isopropanol gefällt und dreimal in 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die gereinigte chromosomale DNA wurde durch Erwärmen auf 55°C in 2 ml H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.17.3. Plasmid DNA-Isolierung

#### 2.17.3.1. Miniprep für Plasmide aus *E. coli*

Zur Schnellisolierung von Plasmiden aus über Nacht bei 37°C angezogenen LB-Kulturen (mit erforderlichen Antibiotika) von *E. coli* wurde der FlexiPrep™ (Amersham Pharmacia, Freiburg) verwendet. Je 2 ml gut gewachsene Kultur wurden bei 6000 Upm für 30 s in der Biofuge A (Heraeus, Osterode) abzentrifugiert und in 200 µl Lösung I (100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA, 400 µg/ml RNaseI) resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % w/v SDS) zugegeben und durch gleichmäßiges Schwenken gut durchmischt. Nach etwa 60 s Zellyse wurden Proteine und genomische DNA durch Zugabe von 200 µl Lösung III (3 M Kaliumacetat/Essigsäure, pH 4,7) gefällt und nachfolgend bei 13000 Upm (5 min) pelletiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Plasmide in Gegenwart von 450 µl Isopropanol bei -20°C für 10 min gefällt. Danach wurde die DNA an Sephaglas (150 µl, 1 min kräftig

durchmischt) immobilisiert, abzentrifugiert und mit 200 µl des Waschpuffers und anschließend in 400 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die Überstände wurden verworfen, die Eppendorfgefäße verschlossen und nach mehrfachem Perforieren der Gefäßdeckel mit einer 1 mm Kanüle konnten die Pellets innerhalb von 1 bis 3 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet werden.

### **2.17.3.2. Kombinierte FlexiPräp™-Phenol/Chloroform-Isolierung von Plasmid DNA**

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das FlexiPräp™-Protokoll (2.17.3.1.) mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion kombiniert. Der im Anschluß an die Inkubation mit Lösung III nach Abzentrifugieren erhaltene klare Überstand wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; v:v:v) sowie Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; v:v) extrahiert. Die DNA wurde in Gegenwart von 0,7 Volumen Isopropanol bei -20°C gefällt und das nach Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol erhaltene Pellet (5 min 14000 Upm) in 10 bis 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> resuspendiert. Die erzielten Ausbeuten lagen um Faktor fünf über den bei Verwendung von Sephaglas™ erhaltenen DNA-Mengen.

### **2.17.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Bacillus subtilis* mittels alkalischer Lyse**

Auf TBAB- oder LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika bei 30°C angezogene Zellen wurden in 2 ml LB (10 µg/ml Kanamycin; 10 ml Pyrexgläschen) überführt und diese Kulturen bei 37°C und stetiger Durchmischung (150 Upm) für 4 h 45 min (in Ausnahmefällen über Nacht) inkubiert. Die Kulturen wurden bei 4500 Upm und 4°C für 3 min abzentrifugiert (Sigma 4K10 Laborzentrifuge, Schwenkbecherrotor 11140, Sigma Laborzentrifugen, Osterode) und in 1 ml SET-Puffer [20 % (w/v) Saccharose, 50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA] gewaschen. Das weiche Pellet wurde in 80 µl SET-Puffer resuspendiert und mit 40 µl einer Lysozym-Lösung (10 mg/ml) sowie 5 µl RNase (10 mg/ml in 0,1 M Natriumacetat, 0,3 mM Na<sub>2</sub>-EDTA) für 10-15 min inkubiert. Anschließend wurden 200 µl eines alkalischen Lysispuffers [0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS] hinzugefügt und der Ansatz bis zur vollständigen Zellyse (Aufklärung) vorsichtig durchmischt. Die Proben wurden nach Zugabe von 150 µl Kaliumcetat/Essigsäure-Puffer (pH 4,7) 10 min auf Eis gelagert und 5 min bei 14000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und je einmal mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1; v:v:v) und 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; v:v) extrahiert. Die Fällung der Plasmide erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol für 10 min bei -20°C. Das nach 5 min bei 14000 Upm erhaltene Pellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in maximal 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst.

### **2.17.3.4. Boiling Präp zur Schnellpräparation von Plasmiden**

Zur schnellen Präparation von Plasmiden aus in „deep well“-Mikrotiterplatten (NUNK, angezogenen Klonen) wurden die über Nacht gewachsenen 2 ml Kulturen in der Mikrotiterplatte abzentrifugiert (Centrifuge 5810, Eppendorf) die Überstände für Aktivitätstests (2.10.1.1.) abgenommen und die Pellets in 100 µl Lysis-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, 15 % Saccharose, 0,2 mg/ml RNase) und 20 µl Lysozym (10 mg/ml) für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

wurden die Proben 1 min (*E. coli*) bis 5 min (*B. subtilis*) bei 90°C denaturiert und nach Abkühlen auf Eis bei 4500 Upm in der MTP-Zentrifuge denaturierte Proteine und genomische DNA abzentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Mikrotiterplatten überführt und konnten sofort für den Dot-Blot-Nachweis (s. 2.17.12.) eingesetzt werden. War ein höherer Reinheitsgrad erforderlich, wurde die DNA nach Zugabe von 10 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,8 mit 1 Volumen Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und das Pellet in 10 µl sterilem Wasser resuspendiert.

#### **2.17.3.5. Plasmidisolierung mit Hilfe der Säulenchromatographie**

Plasmid DNA für Sequenzierungen, PCR und Restriktionsanalysen konnte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits (Qiagen AG, Hilden) ausgehend von bis zu 100 ml über Nacht angezogenen LB-Flüssigkulturen mit entsprechenden Antibiotika gewonnen werden. Die Reinigung geschnittener, erforderlichenfalls dephosphorylierter Plasmide erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen AG, Hilden). Für die Sequenzierung wurden Plasmide alternativ mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen AG, Hilden) aufgereinigt. Die verwendeten Reinigungsprotokolle entsprachen exakt den jeweiligen Herstellerangaben.

#### **2.17.4. Isolierung von Gesamt-RNA**

Für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus Mikroorganismen wurde der RNeasy™-Kit (Qiagen AG, Hilden) eingesetzt. Die Zellen einer über Nacht gewachsenen 2 ml Kultur wurden bei 4500 Upm (Biofuge A, Heraeus, Osterode) pelletiert und in 100 µl 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA mit 40 µg Lysozym für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Lyse der Zellen wurden 350 µl des mitgelieferten RLT-Lysispuffers (*b*-Mercaptoethanol, Isothiocyanatharnstoff) zugesetzt. Nach Zugabe von 250 µl Ethanol wurde die Probe auf ein RNeasy Zentrifugationssäulchen aufgetragen und bei 10000 Upm abzentrifugiert, das Eluat verworfen und die Säule mit je 1 Volumen Waschpuffer RW1 (zur Verringerung von DNA-Kontaminationen wurde 5 min inkubiert) und Waschpuffer RPE/75 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die Matrix wurde durch Zentrifugation bei 14000 Upm für 3 min getrocknet. Abschließend wurde das Säulchen in ein frisches 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und gebundene RNA mit 2 x 30 µl mit RNase-freiem Wasser bei 10000 Upm (1 min) eluiert. RNase-freies Wasser wurde durch Behandlung mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht, gefolgt von 20 min Autoklavieren (DEPC entfernt) gewonnen.

#### **2.17.5. Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren**

##### **2.17.5.1. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (RENC)**

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA durch RENC wurden in 10 bis 50 µl Gesamtvolumen in dem vom Hersteller (Gibco, Eggenstein; MBI, St Leonroth; Neb, Schwalbach;) empfohlenen Puffersystem bei optimaler Temperatur für 0,5 bis 12 h durchgeführt. Pro Verdau wurden 0,5 bis 5 U RENC/µg DNA eingesetzt (Glycerolkonzentration max. 10 %). Doppelverdau wurden in einem Universalpuffer durchgeführt, in dem die Enzyme 50 bis 100 % Aktivität zeigten. War dies nicht



möglich wurde erst mit dem Enzym im Niedrigsalzpuffer und anschließend mit dem im Hochsalzpuffer verdaut. Bei stark divergierender Pufferbeschaffenheit mußte die DNA zwischen den einzelnen Verdauenschritten durch eine Phenol/Chloroform-Fällung und anschließende Ethanolpräzipitation (2.17.7.1.) oder Diafiltration über YM30-Centricon® (analog der Methode für Proteine unter 2.6.2.) gereinigt werden. Im Falle temperatursensitiver Restriktionsenzyme wurde der Verdau erforderlichenfalls bei 65°C (15 min) abgestoppt.

#### **2.17.5.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Um die Religation von linearisierten Vektoren zu verhindern und die Ausbeute der Ligation (2.17.5.9.) zu erhöhen, wurden die 5'-Phosphatgruppen der endständigen Nukleotide entfernt. RENC verdaute DNA (2.17.5.1.) wurde im vom Hersteller gelieferten Puffersystem mit 1-5 U alkalischer Phosphatase (Boehringer, Mannheim, MBI Fermentas, St. Leonroth) für 30 min bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend bei 65°C inaktiviert. Dephosphorylierte DNA wurde abschließend einer Reinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion und Fällung (2.17.7.1.) oder Agarosegelelektrophorese mit anschließender Isolierung der betreffenden Fragmente nach 2.17.6.2. unterzogen.

#### **2.17.5.3. Herstellung von „blunt end“ DNA-Fragmenten mit *Vent*-Polymerase**

Mit Hilfe von *Vent*-Polymerase (3'-5'Exonukleaseaktivität) konnten „blunt end“ DNA-Fragmente für die Ligation (s. 2.17.5.9.) durch Abbau einzellsträngig überstehender Enden generiert werden. Hierfür wurden 50 bis 200 ng DNA mit dNTP-Mix (10 nmol je Nukleotid) und 2 U *Vent*-Polymerase für 30 min bei 72°C in ThermoPol™ Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) inkubiert.

#### **2.17.5.4. Herstellung von „blunt end“ DNA-Fragmenten mit Klenow-Fragment**

Zum Auffüllen von 5'-überhängenden Enden wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* eingesetzt. 10 µl (max. 0,5 µg) DNA wurden mit 1 µl (100 mM) MgCl<sub>2</sub>, 1 µl dNTPs (je 10 mM), 7 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl (2 U) Klenow-Fragment versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reinigung erfolgte mittels QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen AG, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben.

#### **2.17.5.5. Herstellung von „blunt end“ DNA-Fragmenten mit Mung Bean Nuklease**

Überhängende 3'-Enden wurden mittels 3'-5'Exonukleaseaktivität der Mung Bean Nuklease (NEB, Schwalbach) entfernt. 10 µl (max. 0,5 µg) DNA wurden mit 2 µl Mung Bean Nuklease-Puffer, 7 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl (3 U) Mung Bean Nuklease versetzt und 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reinigung erfolgte QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen AG, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben.

#### **2.17.5.6. Agarosegelelektrophorese**

Zur Analyse und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegelelektrophoresen in Horizontalkammern eigener Bauart durchgeführt. Die Gelbettgrößen variierten von 11 x 7 x 0,3 cm (analytische Minigele) bis 16 x 14,5 x 0,8 cm (präparative Maxigele). In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren lag die Agarosekonzentration zwischen 0,8 bis 2 % (w/v) in TBE-

Puffer. Für analytische Zwecke wurde Agarose Ultra Pure (Gibco BRL, Eggenstein) für präparative Gele ausschließlich Agarose NA (Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg) verwendet. Für eine Auftrennung von DNA-Fragmenten < 200 bp wurde 1,5 % (w/v) hochvernetzende NuSiev Agarose eingesetzt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst (Im Falle der Trennung von RNA wurden alle Lösungen 20 min autoklaviert.) und nach Abkühlen auf 55°C in die Gelkammer gegossen. Zur Formung der Geltaschen wurden geeignete Käbme (Dicke 1 bis 3 mm) eingesetzt. Die Proben wurden zur Beschwerung und zur Markierung der Lauffront mit 0,2 Volumen Stop-Mix versetzt und nach dem Auftrag für 10 min bei 40 V in die Gelmatrix die anschließende Trennung erfolgte im Minigel bei 80 bis 120 V (30-90 min) und bei 50 V (bis 16 h) im Maxigel. Anschließend wurden die Nukleinsäuren im Gel in einer 10 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung 2 min (Minigele) bis 10 min (Maxigele) gefärbt und das Gel anschließend in Wasser kurz entfärbt. Die gefärbten Banden wurden auf einem UV-Transilluminator (ULTRA LUM, Ultra Lum Inc., USA) sichtbar und konnten mit Hilfe der Videoeinheit als \*.TIF File dokumentiert werden.

TBE-Puffer:

Tris/HCl, pH 8,5	50 mM
Borsäure	50 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	2,5 mM

Stop-Mix (Sambrook et al., 1989):

Harnstoff	5 M
Na <sub>2</sub> -EDTA	1 mM
Saccharose	50 % (w/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
pH	7,0

### 2.17.5.7. Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel extrahiert (s. 2.17.6.). Alternativ wurden die PCR-Fragmente von mehr als 350 bp mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen AG, Hilden) gereinigt. Der Kit beruht auf dem Prinzip der Adsorption von DNA an "Silica-Membranen". Die Reinigung wurde nach Firmenprotokoll durchgeführt. Modifiziert diente der Kit zur raschen Gewinnung klonierbarer DNA nach Doppel-RENC-Verdau (2.17.5.1.). DNA <100 Bp wurden nach Bindung der DNA an die Säulchenmatrix durch Spülen mit 750 µl 35 % Guanidinhydrochloridlösung eluiert. Im Anschluß an einen Waschschrift folgte die Elution der größeren Fragmente nach Herstellerangaben.

### 2.17.5.8. Herstellung von T-Vektoren nach MARCHUK et al. (1991), modifiziert

Die Verwendung eines T-Vektors mit beidseitigem 3'-Thymidin Überhang ermöglichte die „sticky end“-Klonierung von mittels *Taq* DNA-Polymerase hergestellten PCR-Fragmenten. Der Reaktionsansatz enthielt folgende Komponenten:

Plasmid-DNA (linear, blunt end)	50-200 ng
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,2 µl
10x <i>Taq</i> DNA-Polymerase-Puffer	4,0 µl
dTTP (100 mM)	0,8 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (0,2 U/µl)	2,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 40 µl

Die Vektor-DNA wurde nach 2,5 h bei 72°C durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt (s. 2.17.7.1.) und in 20 µl Wasser resuspendiert zur Ligation eingesetzt (2.17.5.9.).

### 2.17.5.9. Standardligation von DNA Fragmenten

Die optimale Ligationskonzentration der DNA war von der Länge der zu ligierenden Fragmente abhängig und konnte nach DUGAICZYK et al. (1975) über  $j \text{ [ng/}\mu\text{l]} = 511000 \times M_r^{-0,5}$  abgeschätzt werden. Ausgehend von 25 bis 150 ng dephosphoryliertem „sticky-“ oder „blunt end“ geschnittenem Vektor wurde mit 2 bis 4 fachem molarem Überschuß an Insert-DNA in Gegenwart von 1:10 (v/v) PEG4000 und 3,5 U T4-DNA-Ligase für 2,5 h (21°C) oder über Nacht (16°C) ligiert. Für die Transformation wurde der Ligationsansatz nach 2.17.8.1. aufbereitet.

### 2.17.5.10. Restriktionsligation von DNA Fragmenten

Um die Ligationseffizienz von mit *Pfx* Polymerase amplifizierten oder „blunt end“ präparierten PCR-Fragmenten mit *EcoRV* geschnittenen Vektoren zu erhöhen wurde alternativ zur Ligation mit dephosphorylierten linearisierten Vektoren eine Ligation in Gegenwart von Restriktionsendonuklease durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

Vektor-DNA ( <i>EcoRV</i> verdaut)	50	ng
„Blunt end“ Insert-DNA	150-200	ng
10x Ligationspuffer	1,2	µl
ATP (10 mM)	1,2	µl
10x <i>EcoRV</i> -Reaktionspuffer	1,2	µl
<i>EcoRV</i>	6	U
T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leonrot)	2	U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 24,5	µl

Die Ansätze wurden 2,5 h bei 21°C inkubiert und anschließend nach 2.17.8.1. für die Transformation gereinigt.

### 2.17.6. Präparation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Trennung von DNA Fragmenten nach Restriktionsverdau wurden Agarosegele eingesetzt (2.17.5.6.). Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid konnte die DNA bei 254 nm detektiert und der gewünschte Gelbereich ausgeschnitten werden. In kritischen Fällen (z.B. Gewinnung von Fragmenten zur Transformation) wurden zur Vermeidung von DNA Schäden nur Randstreifen des betroffenen Geles gefärbt. Die DNA wurde anschließend über verschiedene Methoden von der Agarose abgetrennt.

#### 2.17.6.1. Adsorption von DNA an Glasmilch

Grundlage dieser Methode ist das Schmelzen der Agarosematrix und die Bindung der DNA an Glasoberflächen in Gegenwart von NaJ. Durch Wasser oder einen Puffer niedriger Ionenstärke kann die DNA wieder mobilisiert werden. Für dieses Verfahren standen der Quiaex<sup>®</sup> II Gel Extraction Kit (Qiagen, Düsseldorf) und der EASY PURE<sup>®</sup> DNA Purification Kit (Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf) zur Verfügung. Es wurde nach den von den Herstellern angegebenen Protokollen gearbeitet. Die Ausbeute an DNA lag jedoch häufig unter den mit der Elektroelution erzielten Ergebnissen.

#### 2.17.6.2. Elektroelution von DNA aus Agarosegelen

Die interessierenden Gelstückchen wurden in eine sterile, an der Verjüngung um 1 mm verkürzte 1 ml Plastik-Pipettenspitze überführt. Um das Gelstück in der Spitze zu fixieren, wurde es luftblasenfrei in 1-2 ml 1 % Agarose eingegossen. In Abhängigkeit von der Größe der zu isolierenden Fragmente wurde die Spitze dann in ein mit TBE-Laufpuffer gefülltes 2,5 ml Centricon<sup>®</sup> Diafiltrationsröhrchen (MILLIPORE GmbH, Schwalbach) eingesetzt, dessen regenerierte Zellulosemembran zuvor mit TBE gespült worden war, um zur Konservierung eingesetztes Glycerol zu entfernen. Für Fragmente von 100-350 Basenpaare (bp) fanden YM3, bis 750 bp YM10 und >750 bp YM 30 Membranen Verwendung. Das Diafiltrationsröhrchen wurde nun in die Kathodenkammer der

Elektroelutionsapparatur eingesetzt und die Pufferreservoirs mit TBE-Laufpuffer befüllt. Die Elution erfolgte mit 400 V für 10 bis 30 min bei 4°C.

### **2.17.7. Konzentrierung von DNA**

Für die Konzentrierung von DNA wurden je nach Aufgabenstellung verschiedene Methoden angewendet.

#### **2.17.7.1. Konzentrierung von Nukleinsäuren durch Fällung**

Die DNA-Proben wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) versetzt, durchmischt. und bei 8000 Upm (3 min) zentrifugiert (Biofuge A, Heraeus, Osterode). Vorsichtig wurde die untere phenolische Phase abgenommen und der Ansatz mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt, um verbliebenes Phenol zu entfernen. Nach weiterer Zentrifugation wurde nun die obere wässrige Phase abgenommen, ohne Interphase zu überschleppen. In Gegenwart von 75 % unvergälltem Ethanol (-20°C/, 10 min) fiel die DNA aus und wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 12000 Upm (5 min) pelletiert. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation (10000 Upm, 2 min) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einer Evaporator-Zentrifuge (Fröbel CON-1000, UniTech Laborgeräte GmbH, Martinsried) 30 bis 60 s getrocknet.

#### **2.17.7.2. Dialyse und Konzentrierung von Nukleinsäuren mittels Centricon® Konzentratoren**

Um die nach der Gelextraktion durch Elektroelution (2.17.6.2.) erhaltene DNA für die weitere Verarbeitung vorzubereiten wurde eine Diafiltration gegen  $H_2O_{\text{bidest}}$  und Konzentrierung durchgeführt. Für Fragmente von 100-350 Basenpaare fanden YM3, bis 750 bp YM10 und > 750 bp YM 30 Centricon® Konzentratoren (MILLIPORE GmbH, Schwalbach) Verwendung. Die Ansätze wurden in einer SIGMA-Laborzentrifuge (Haereus, Osterode) bei 5000 x g auf 50 µl eingengt und bis zu 5 mal mit 500 µl  $H_2O_{\text{bidest}}$  gewaschen. Im letzten Schritt wurde bis auf 25 µl eingengt, die Membranen anschließend in umgekehrter Orientierung mit bis zu 200 µl  $H_2O_{\text{bidest}}$  gespült und das Retentat in sterilen Eppendorfreaktionsgefäßen aufgefangen. Die entsalzte DNA konnte nun im Vakuum (Fröbel CON-1000 Evaporator-Zentrifuge, UniTech Laborgeräte GmbH, Martinsried) auf jedes gewünschte Volumen konzentriert werden.

### **2.17.8. Transformation**

#### **2.17.8.1. Aufbereitung von Ligationsansätzen für die Transformation**

Für eine hohe Transformationseffizienz (insbesondere bei der Elektrotransformation, 2.17.8.5.) war eine Reinigung des Ligates im Anschluß an die Ligation notwendig. Der Ligationsansatz wurde nach Inaktivierung bei 65°C auf Raumtemperatur abgekühlt und nach 2.17.7.1. gefällt. Das trockene Ligat wurde in sterilem  $H_2O_{\text{bidest}}$  (2 ng DNA/µl) gelöst und zur Transformation eingesetzt.

### **2.17.8.2. Gewinnung kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$ für die Elektroporation (DOWER et al. 1988), modifiziert**

6 x 500 ml „low salt“-LB-Medium (2.2.2.) in 2 l Erlenmeyerkolben wurden mit 5 ml Übernachtskultur von *E. coli* DH5 $\alpha$  angeimpft (Start OD<sub>600nm</sub> = 0,1) und unter Schütteln (120 Upm) bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>600nm</sub> von 0,8 wurde die Kultur 10 min in Eiswasser abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (6 min, 3700xg, Rotor JA10, Beckmann Zentrifuge). Das Zellpellet wurde in eiskaltem sterilem Wasser (pro Kultur 500 ml) resuspendiert und analog zum ersten Schritt zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> Die erhaltenen Zellpellets wurden in je 10 ml eiskaltem 10 %-igen Glycerol resuspendiert. Suspensionen jeweils dreier Kulturen wurden vereinigt und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 Volumen 10 %-igem Glycerol resuspendiert (etwa 10<sup>10</sup> Zellen/ml). Nach Aliquotieren (110  $\mu$ l Portionen) und Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff konnten die elektrokompenten Zellen bis zu 12 Monaten gelagert werden.

### **2.17.8.3. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen nach INOUE et al. (1990), modifiziert**

Zur Gewinnung kompetenter Zellen wurden 300 ml SOB-Medium im 3 L Schikanekolben [2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,0] mit einer über Nacht kultivierten LB-Kultur von *E. coli* bei einer Start OD<sub>600nm</sub> von 0,15 angeimpft und bei Raumtemperatur in einem Wasserschüttelbad (Modell G76, Fa. New Brunswick Scientific) unter heftiger Durchmischung inkubiert (230 pm). Bei Erreichen einer optischen Dichte (OD<sub>600nm</sub>) von 0,6 wurde das Kulturgefäß für 10 min auf Eis gekühlt und die Zellen anschließend geerntet (2500 x g, 4°C, 10 min). Das Pellet wurde in 80 ml kaltem Puffer [10 mM Hepes, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, pH (KOH) 6,7; 55 mM MnCl<sub>2</sub>] resuspendiert und nach weiteren 10 min auf Eis erneut abzentrifugiert. Nach Aufnahme in 20 ml frischem Transformationspuffer wurden 1,5 ml DMSO (Endkonzentration 7 %, v/v) zugemischt. Die Zellsuspension wurde nach 10 min auf Eis in Eppendorfgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Kompetente Zellen konnten bei -70°C über mehrere Monate gelagert werden.

### **2.17.8.4. Transformation von *E. coli* Stämmen nach INOUE et al. (1990), modifiziert**

200  $\mu$ l kompetente Zellen (s. 2.17.8.3.) wurden auf Eis aufgetaut, mit 100 ng gereinigter Plasmid DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es schloß sich eine Hitzebehandlung für 90 s bei 42°C an. Nach Zugabe von 800  $\mu$ l LB wurden die Transformationsansätze 30 min bei 140 Upm und 37°C geschüttelt. Abschließend wurden je 100-200  $\mu$ l auf entsprechenden Selektionsagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

### **2.17.8.5. Elektrotransformation von *E. coli* nach INOUE et al. (1990), modifiziert**

50 bis 200 ng Plasmid-DNA des gereinigten Ligationsansatzes (2.17.8.1.) wurden mit 110  $\mu$ l der elektrokompenten Zellen (2.17.8.3.) gemischt, luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette pipettiert (2 mm Spaltbreite, BioRad, Göttingen) und 2 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde bei 25  $\mu$ F und 200 Ohm für 4,5-5 ms einem Spannungspuls von 2,5 kV ausgesetzt (Gene Pulser®II,

BioRad, Göttingen) und anschließend mit LB auf 1 ml aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden je 100-200 µl auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

#### **2.17.8.6. Transformation von *B. subtilis***

Zur Gewinnung kompetenter Zellen wurden 2 ml SP1-Medium mit maximal 12 h bei 30°C auf LB oder TBAB-Agarplatten inkubierten *B. subtilis*WB800 beimpft (Start  $OD_{600\text{ nm}} \approx 0,1$ ) und 3,5 h bei 37°C unter stetiger Durchmischung (150 Upm) kultiviert. Anschließend wurden 4,5 ml auf 37°C vorgewärmtes SP2-Kompetenzmedium mit 0,5 ml der SP1-Kultur beimpft und wiederum 90 min inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Dinatrium-EGTA (pH 7,0) und weiteren 10 min Inkubation wurden die kompetenten Zellen zu je 1 ml in sterile 1,5 ml-Eppendorfreagiergefäße aliquotiert mit bis 100 µl der 1:10 in  $H_2O_{\text{bidest.}}$  verdünnten Ligationsansätze (2.17.5.9.) versetzt. [Zur Gewinnung elektrokompenter Zellen erfolgte nach EGTA-Zusatz die weitere Behandlung analog 2.17.8.2.]. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37°C wurden je 100 µl Ansatz auf TBAB-Agar mit Selektionsantibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für eine längerfristige Konservierung kompetenter Zellen wurden die SP2-Kulturen nach  $Na_2$ -EGTA-Behandlung bei Raumtemperatur abzentrifugiert (3000 Upm, BiofugeA, Haereus), in  $10^{-1}$  Volumen frischen SP2-Mediums mit 20 % (v/v) Glycerol aufgenommen und nach Einfrieren mittels Flüssigstickstoff bei -70°C gelagert. Unmittelbar vor einem Transformationsexperiment wurden so konservierte Zellen bei 37°C aufgetaut, mit 2,4 ml frischem SP2-Medium versetzt und analog der vorangegangenen Beschreibung transformiert. Die Elektrotransformation erfolgte entsprechend dem für *E. coli* beschriebenen Protokoll (2.17.8.5.), jedoch wahlweise bei 200 bzw. 400 Ohm.

#### **2.17.9. Markierung von DNA zur Herstellung von Sonden**

Die Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden erfolgte durch den Einbau von DIG-Oxygenin-11-dUTP mit Hilfe des Klenow-Fragmentes. Das Prinzip der Sondensynthese beruht auf dem Einsatz von Hexanukleotiden statistischer Basensequenz als „Random Primer“ für die Neusynthese markierter DNA-Stränge entlang eines DNA-Templates. Die Ausgangs-DNA (PCR Produkte oder DNA-Fragmente nach Restriktionsverdau) wurde nach 2.17.5.7. gereinigt. 50 bis 500 ng DNA in maximal 15 µl wurden durch Erwärmen auf 99°C für 10 min vollständig denaturiert und unmittelbar auf Eis/NaCl abgekühlt. Die Markierungsreaktion erfolgte mit Hilfe der Komponenten des DIG DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer, Mannheim) in folgendem Ansatz:

DNA (50-500 ng)	x $\mu$ l
Hexanukleotid-Mix (10 x)	2 $\mu$ l
dNTP-DIG-Labeling-Mix (10 x)	2 $\mu$ l
Klenow-Fragment (2,5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O bidest.	ad 20 $\mu$ l

Die Ansätze wurden 1-12 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 2  $\mu$ l 200 mM EDTA abgestoppt. Durch Zugabe von 80  $\mu$ l Ethanol (20 min, -20°C) und 10 min Zentrifugation bei 13000 Upm der Biofuge A (Haereus) wurde die DNA gefällt, in 70% (v/v) Ethanol (4°C) gewaschen und in 50  $\mu$ l Wasser gelöst. Die erhaltene makierte Sonden DNA konnte bei -20°C mehrere Monate verlustfrei aufbewahrt werden.

#### 2.17.10. Southern-Transfer von DNA auf Nylonmembranen

Restriktionsverdauete DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese (s. 2.17.5.6.) aufgetrennt und nach Färben mit Ethidiumbromid und Dokumentation der Ergebnisse mit Hilfe einer Vakuumblot-Apparatur (Vacu Gene XL, Pharmacia, Freiburg) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B+, Pall Filtron, Dreieichen) übertragen. Die mit in 20 x SSC-Lösung (3 M NaCl, 0,3 M Na<sub>3</sub>-Citrat, pH 7,0) äquilibrierte Membran wurde auf die glatte Seite der Trägerplatte aufgebracht und frei liegende Flächen mit einer Kunststoffmaske abgedeckt, welche ein der Gelgröße entsprechend geschnittenes Fenster enthielt. Das Agarosegel wurde luftblasenfrei auf die frei Nylonmembranfläche aufgebracht und ein Vakuum von 700 mbar angelegt. Das Gel wurde sukzessive mit Depurinierungs- (0,25 M HCl, 10-20 min, Gelbfärbung der Bromphenolblau-Lauffront), Denaturierungs- (1,25 M NaCl, 0,5 M NaOH, 10-20 min, Farbumschlag zurück nach blau) und Neutralisationslösung (1 M Tris/HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,9) überschichtet. Abschließend erfolgte der DNA Transfer mit 20 x SSC für 60 min. Die Zeitdauer der Einzelschritte war von der Dicke der verwendeten Gele abhängig. Nach Entfernung des Geles und Absaugen des überschüssigen Puffers wurde die DNA durch Bestrahlung der Membran mit UV-Licht (254 nm, 3 min) fixiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

#### 2.17.11. „Dot-Blot“

Zur schnelleren Kontrolle von PCR Produkten und rekombinanten Plasmiden wurden alternativ „Dot-Blots“ durchgeführt. Die in 1 Volumen 2 x SSC gelöste DNA (10 bis 100 ng) wurde in diesem Falle direkt auf die Membran aufgebracht und wie beschrieben im UV-Licht fixiert. Nach einem Waschschrift in 5 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS für 5 min konnte die Membran zur Hybridisierung nach 2.17.13. verwendet werden.

#### 2.17.12. Transfer von DNA aus Bakterienkulturen auf Nylon-Membranen (Kolonie-Blot)

Für das Screening nach positiven Klonen in partiellen Genbanken wurde eine modifizierte Methode von GRUNSTEIN und WALLIS (1979) angewendet. Lagen die nach der Transformation erhaltenen



Kolonien sehr dicht, wurden die Transkonjuganten zu je 240 Stück auf eine neue Selektionsplatte (LB oder TBAB mit entsprechenden Antibiotika) überimpft. Gut vereinzelt Kolonien wurden mit Hilfe eines Samttuches und eines passenden massiven Stempelzylinders von der „Master-Platte“ auf neue Agarplatten als identische Replika übertragen. Die Klone wurden über Nacht bei entsprechender Temperatur kultiviert und am nächsten Tag für 30 min auf 4°C abgekühlt. Für den Transfer wurden 2 Papierfiltertücher und eine passende positiv geladene Nylonmembran (Biodyne B+, Pall Filtron, Dreieichen) auf den jetzt aufrecht stehenden Stempel aufgelegt. Die Agarplatte wurde anschließend ebenfalls in umgekehrter Orientierung mit vorsichtigem Druck gleichmäßig auf die Membran gepreßt. Nach 1 min wurde die Nylon-Membran mit den daran haftenden Kolonien abgenommen und mit der Kolonieseite nach oben nacheinander auf die Oberfläche folgender Lösungen aufgelegt: Denaturierungslösung aus 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl (3 min; zum Aufschluß von *B. subtilis* wurden noch 10 mM EDTA zugesetzt); 10 % (w/v) SDS (3 min); Neutralisierungslösung: 0,5 M Tris/HCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl und 2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Na<sub>3</sub>Citrat, pH 7,0). Die DNA wurde analog 2.17.10. durch Bestrahlung mit UV-Licht auf der Membran fixiert und konnte anschließend zur Hybridisierung (s. 2.17.13.) verwendet werden.

### 2.17.13. Hybridisierung von Nukleinsäuren mit markierten DNA-Sonden

Die Hybridisierungen von Southern- und Kolonie-Blots wurden nach einem analogen Protokoll durchgeführt. Einer Inkubation der Blot-Membran in Prähybridisierungslösung (30 min, 63°C) folgte eine Hybridisierung mit ca. 10 pmol markiertem Oligonukleotid (5 µl des Markierungsansatzes nach 2.17.9., vor Zugabe 10 min bei 100°C denaturiert) für 1 bis 12 h bei gewählter Hybridisierungstemperatur im Hybridisierungssofen (Compact line OV4, Biometra, Göttingen). Die Hybridisierungslösung wurde nach Gebrauch bei -20°C gelagert und für maximal drei weitere Hybridisierungen eingesetzt. Anschließend wurden die Membranen 2 x 5 min in Puffer P1 bei Raumtemperatur und 2 x 15 min bei gewählter Hybridisierungstemperatur in P2 gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach der Äquilibration in DIG1-Puffer wurden die Blots 30 min in Blocking-Lösung inkubiert. Die Detektion der Digoxigenin markierten Sonden erfolgte mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörpern (Anti-DIG-FAB-AK, Boehringer, Mannheim) für 30 min. Die Membranen wurden erneut in DIG1 gewaschen (3 x 15 min) und die entsprechenden Banden nach kurzer Äquilibration in Detektionspuffer in Gegenwart von 40 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP, 5 %, (w/v) in N,N-Dimethylformamid) und 50 µl 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT, 75 mg in 1,3 ml 70% (v/v) N,N-Dimethylformamid) angefärbt. Als Positivkontrolle wurde das jeweilige Sonden-Template verwendet. Bei der Verwendung homologer Sonden wurde generell mit Hybridisierungstemperaturen zwischen 60-64°C gearbeitet. Im Falle heterologer Hybridisierungen lag die initiale Hybridisierungstemperatur bei 30°C und wurde in mehreren Waschschritten erhöht, bis ausschließlich spezifische Signale verblieben. Die verwendeten Lösungen sind nachfolgend zusammengefaßt:

Prähybridisierungslösung:

20 x SSC (s. 2.17.10.)	50 ml
n-Methylsarcosin	0,1 % (w/v)
SDS	0,02 % (w/v)
Blocking (Boehringer)	1 % (w/v)
NaCl	0,1 % (w/v)

Hybridisierungslösung:

Prähybridisierungslösung	0,2 ml/cm <sup>2</sup>
DNA-Sonde	4 µl

Waschpuffer P1:

SDS	1 g
2 x SSC	1 l

Waschpuffer P2:

SDS	1 g
0,1 x SSC	1 l

Blocking-Lösung:

DIG1-Puffer	100 ml
Blocking (Boehringer)	1 g

DIG1-Puffer:

Tris	100 mM
NaCl	150 mM
pH (HCl)	7,5

Detektionspuffer:

Tris	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
pH	9,0

**2.17.14. Entfernung gebundener Sondenmoleküle von Southern-Blots („Strippen“)**

Um die an der fixierten Target-DNA gebundene Sonden-DNA wieder zu entfernen und die Blots für weitere Hybridisierungen mit anderen Sonden nutzen zu können, wurde das Farbpräzipitat von der betroffenen Membran durch Waschen in N,N-Dimethylformamid bei 50°C entfernt, 1 min gewässert und anschließend zweimal 10 min in je 50 ml Strippinglösung [0,2 M NaOH, 0,1 % (w/v) SDS] bei 37°C inkubiert. Bei Verwendung von DIG-gelabeltem Molekulargewichtsmarker zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde anstelle der Strippinglösung nur 0,1 % (w/v) SDS bei 95°C eingesetzt, da eine alkalische Behandlung der Blots DIG-gelabelte Sonden und Marker gleichermaßen zerstörte. Abschließend wurde kurz in 2 x SSC äquilibriert, die Membran bis zur weiteren Verwendung feucht eingeschweißt und bei 4°C gelagert.

**2.17.15. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die „Polymerase chain reaction“ (PCR) ermöglichte die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente aus geringen Mengen einer DNA-Matrize (Plasmide oder Genomische DNA) mit Hilfe eines Paares jeweils zur Zielsequenz komplementär/revers komplementärer Oligonukleotid-Primer und einer thermostabilen DNA-Polymerase (SAIKI et al., 1988). Sie diente in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung von PCR-Klonen mit plasmidlokalisierten Strukturgenen, zum Nachweis erfolgreich klonierter DNA-Fragmente.

### 2.17.16. Primer- und Sondendesign

Die eingesetzten Starteroligonukleotide waren 17 bis 33 Basen lang. Zur Gewährleistung einer optimalen Amplifikation wurden jeweils in gleicher Konzentration vorliegende Primer verwendet, deren Schmelzpunkte um weniger als 5°C voneinander abwichen. Der GC-Gehalt lag optimalerweise bei 50 bis 60 % und es erwies sich von Vorteil, wenn Position +1' der Kettenverlängerung ein G oder C darstellte.

Im Falle von aus der Aminosäuresequenz abgeleiteten stark degenerierten Primern wurde die vollständige Degeneration berücksichtigt. Eine Verringerung der Degeneration basierend auf mit Hilfe des Programmes CodonFrequency (GCG-Package) aus in den Datenbanken zugänglichen *R. rubrum*- und *P. lemoignei*-Gensequenzen abgeleiteten Codon-usage Tabellen erwies sich für das Primerdesign nur bedingt als geeignet. Waren sechsfach Degenerationen (Serin, Arginin, Leucin) unumgänglich wurden separate Sets von Primern entworfen, welche in der 2. Position eines Triplets jeweils nur eine der möglichen Basen besaßen. Vom 3'-Ende aus wiesen die Primer stets 2 eindeutige Basen, wenn möglich, gefolgt von maximal zweifach Degenerationen an Position drei auf. Ergab sich für die dann nachfolgenden Wobbleposition sechs eine vierfach Degeneration, war der Einbau von Inosin als universeller Base von Vorteil. Bei einem zweifachen Wobble an Position sechs wurde ein vierfach Wobbles an Position 9 (vom 3'-Ende aus) durch Inosin substituiert.

Zur Kontrolle aber auch zum Entwurf von DNA-Sonden und PCR-Primern fanden die folgenden Programme Verwendung: PC-OLIGO™ 1.0 für MS-DOS™, GeneFisher 1.22 ([http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/gf\\_submit?mode=STARTUP&qid=na&sample=dna](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/cgi-bin/gf_submit?mode=STARTUP&qid=na&sample=dna)), PCR Primer Selection Program (<http://alces.med.umn.edu/websub.html>), PrimerDesign (<http://www.embl-heidelberg.de/~toldo/JaMBW/5/2>) sowie PrimerSelect™ aus dem Lasergene-Paket (DNASTAR, Inc., Madison, USA).

### 2.17.17. Standard PCR

Wenn möglich wurden "hot start"-PCRs mit Taq-DNA Polymerase (MBI Fermentas, St. Leonroth oder Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Zur Gewinnung von PCR-Genkopien für Sequenzierungen und Klonierungen wurde Platinum® Pfx-Polymerase (GibcoBRL® Life Technologies, Eggenstein) eingesetzt. Platinum® Pfx-Polymerase besitzt eine 3'-5'Proofreading Exonukleaseaktivität (Fehlerrate:  $1,6 \times 10^{-6}$ /Base) und zeigt keine Extendase-Aktivität. Es entstehen also keine 3'-Überhänge und das PCR-Produkt ist sofort „blunt end“ klonierbar (TAKAGI et al., 1997; CLINE et al., 1996). Das Enzym liegt in einer mittels Antikörper stabilisierten inaktiven Form vor, welche erst nach Erwärmen auf 94°C und Denaturierung der Antikörper in die aktive Form übergeht und somit eine „hot start“-PCR ermöglicht, bei der eine unspezifische Amplifikation vor Erreichen der Denaturierungstemperatur vermieden wird. Standardreaktionen wurden in einem Volumen von 25 µl durchgeführt und enthielten folgende Komponenten:

	<i>Taq</i> -DNA Polymerase	<i>Pfx</i> -DNA Polymerase
Genomische Template DNA	1 bis 10 ng	1 bis 10 ng
Primer 1	5 bis 25 pmol	7,5 pmol
Primer 2	5 bis 25 pmol	7,5 pmol
Reaktiospuffer 10x	2,5 µl	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> /MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	0,75 µl	0,5 µl
dNTP (je 2,5 mM)	2 µl	3 µl
DNA Polymerase	0,5 U	1,25 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 25 µl	ad 25 µl

Die Template-DNA wurde für 2,5 min bei 94°C denaturiert. Das Amplifikationsprogramm bestand aus folgenden Schritten:

	<i>Taq</i> -DNA Polymerase		<i>Pfx</i> -DNA Polymerase	
Denaturierung	30 s	94°C	30 s	94°C
Annealing der Primer	30 s	51-70°C	30 s	51-70°C
Polymerisation	2 min	72°C	4 min	68°C

Nach Durchlaufen von 25 bis 30 Zyklen schloß sich eine 4 minütige Auffüllreaktion bei der jeweiligen Polymerisationstemperatur an.

Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der verwendeten Primer bis 25 Basen Länge wurde nach der Formel:

$$T_m = [4(G + C) + 2(A + T)] * [^{\circ}\text{C}]; \text{ (SUGGS et al., 1981)}$$

berechnet. Waren die Primer größer als 25 Basen, wurden die Temperaturen anhand der folgenden Formeln bestimmt:

$$T_m = \left[ 69,3 + 0,41 * (G + C)\% - \frac{650}{\text{bp des Primers}} \right] * [^{\circ}\text{C}]; \text{ (CHESTER und MARSHAK, 1993)}$$

Bei Bestimmung der Schmelztemperaturen über die Algorithmen der Primerdesignprogramme (s. 2.17.16.) oder nach der von SAMBROOK et al. (1989) vorgegebenen Formel:

$$T_m = \left[ 81,5 + 16,6 \lg (J^+) + 0,41 * (G + C)\% - \frac{600}{\text{bp des Primers}} \right] - 0,63 (\% \text{FA})$$

( $J^+$  = Konzentration monovalenter Kationen; % FA = prozentualer Formamidgehalt)

war es im Einzelfalle möglich, verschiedene Ionenkonzentrationen zu berücksichtigen. Die Annealingtemperatur  $T_a$  wurde aus den jeweiligen Schmelzpunkten der beiden Primer ( $T_{m1}$ ;  $T_{m2}$ ) berechnet:

$$T_a = \left[ \frac{T_{m1} + T_{m2}}{2} \right] - 3^{\circ}\text{C}$$

Neben einer Erhöhung der „Annealing“-Temperatur ließ sich das Auftreten unspezifischer Produkte auch durch die Erhöhung der  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration bis 25 mM vermindern. Im Einzelfall wurde bei der Amplifikation GC-reicher Sequenzabschnitte 2-5,5 % (v/v) Glycerol zugesetzt. Ausbeute und Spezifität konnten durch Zugabe von bis 6 % (v/v) DMSO erhöht werden. Die Reaktionen wurden in einem T-Gradient Thermoblock (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Bei Verwendung eines Thermoblock Cyclers (Biometra, Göttingen) ohne beheizbaren Deckel wurden die Proben durch Überschichten mit 100  $\mu\text{l}$  Paraffinöl vor dem Eindampfen geschützt. Die Amplifikate wurden im Agarosegel (2.17.5.6.) auf Größe und Homogenität überprüft.

### 2.17.18. PCR mit degenerierten Oligonukleotidprimern

Für die PCR-Amplifikation mit degenerierten Oligonukleotiden wurden abweichend von den Standard-PCR-Bedingungen zwei weitere Methoden angewand. Die Amplifikation erfolgte mit einem Gemisch aus *Taq*-DNA Polymerase (MBI Fermentas, St. Leonroth oder Eppendorf, Hamburg) und Platinum<sup>®</sup>*Pfx*-DNA Polymerase (GibcoBRL<sup>®</sup> Life Technologies, Eggenstein). Die Primerkonzentration wurde auf das n-fache ( $n =$  „Wobbleanzahl“), mindestens jedoch auf 100 pmol erhöht. Ein regulärer Ansatz enthielt folgende Komponenten:

Genomische Template DNA	25 bis 250 ng
Primer 1	100 pmol
Primer 2	100 pmol
<i>Pfx</i> -Reaktiospuffer 10x	2,5 µl
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	0,5 µl
dNTP (je 2,5 mM)	3,0 µl
Platinum <sup>®</sup> <i>Pfx</i> -DNA Polymerase (2,5 U/µl)	0,15 µl
<i>Taq</i> -DNA Polymerase (5,0 U/µl)	0,15 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 25 µl

In einem T-Gradient Thermoblock (Biometra, Göttingen) konnten bis zu 8 Primerkombinationen bei 12 verschiedenen „Annealing“-Temperaturen zur empirischen Ermittlung der optimalsten Hybridisierungstemperatur nach folgendem Protokoll getestet werden. Das Template wurde 2 min 30 s bei 95°C denaturiert. Die Anlagerung der Primer erfolgte in einem Gradienten von 20 °C mit der Mitteltemperatur von 61°C für 1 min. Danach wurde für 2 min amplifiziert und 30 s bei 95°C denaturiert. Nach 30 Zyklen wurde die Elongation bei 69°C für 4 min fortgesetzt und die Probe im Anschluß auf 4°C abgekühlt.

Alternativ wurde die „touch down“-PCR angewendet. Hierfür wurden 3,5 U *Taq*-DNA Polymerase pro Reaktion eingesetzt und die Annealing-Temperatur beginnend mit 61°C (Amplifikation stringenter Signale) in jedem Zyklus um 0,5°C bis auf 45°C gesenkt. Es schlossen sich bis zu 15 Zyklen bei 45°C Hybridisierungstemperatur an.

### 2.17.19. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA und die direkte Sequenzierung von PCR Produkten erfolgte mit Hilfe eines Automated Laser Fluorescent (A.L.F.)- und eines ABI PRISM<sup>™</sup> 377-Sequencers. Grundlage der verwendeten Sequenzierverfahren ist die Didesoxynukleotid-Kettenabbruch-Methode nach SANGER et al. (1977). Hierbei findet ausgehend von einem an die als Matritze dienende denaturierte Einzelstrang DNA angelagerten Oligonukleotid eine DNA-Neusynthese mit Hilfe von DNA Polymerase statt. Durch die Zugabe von Didesoxynukleotiden zum Reaktionsansatz kommt es statistisch zur basenspezifischen Termination der Reaktion. Abweichend von der Methode nach SANGER werden die mit dem Fluoreszenzfarbstoff markierten Syntheseprodukte jedoch bereits während der gelelektrophoretischen Auftrennung mit Hilfe des nach Anregung durch einen Laserstrahl emittierten Fluoreszenzsignals detektiert (VOSS et al., 1992).

Neben dem Einsatz Fluoreszein-markierter „universal“- bzw. „reverse“-Primeroligonukleotide aus dem „AutoRead 200 Sequencing Kit“ (Amersham Pharmacia, Freiburg) oder dem „Cycle Reader<sup>™</sup>

Auto DNA Sequencing Kit“ (MBI Fermentas, St. Leonroth), wurden für die Sequenzierung größerer DNA Fragmente durch „Primer hopping“ (STRAUSS et al., 1986) oder eine Sequenzierung von PCR-Produkten, bei Verwendung unmarkierter Oligonukleotide, Fluoreszein-markierte dNTPs eingesetzt. Zur Vermeidung von Kompressionen in GC-reichen Sequenzabschnitten wurde 7-deaza-dGTP ( $c^7$ dGTP) (im Kit vorhanden) verwendet.

Zusätzliche Kontrollsequenzierungen wurden als „Hot-Shot“-Sequenzierung von der Firma SeqLab GmbH (Göttingen) durchgeführt.

### 2.17.19.1. Sequenzierreaktionen

Die für die Sequenzierung am **ABI PRISM™ 377** bestimmten Proben doppelsträngiger DNA (in pBluescriptII- oder pWB 980-Vektoren) wurden nach dem Prinzip des „cycle sequencing“ (BLAKESLEY, 1993) mit dem **ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit** unter Verwendung von **AmpliTaQ® DNA Polymerase, FS** (Perkin Elmer Applied Biosystems) hergestellt. Im Unterschied zur PCR wurde ausgehend von in diesem Falle jeweils nur einem Oligonukleotid-Primer pro Ansatz das Template linear amplifiziert. Der Abbruch der Amplifikation erfolgte durch Einbau des Didesoxynukleotides. Gegenüber der herkömmlichen Sequenzierung mit nur einem Amplifikationszyklus sind geringere Template-DNA-Mengen erforderlich. Eine wesentliche Besonderheit des verwendeten **BigDye™ Terminator Kits** bestand darin, daß alle vier fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide in einem einzigen Ansatz gemischt mit den dNTPs vorlagen. Um eine spätere Unterscheidung der Didesoxynukleotide zu ermöglichen, waren an den Fluoreszein-Donor verschiedene Dichlorrhodamin (dRhodamin)-Fluoreszenz-Akzeptoren mit unterschiedlichen Emissionsspektren gekoppelt so daß die Termination mit A spezifisch zu grünen, C zu roten, G zu blauen und T zu gelben Fluoreszenzsignalen führte. Standard-Sequenzreaktionen mit gereinigter Template-DNA (Phenol/Chloroformextraktion, Ethanolpräzipitation, s. 2.17.7.1.) wurden in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis wie folgt angesetzt:

DNA (Plasmid/PCR-Produkt)	0,5/0,1 µg
Primer (5 pmol/µl)	1,0 µl
DMSO	1,5 µl
Terminator Ready Reaction Mix	4,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 20 µl

Die gut durchmischten und abzentrifugierten Ansätze wurden 4 min bei 94°C denaturiert und anschließend mit 25 Zyklen des folgenden Temperaturprogrammes amplifiziert:

Denaturierung	94°C 30 s
Primer-Annealing/ DNA-Synthese	60°C 4 min 30 s

Für problematische Proben (hoher GC-; GT-Gehalt; repetitive Sequenzmotive) wurden zwei von obiger Vorschrift abweichende Protokolle etabliert.

Handelte es sich bei den Templates um PCR-Produkte, so konnten häufig mit einem materialsparenden „Minimal-Protokoll“ gute Ergebnisse erzielt werden. Der Sequenzieransatz war wie folgt zusammengesetzt:

DNA (PCR-Produkt)	50-100 ng
Primer (3 pmol/μl)	1,0 μl
Tris/HCl (200 mM, pH 9,0), MgCl <sub>2</sub> (5 mM)	7,2 μl
Terminator Ready Reaction Mix	0,8 μl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 20 μl

Die gut durchmischten und abzentrifugierten Ansätze wurden 120 s bei 95°C denaturiert und anschließend mit 99 Zyklen des folgenden Temperaturprogrammes amplifiziert:

Denaturierung	95°C	15 s
Primer-Annealing	53°C	15 s
Synthese	60°C	4 min

Zur Sequenzierung von DNA aus *R. rubrum* erwies sich aufgrund des gehäuften Auftretens GT- und GC-reicher Regionen das nachfolgende Protokoll mit höherer Mg<sup>2+</sup>-, Primer- und Terminator-Mix-Konzentration in Gegenwart von DMSO als geeignet:

DNA (Plasmid-DNA)	0,5 μg
Primer (10 pmol/μl)	1,0 μl
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	1,0 μl
DMSO	1,5 μl
Terminator Ready Reaction Mix	8,0 μl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 22,5 μl

Diese Ansätze wurden 4 min bei 95°C denaturiert und bei verringerter Synthesetemperatur in 30 Zyklen wie folgt amplifiziert:

Denaturierung	95°C	35 s
Primer-Annealing/ DNA-Synthese	55°C	4 min 15 s



Vor der weiteren Verwendung wurden die Proben nach Zugabe von 2 µl 3 M Natriumacetat mit Ethanol (Endkonzentration 60 %) für 10 min bei 4°C gefällt, 15 min bei 14000 Upm (Biofuge A, Heraeus, Osterode) abzentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgenommen. Nach einem Waschschrift mit 250 µl 70 % (v/v) Ethanol erfolgte die Trocknung bei Raumtemperatur. Gefällte DNA konnte bei -20°C bis zur Sequenzierung gelagert werden. Die trockene DNA wurde unmittelbar vor der Sequenzierung in 5 µl eines Gemisches aus deionisiertem Formamid und 25 mM EDTA (pH 8,0, 50 mg/ml Blue Dextran) im Verhältnis 1:5 (v/v) aufgenommen, 2 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und 1 µl pro Sequenzgeltasche geladen. Die anschließenden Gelläufe auf dem ABI PRISM™ 377 erfolgten im Insitut für technische Biochemie der Universität Stuttgart.

Die Sequenzierung von Plasmiden mit dem Cycle Reader™ Auto DNA Sequencing Kit (MBI Fermentas, St. Leonroth) erfolgte mit Hilfe von Cy™ 5'-markierten M13/pUC- oder T3/T7-Sequenzierprimern. 0,5 µg Plasmid-DNA (< 6 kbp) wurden mit 4 µl Sequenzierpuffer, 2 pmol 5'-Cy5™ Primer, 2 U Reader™Taq DNA Polymerase gemischt und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 30 µl aufgefüllt. Je 6 µl dieses Gemisches wurden mit 2 µl des jeweiligen dNTP/ddNTP Terminations-Mix versetzt (Termination Mix A z. B. bestehend aus: dATP, dTTP, dCTP, 7-deaza-dGTP und ddATP) und in einem T-Gradient Thermoblock (Biometra, Göttingen) mit beheizbarer Abdeckung für 2,5 min denaturiert. Die Sequenzierreaktion erfolgte in 25 Zyklen (94°C, 30 s; Annealing-Temperatur, 30 s; Kettenverlängerung bei 72°C, 1 min). Nach Abkühlen auf 4°C wurden alle Ansätze mit 4 µl Formamid/EDTA/Fuchsin-Stopplösung versetzt. Vor dem Probenauftrag wurde 3 min bei 94°C denaturiert und die Proben sofort auf Eis abgekühlt. Pro Spur wurden 6 µl des Reaktionsgemisches geladen.

Für die „one cycle“ Sequenzierung von DNA bei Verwendung nicht gelabelter Primer wurde der AutoRead™200 Sequencing Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) mit folgendem Alternativprotokoll eingesetzt. 2-5 µg Plasmid-DNA in 32 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> wurden mit 8 µl 2 M NaOH für 10 min bei 23°C alkalisch denaturiert. Zur Fällung wurden 12 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 268 µl 90 % (v/v) eiskaltes Ethanol zugesetzt und 30 min bei -70°C inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 Upm (Biofuge A) und Waschen in 70 % (v/v) Ethanol wurde das Pellet im Vakuum getrocknet (Fröbel CON-1000 Evaporator-Zentrifuge, UniTech Laborgeräte GmbH, Martinsried) und in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> mit 2 µl Annealing-Puffer aufgenommen. Es wurden 2 µl Primer (5-50 pmol/µl) zugegeben und bei 65°C für 3 min und anschließend 5 min bei 37°C die Annealing-Reaktion durchgeführt. Das Markieren der Primer erfolgte durch den Einbau von Cy5-13-dATP mit Hilfe von 1 µl Cy5™-dATP Labelling Mix, welcher neben dTTP, dCTP, dGTP (je 0,1 µM) 10 µM des Cy5-13-dATP enthielt. Den Ansätzen wurden neben dem Labelling-Mix je 2 µl Annealing Puffer und 4 bis 8 U T7 DNA Polymerase zugesetzt und weitere 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 3 µl DMSO, 1 µl Extension-Puffer zugegeben, je 4,5 µl der Mischung zu je 2,5 µl des dNTP/ddNTP Terminations Mixes pipettiert und 10 min bei 37°C elongiert. Die Reaktion wurde mit 5 µl Stop-Mix beendet. Unmittelbar vor dem Probenauftrag auf das Sequenziergel wurde 3 min bei 85°C denaturiert.

Generell erwies es sich für alle Sequenzierungen als vorteilhaft, wenn zu sequenzierende Plasmid-DNA linearisiert vorlag. Die angegebenen Annealingtemperaturen variierten in Abhängigkeit vom verwendeten Primer und betrug maximal 68°C.

### **2.17.19.2. Sequenziergele (A.L.F.-Sequencer)**

Die in der Sequenzreaktion (2.17.19.1.) für den A.L.F. DNA Sequencer gewonnenen Proben wurden in einem 6 %-igen, 0,5 mm starken Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei den für die Elektrophorese verwendeten nicht fluoreszierenden Glasplatten handelte es sich um eine 35 x 30 cm große Ohrenplatte und die rückwärtige doppelwandige Temperierplatte, mit deren Hilfe während des Laufes eine konstante Temperatur von 48°C gewährleistet wurde. Beide Platten wurden mit Wasse und Ethanol gereinigt. Der obere Bereich der Ohrenplatte wurde mit 250 µl Bindesilanlösung [50 µl Eisessig versetzt mit 200 µl einer Bindesilanstammlösung aus 96 % (v/v) Ethanol und 150 µl Bindesilan] beschichtet und erneut mit Wasser und Ethanol poliert. Beide Platten wurden nun unter Zuhilfenahme der entsprechenden Abstandshalter aufeinandergelegt und justiert. Für die Herstellung der Gellösung wurde das SequaGel XR Fertig-Acrylamidsystem (Biozym, Hessisch Oldendorf) verwendet. Puffer- und Monomerlösung wurden im Verhältnis 1:4 (12 ml : 48 ml) gemischt und zur Initiation der Polymerisation 480 µl einer 10 % (w/v) APS-Lösung zugesetzt. Mit Hilfe einer Spritze wurde die Lösung zwischen die waagrecht liegenden Glasplatten gefüllt. Nach Einsetzen des Kammes zur Taschenformung schloß sich die Polymerisation im UV-Licht an. Danach wurde das Gel in die Elektrophorese-Einheit eingebaut, beide Puffer-Reservoirs mit je 1000 ml 1 x TBE-Puffer (s. 2.17.5.6.) gefüllt und der Kamm entfernt. Nach einem Vorlauf (1 h) wurden die Geltaschen gespült und 1 µl der denaturierten Probe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 1500 V und 35 W für 700 min (400 mW).

### **2.17.19.3. Analyse von Sequenzdaten**

Für das Prozessieren von Rohdaten nach einem Sequenzlauf wurden die Programme ALFwin™ 1.0 (Pharmacia, Freiburg) und Sequencing Analysis 3.2 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen DNAid, Version 1.8 und DNA-Strider 1.2 (MARCK, 1988) sowie dem Lasergene 4.0-Programmpaket (DNASTAR, Inc., Madison, USA). Mit Hilfe dieser Programme konnten offene Leserahmen (ORF) und Restriktionskarten erstellt sowie Proteinsequenzen abgeleitet und auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden. Sequenzierprojekte wurden mit SeqMan™II verwaltet. Weitergehende Analysen wurden mit dem GCG®-Package 10.1 (CodonFrequency, CodonPreference, TestCode, Term, DEVEREUX et al., 1984, University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, USA), Glimmer (SALZBERG et al., 1998) sowie den im Internet verfügbaren Programmen ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) und Blast 2.2.1 (ALTSCHUL et al., 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) für den Abgleich von Sequenzen durchgeführt. Potentielle Ribosomenbindestellen (SHINE und DALGARNO 1974) wurden durch das Programm RBS-Finder (SUZEK et al., 2001) ermittelt. „Neuronal Network Promoter Predict“

([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) diene unter Verwendung einer Matrix für prokaryotische Mikroorganismen der Identifizierung potentieller Promotorregionen. Die Vorhersage von Polynukleotidsekundärstrukturen erfolgte mittels mfold 3.0 (ZUKER und STIEGLER, 1981). Basierend auf Proteinprimärstrukturen erfolgte die Voraussage von Sekundärstrukturen mit SSCP (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/SSCP/>), PREDATOR [FRISHMAN und ARGOS, (1997), [http://www.embl-heidelberg.de/cgi/predator\\_serv.pl](http://www.embl-heidelberg.de/cgi/predator_serv.pl)] sowie PredictProtein ([http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/submit\\_def.html](http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/submit_def.html)). Über SwissModel-3D-PSSM Web Server (V. 2.6.0; KELLEY et al., 2000) konnten ausgehend von 1D Sequenzprofilen und 3D-Proteinkristallstrukturen (Faltungsdatenbank SCOP 1.53) Vorhersagen zur Sekundärstruktur gewonnen werden (<http://www.bmm.icnet.uk/servers/3dpssm/>). Das Programm ermöglichte ein multiples Alignment unter Berücksichtigung von Strukturdaten sowie eine Zuordnung zu entsprechenden Proteinklassen. Als Datenbanksubmission- und Formatierungstool diene Sequin in der Version 3.7 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Um alle derzeit verfügbaren Datenbanken zur Vorhersage von Strukturen auf Basis der Primärstruktur simultan nutzen zu können, wurde der Structur prediction Meta Server (<http://www.bioinfo.pl/meta/>) (BUJNICKI et al., 2001) eingesetzt. Für den Sequenzabgleich (DNA und Protein) wurden die nicht redundanten Datenbanken PIR, NBRF, EMBL, SWISSPROT und GenBank (PEARSON und LIPMAN, 1988) verwendet.

DNA und Aminosäuresequenzalignments wurden mit ClustalW1.7 und ClustalX1.8PPC (THOMPSON et al., 1997)

Zur Erstellung von Stammbäumen wurde die Programmpakete PHYLIP Version 3.6 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/phylogeny/phylip-uk.html>); <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>; (FELSENSTEIN, 1997) und PAUP (GCG®-Package 10.1) eingesetzt. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit PAUPTREE (GCG®-Package 10.1) und TREEVIEW 1.6.6.PPC (PAGE, 1996).

## 2.18. Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien der Reinheitsgrade „p.A.“ oder „reinst“ von der Fa. Merck (Darmstadt) bezogen. Die zur Gaschromatographie verwendeten Gase stammten von der Firma Messer-Griesheim (Kassel). Weiterhin kamen Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme folgender Firmen zum Einsatz:

Behrens, Hamburg:

Japan-Agar

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim (Roche Molecular Biochemicals):

DNaseI, Trypsin

Difco Laboratories, Detroit, USA:

Skim-Milk

Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz:

Glycerol, 3-Hydroxybutyrat (Na-Salz), Na-Thiosulfat-Pentahydrat

GibcoBRL GmbH, Eggenstein/ (Invitrogen, Karlsruhe):

Hefeextrakt, Nutrient Broth, Platinum<sup>®</sup>Pfx-Polymerase, Taq-DNA-Polymerase

MBI-Fermentas, St. Leon-Rot:

Taq-DNA-Polymerase, Restriktionsendonukleasen, DNA-Größenstandards, T-4-DNA-Ligase, Cycle Reader<sup>™</sup> Auto DNA Sequencing Kit

Merck, Darmstadt:

Chloroform, Glycin, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (95-97 %), Methanol (Reinheitsgrad: für die Chromatographie), NAD, 2-Propanol, Silbernitrat

New England Biolabs GmbH, Schwalbach:

Vent Polymerase, Vent<sup>exo</sup> Polymerase

Oxoid, Wesel:

Oxoid-Agar No. 1

PE Applied Biosystems, Weiterstadt:

ABI PRISM<sup>™</sup> BigDye<sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase

Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg:

Agarose NA, LMW Molecular Weight Marker Kit, CM-Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharcel, Mono Q-, Mono S-, Mono P-Gepacktsäulen Q-Sepharose, HiTrap<sup>®</sup>HIC Test Kit, AutoRead 200 Sequencing Kit, FlexiPrep<sup>™</sup>

Qiagen AG, Hilden:

QIAquick Gel Extraction Kit, PCR Purification Kit, Plasmid Purification Kit

Riedel-de Haen AG, Seelze:

Ethansäure, Ethanol, HCl, NaOH

Roth GmbH:

Phenol/Chloroform für die Molekularbiologie, Acetonitril

Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg:

Acrylamid (2 x kristallin), Ammoniumpersulfat (APS), Bromphenolblau, BSA, EDTA (Na-Salz), Harnstoff (Ultra pure), Lysozym, PMSF, SDS, Serva Blau G, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Trypsin (42 U/mg)

Sigma Aldrich, Deisenhofen:

Chloramphenicol, Diazald, Dithiothreitol (DTT), Formaldehyd, *p*-Nitrophenylacetat, *p*-Nitrophenylbutyrat, *p*-Nitrophenylhexanoat, *p*-Nitrophenyloctanoat, *p*-Nitrophenyldecanoat, *p*-Nitrophenylpalmitat, Proteingrößenstandards (UMW- und LMW-Marker), Tetracyclin, Tris, Triton X100, Tween 20, Tween 60, Tween 80

### 3. EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

#### 3.1. Stand der Arbeiten zum enzymatischen Abbau von Polyhydroxyalkanoaten

Zu Beginn der experimentellen Arbeit waren dreizehn bakterielle extrazelluläre PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen (sechs aus *Paucimonas lemoignei*) mit hoher Spezifität für parakristalline dPHA<sub>SCL</sub> sowie eine extrazelluläre PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerase (SCHIRMER und JENDROSSEK, 1994) bekannt (für eine Übersicht siehe JENDROSSEK, 2001). Dahingehend untersuchte extrazelluläre Enzyme konnten nach biochemischer Charakterisierung gestützt auf Ergebnisse aus Mutationsexperimenten der Gruppe der Serinhydrolasen zugeordnet werden, welche sich durch eine katalytische Triade aus Serin, Histidin und Aspartat auszeichnen (BRUCATO und WONG, 1991; SHINOHE et al., 1996; NOJIRI und SAITO, 1997; JENDROSSEK et al., 1997). Alle dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen wiesen vergleichbar mit anderen Polymerhydrolasen eine charakteristische Abfolge von N-terminalem Signalpeptid, katalytischer Domäne mit Lipasebox, Linkerdomäne (Threonin-reich bzw. Fn3- oder Cadherin-artig) und einer C-terminal lokalisierten Substratbindedomäne in der Primärstruktur auf (JENDROSSEK et al., 1995b; OHURA et al., 1999). Versuche mit amorphen Polymeren sowie Polymerblenden zeigten, daß offenbar die Affinität der Substratbindedomäne zu parakristallinem Polymer für die Spezifität der extrazellulären dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen für parakristalline PHA<sub>SCL</sub> verantwortlich ist (KASUYA et al., 1996; KOYAMA und DOI, 1997; SCANDOLA et al., 1997, 1998; SHINOMIYA et al., 1998). Die außergewöhnlich hohe Zahl von sechs extrazellulären dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase-Isoenzymen in *P. lemoignei* konnte nur unbefriedigend mit der hohen Spezialisierung auf die Verwertung weniger organischer Säuren erklärt werden. Extrazelluläre dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen dieses Bakteriums besaßen auf Aminosäureebene Ähnlichkeiten von 37 bis 79 %. Untersuchungen zur Spezifität extrazellulärer dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* gegenüber kurzkettigen 3-HB-Oligomeren durch waren bisher nicht durchgeführt worden. Arbeiten zur Regulation der Enzymbildung und Sekretion in *P. lemoignei* zeigten eine enge Korrelation der Depolymerase-Freisetzung mit dem pH-Wert und der Verfügbarkeit aufnehmbarer Substrate (NAKAYAMA 1985, STINSON und MERRICK, 1974; TERPE et al., 1999).

Während auf dem Gebiet des extrazellulären dPHA-Abbaues bereits eine ganze Reihe von Informationen vorlagen, gab es zu Beginn der hier dargelegten Experimente nur einige physiologische Untersuchungen zum intrazellulären Abbau von PHA<sub>SCL</sub>. Für *Ralstonia eutropha* war die Fähigkeit nachgewiesen worden, endogenes PHB wiederzuverwerten (BARTHA, 1962, HIPPE und SCHLEGEL, 1967). Offenbar besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Lebensfähigkeit der Zellen und der PHB-Mobilisierung, sowie einer PHB-Granula-assoziierten Depolymeraseaktivität (JENDROSSEK et al., 1996; HANDRICK und JENDROSSEK, 1998). Bereits in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurde von MERRICK und DOUDOROFF (1961, 1964) eine intrazelluläre PHB-Depolymerase in *Rhodospirillum rubrum* postuliert. Den Autoren gelang es jedoch nicht, das verantwortliche Protein zu reinigen. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren keine gereinigten Enzyme oder DNA Sequenzen von extra- oder intrazellulären nPHA<sub>SCL</sub> Depolymerasen bekannt.

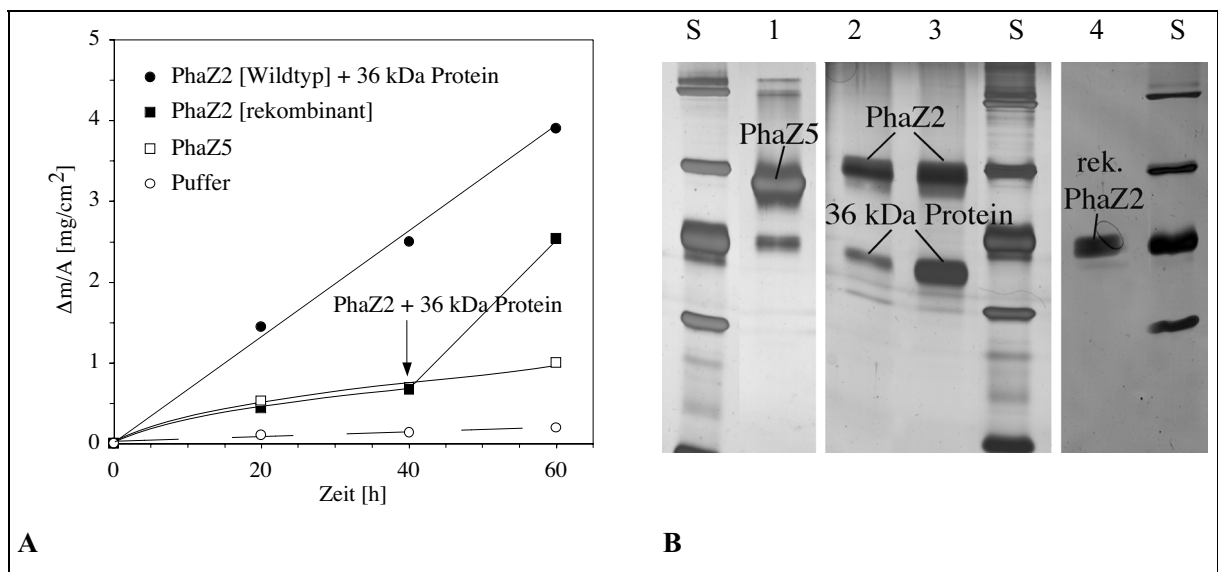
### 3.2. Entdeckung einer neuartigen extrazellulären PHA-Depolymeraseaktivität aus *Paucimonas lemoignei*

In früheren Arbeiten waren bisher sechs verschiedene extrazelluläre PHA<sub>SCL</sub> Depolymerasen aus *P. lemoignei* identifiziert, in *E. coli* kloniert und zum Teil charakterisiert worden. Für alle Enzyme wurde eine hohe Spezifität für dPHB [PhaZ1, PhaZ3, PhaZ5], bzw. dPHB und dPHV [PhaZ6 > PhaZ1 > PhaZ4 ≥ PhaZ2] sowie Copolymere P(3-HB-co-3-HV) beschrieben (JENDROSSEK et al., 1993b; SCHÖBER et al., 2000; JENDROSSEK, 2001b). Basierend auf Untersuchungen von ABE et al. (1995) mit PhaZ<sub>Rpi</sub> aus *Ralstonia pickettii*, DOI et al. (1992) mit Polymerblenden und ataktischen (amorphen) Polyhydroxyalkanoaten sowie Experimenten zur Substratbindung von PhaZ5 aus *P. lemoignei* mit Fusionsproteinen aus potentieller PHA-Bindedomäne und MalE (BRIESE und JENDROSSEK, 1998) wurden Modelle der enzymatischen Hydrolyse von PHA entworfen. Diese basierten auf einer Bindung der C-terminalen Substratbindedomäne (SBD) der PHA<sub>SCL</sub> Depolymerasen an kristalline Bereiche des Polymers/der Polymerblende (SCANDOLA et al., 1998; zur Domänenstruktur extrazellulärer PHA Depolymerasen s. 1.4.2.1., Abb. 2) und standen im Einklang mit der bisher für extrazelluläre PHA Depolymerasen beobachteten Spezifität für parakristalline PHA. Um die Bindeeigenschaften von PhaZ2 und der potentiellen Substratbindedomäne aus PhaZ5 studieren zu können, wurden in einem Gemeinschaftsprojekt mit Dr. M. L. Focarete (Department of Chemistry, Universität Bologna, Italien) eine erneute Reinigungen der MalE::SBD Fusionsproteine (BRIESE und JENDROSSEK, 1998) sowie der dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen PhaZ2 und PhaZ5 nach TOMASI et al. (1996) durchgeführt. In den geplanten Bindeversuchen sollte synthetisches ataktisches Polymer (aPHB;  $M_n = 22000$  bei einer Polydispersität  $M_w/M_n = 1,17$ ) zum Einsatz kommen, welches aufgrund des Gehaltes an S-3-HB Untereinheiten in vollständig amorpher Form vorlag. Die beiden extrazellulären dPHA<sub>SCL</sub> Depolymerasen des Wildtyps und rekombinante PhaZ2 (MÜLLER et al., 1992) dienten Kontrollzwecken. Aus den Versuchen ergaben sich Hinweise auf das Vorhandensein einer neuen extrazellulären Enzymaktivität mit Spezifität für amorphe PHA<sub>SCL</sub>.

#### 3.2.1. Abbau von ataktischer PHB durch partiell gereinigte dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase

In Experimenten zur Bestimmung der Stabilität ataktischer PHB-Filme definierter Oberfläche durch Messung des Massenverlustes (2.10.1.6.) zeigten extrazelluläre dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ5 und aus rekombinanten *E. coli* isolierte dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ2 erwartungsgemäß nur äußerst geringe aPHB-Depolymeraseaktivität. Wurden jedoch nur partiell gereinigte PhaZ2 Fraktionen des Wildtyps (nach CM-Sepharose CL6B) eingesetzt, kam es überraschenderweise zum signifikanten Abbau des ataktischen Polymers. Das Auftreten makroskopischer „Löcher“ in den aPHB-Filmen und die zunehmend porösere Oberfläche wiesen auf eine Erosion hin. Die Ergebnisse des Experiments sind in Abbildung 6 zusammengefasst. Der mit rekombinanter PHB-Depolymerase PhaZ2 erhaltene Wert von 3,2 mg Polymer/(cm<sup>2</sup> x h x mg Protein) lag deutlich unter dem für die partiell aufgereinigte PhaZ2-Fraktion des Wildtyps, welche eine Freisetzung von 11,9 mg löslichen Hydrolyseprodukten pro cm<sup>2</sup> x h x mg Protein bewirkte (Abb. 6 A). Neben der PhaZ2 entsprechenden Bande (64 kDa) trat in

analytischen SDS-Gelen eine zweite Bande bei 36 kDa auf (Abb. 6 B). Es wurde vermutet, daß es sich bei der 36 kDa Bande um das für die beobachtete aPHB-Depolymeraseaktivität verantwortliche Protein handelt.



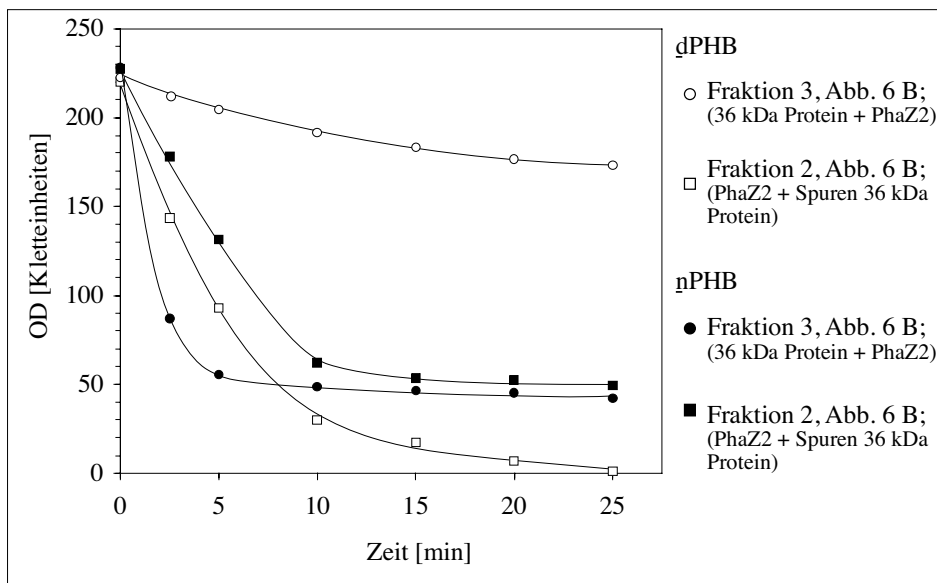
**Abb. 6:** Versuch zum Abbau ataktischer PHB mit PhaZ2 (rekombinantes und partiell gereinigtes Wildtyp-Enzym) sowie PhaZ5 (Wildtyp-Enzym).

**(A)** Masseverlust ataktischer PHB-Filme bei Inkubation mit Fraktionen extrazellulärer PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen. Je 20 mg auf Polyethylenträger aufgebracht PHB-Film ( $A = 87,5 \text{ mm}^2$ ) wurde in  $2 \times 1,5 \text{ ml}$  50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 1 mM  $\text{CaCl}_2$  20 h vorinkubiert, um Kronenether-Rückstände aus der Synthese zu entfernen. Anschließend wurden die Proben mit  $6,3 \mu\text{g}$  der angegebenen Depolymerasen in  $1,5 \text{ ml}$  frischem Puffer inkubiert. In Intervallen von 20 h wurden die immobilisierten aPHB-Filme entnommen, getrocknet und die Massenänderung bestimmt. Anschließend erfolgte sukzessive Inkubation in frischer Enzymlösung für je weitere 20 h. Im Falle des Experimentes mit rekombinanter PhaZ2 wurden nach 40 h  $6,3 \mu\text{g}$  partiell gereinigte Wildtyp-Depolymerase (PhaZ2+36 kDa Protein) zugesetzt.

**(B)** 12,5 %-iges SDS-Gel der PHB-Depolymerasefraktionen nach Silberfärbung. Spur 1: PhaZ5 (2,23 µg; Bei der schwachen 43 kDa Bande handelt es sich um ein Abbauprodukt von PhaZ5, siehe TOMASI et al., 1996 und 3.3.4., Abb. 14); Spur 2 und 3: PhaZ2-Fractionen nach Ionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose CL6B: PhaZ2 + potentielle nPHB Depolymerase (1,2 µg; 3,6 µg); Spur 3: rekombinante PhaZ2 (2,3 µg). Rekombinante PhaZ2 (*E. coli*) lag im Gegensatz zu PhaZ2 und PhaZ5 Wildtypdepolymerasen aus *P. lemoignei* nicht glycosyliert vor (BRIESE et al., 1994b; JENDROSSEK et al., 1995b) und zeigte im SDS-Gel eine apparente Molekularmasse von 44 kDa. S: LMW-Proteinstandard.

Ausgehend von den während des zeitgleichen Arbeitens mit intrazellulären PHA Depolymerasen gewonnenen Erfahrungen wurden Experimente zur Verifizierung der hydrolytischen Aktivität durchgeführt. Da aPHB offenbar für das als Verunreinigung in den PhaZ2-Fractionen enthaltene 36 kDa Protein ein verwertbares Substrat darstellte, lag es nahe, die Proben auch gegen natürlich vorkommende amorphe PHA zu testen. Zu diesem Zweck wurden nach 2.12. isolierte native amorphe PHB-Granula sowie als Kontrolle durch Natriumhypochlorit und Lösungsmittelextraktion (s. 2.2.3.) gewonnene dPHB aus *Ralstonia eutropha* H16 in einem einfachen turbidimetrischen Test hinsichtlich ihrer Abbaubarkeit durch die betreffenden Enzymfraktionen untersucht (Abb. 7). Fractionen mit dominierender PhaZ2 Bande und nur geringem Anteil 36 kDa Protein zeigten eine der Depolymerisation von denaturierter PHB vergleichbare Trübungsabnahme nativer PHB. Nach etwa 10 min erschienen die Ansätze deutlich klar. Fractionen mit stärkerem Anteil 36 kDa Protein führten bereits nach 5 min zu einem nahezu vollständigen Aufklaren der Testansätze mit nPHB. dPHB wurde

nur noch mit 14 % der Rate für native PHB-Granula hydrolysiert. Die Beobachtungen legten nahe, daß es sich im Falle des 36 kDa Proteins um die erste extrazelluläre PHA-Depolymerase mit Spezifität für amorphes Polymer handeln könnte.

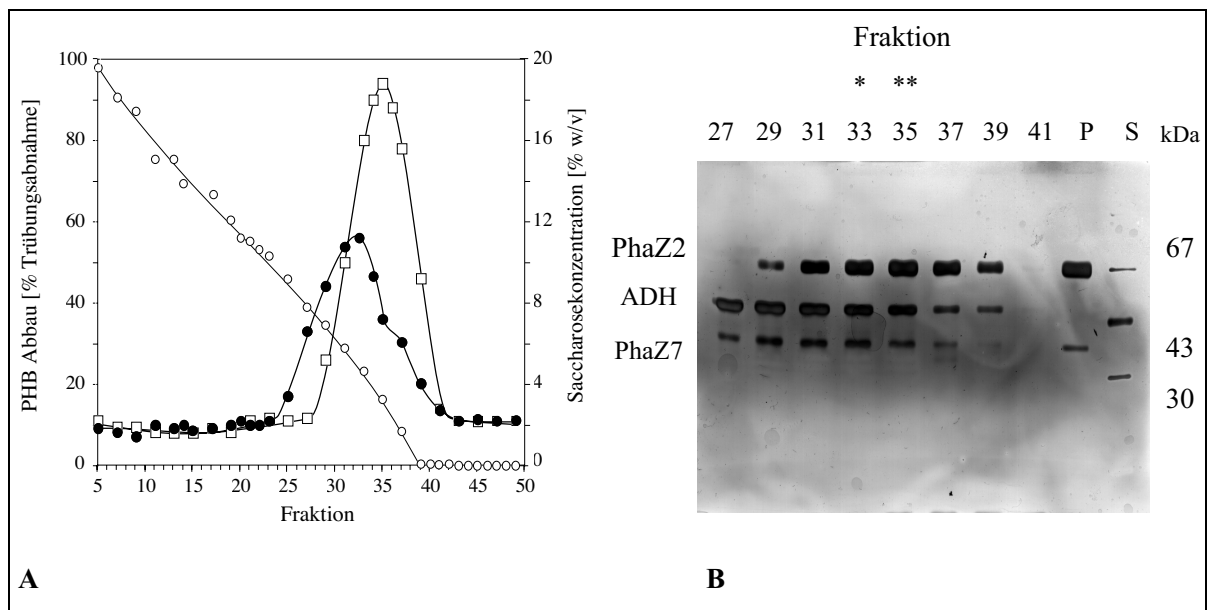


**Abb. 7:** Abbau nativer und denaturierter PHB Granula aus *R. eutropha* H16 durch partiell gereinigte Fraktionen von PhaZ2 und potentieller nPHB-Depolymerase aus *P. lemoignei*. Die Ansätze enthielten 455 mg PHB-Granula in einem Gesamtestvolumen von 2 ml Tris/HCl (100 mM, pH 9,0; 1 mM CaCl<sub>2</sub>). Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,65 µg in 10 mM Tris/HCl (pH 7,4; 1 mM CaCl<sub>2</sub>) vorverdünntem Enzym. Die Trübungsabnahme während der Inkubation bei 40°C wurde im Klettphotometer verfolgt. Die Fraktionen entsprachen Spur 2 und 3 in Abbildung 6 B. Bei Fraktion 3 [36 kDa Protein + PhaZ2 (Wildtyp)] handelte es sich um die Probe der Ionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose CL6B mit signifikanter hydrolytischer Aktivität gegen ataktisches PHB.

### 3.2.2. Partielle Trennung der Hydrolyseaktivitäten gegen native und denaturierte PHB im Saccharosedichtgradienten

Um zu zeigen, daß es sich bei dem beobachteten 36 kDa Protein tatsächlich um eine nPHA-Depolymerase handelte, war die Trennung des Proteins von PhaZ2 erforderlich. Hierfür wurde eine Dichtegradientenzentrifugation [0-20 % (w/v) Saccharose] durchgeführt. Nach 16 h trat eine reproduzierbare Aktivitätsverteilung mit um zwei Fraktionen versetzten Aktivitätsmaxima für die nPHB- bzw. dPHB-Depolymeraseaktivität auf (Abb. 8 A). Im Bereich von 9 bis 0,1 % (w/v) Saccharose bandierte die nPHB-Depolymeraseaktivität mit einem Aktivitätsmaximum in Fraktion 33 [4,6 % (w/v) Saccharose], während dPHB Depolymeraseaktivität erst ab etwa 7 % (w/v) Saccharose mit einem Maximum in Fraktion 35 [3,3 % (w/v) Saccharose] beobachtet wurde. Die Aktivitäten konnten dem Konzentrationsverlauf der Proteinbanden im SDS-Polyacrylamidgel zugeordnet werden, überlappten jedoch stets (Abb. 8 B). Bei der Bestimmung der nPHB Depolymeraseaktivität wurde ein typisches „Schultern“ des Peaks in unabhängigen Experimenten im Bereich des Aktivitätsmaximums der dPHB-Depolymeraseaktivität beobachtet, was auf eine mögliche geringere nPHB-Hydrolyse auch durch PhaZ2 schließen ließ.





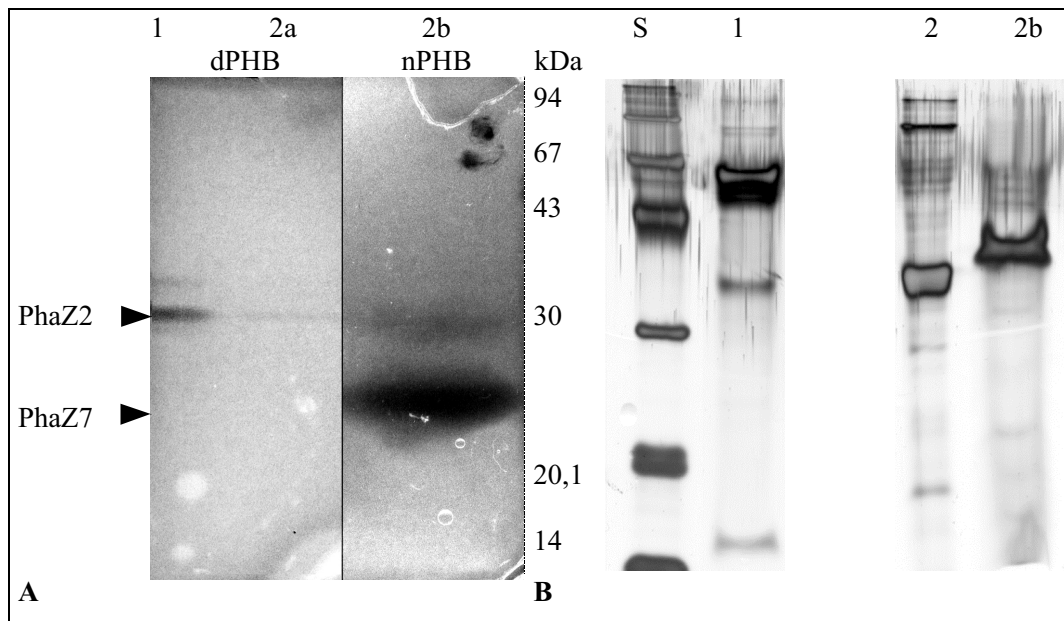
**Abb. 8:** Aktivitätsverteilung (A) und Proteinbandierung in der SDS-PAGE (B) nach partieller Trennung von dPHB-Depolymerase PhaZ2 und nPHB-Depolymeraseaktivität aus *P. lemoignei* im linearen Saccharosedichtegradienten (○; 0-20 % w/v Saccharose in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 16 h, 4°C, 160000 x g).

Es wurden 175 µl (228 µg Protein) eines an CM-Sepharose CL6B partiell gereinigten Depolymerasepools nach einer Dialyse gegen Gradientenpuffer eingesetzt. Dargestellt wurden der nPHB-(●) und dPHB-Granulaabbau (□) durch je 10 µl der gewonnenen Fraktionen analog dem unter Abb. 7 beschriebenen turbidimetrischen Test. Die Abbauraten entsprechen der Trübungsabnahme nach 7 min Inkubation bei 40°C. In der anschließenden SDS-PAGE wurden je 15 µl der 205 µl Fraktionen aufgetragen und das Gel nach Elektrophorese durch Silberfärbung entwickelt. \* Fraktion höchster nPHB-Depolymeraseaktivität, \*\* Fraktion höchster dPHB-Depolymeraseaktivität, P: partiell gereinigte Fraktion (CM-Sepharose) mit Aktivität gegen ataktisches PHB, 1,3 µg; ADH, Alkoholdehydrogenase (Größenstandard); S: LMW-Proteinstandard.

### 3.2.3. Trennung von PHA Depolymerasen aus *P. lemoignei* im nativen Gel

Um sicherzustellen, daß es sich bei den in Abb. 6, 7 und 8 beobachteten hydrolytischen Aktivitäten um verschiedene (unabhängige) PHB-Depolymeraseaktivitäten handelte, wurde ein Gradientengelsystem (4 – 20 %) zur Trennung der nativen Proteine mit anschließender Aktivitätsbestimmung entwickelt (s. 2.2.6.). In entsprechenden Vorversuchen erwies sich die nPHB-Depolymeraseaktivität als alkalistabil und zeigte bei pH < 9,0 keine Bindung an Mono P. Da die bisher untersuchte Fraktion jedoch durch Anionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose CL6B (pH 4,7) gewonnen worden war, besaß die nPHB-Depolymerase offenbar einen isoelektrischen Punkt > pH 9. Die Trennung im nativen kathodischen Gel bei pH 6,0 verlief jedoch ohne Erfolg. Aus diesem Grunde wurde 1,3-Diaminopropan/HCl (100 mM, pH 10,5) als Gel- und Laufpuffer gewählt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde eine Aktivitätsfärbung auf nPHB- und dPHB-Depolymeraseaktivitätsplatten nach 2.2.5./2.2.6. durchgeführt. Es konnte eine dominante Bande mit nPHB-Granula sowie eine Bande mit dPHB Granula in Form entsprechender Aufklarungszonen nachgewiesen werden (Abb. 9 A). Da eine Färbung der Polyacrylamidgele mit herkömmlichen Protokollen nicht möglich war, wurden die durch Aktivitätstest nachgewiesenen Bandenbereiche ausgeschnitten, das Gelmaterial mazeriert und in SDS-Beschwererlösung aufgenommen. Die Identifikation der Banden erfolgte in einer sich anschließenden SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen (Abb 9 B). Aufgrund des direkten Einsatzes von mazerierten Polyacrylamidgel-Banden kam es zu einem leichten Bandenshift (+4 kDa). Die bereits nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C nachweisbare Hauptaktivität mit immobilisierten

nPHB-Granula [in 1 % (w/v) Agarose] war offenbar mit dem 36 kDa Protein assoziiert, welches im Test gegen dPHB keine signifikante Aktivität zeigte. Die scharfe Bande der dPHB Depolymeraseaktivität wurde Depolymerase B (PhaZ2) zugeordnet. Für die nPHA Depolymerase wurde unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ein Rf-Wert von 0,66 bestimmt. Das Protein wanderte im Gradientengel bei pH 10,5 deutlich weiter als PhaZ2 (Rf = 0,46).



**Abb. 9:** Trennung von PhaZ2 und PhaZ7 im nativen Gradienten-Polyacrylamidgel (4–20 %).

(A) Je 12,5 µg partiell gereinigte dPHB Depolymerase PhaZ2 (1) und nPHB Depolymerase PhaZ7 (2a, 2b) wurden im nativen Gradientengel (4-20 % Acrylamid) bei 4°C, 100 V, 1 W und pH 10,6 einer 12stündigen Elektrophorese unterzogen. Das Gel wurde 5 min in frischem 1,3-Diaminopropanpuffer (25 mM; pH 9,0) gewaschen und auf Aktivitätsagarose- und Aktivitätsagarplatten mit nPHB (Spuren 1, 2a) bzw. dPHB (2b) aufgebracht und 60 min bei 37°C inkubiert.

(B) Identifikation der aus dem Nativgel ausgeschnittenen und in mazerierter Form (3 min bei 95°C in Denaturierungspuffer gekochte Gelblöckchen) direkt auf ein 12,5 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragenen Aktivitätsbanden. In Spur 2 wurden zur Kontrolle 2 µg partiell gereinigte nPHB-Depolymerase aufgetragen. (S: LMW-Proteinstandard).

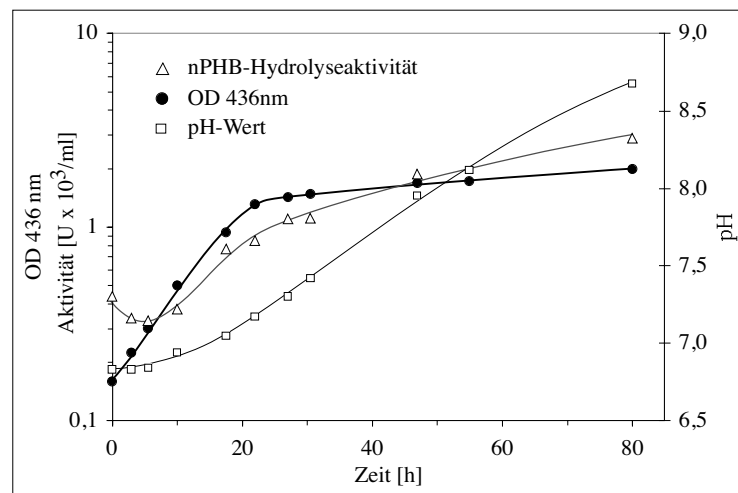
Bei dem 36 kDa Protein handelte es sich offenbar um eine von PhaZ2 deutlich abgrenzbare nPHB-spezifische Hydrolyseaktivität. Das Enzym wurde als potentielle siebente extrazelluläre PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *P. lemoignei* in Anlehnung an die von STEINBÜCHEL et al. (1992) und JENDROSSEK et al. (1993) vorgeschlagene Nomenklatur mit PhaZ7 bezeichnet.

In Versuchen mit konzentrierten Kulturüberständen, nach Fällung (30 – 85 % Salzsättigung) und Dialyse traten auf nPHB neben der PhaZ7 zugeordneten Bande mindestens drei weitere hydrolytisch aktive Proteine auf. Eines dieser potentiellen nPHA Depolymerase-Isoenzyme wies eine höhere gelelektrophoretische Beweglichkeit als PhaZ7 auf.

### 3.3. Präparative Reinigung extrazellulärer nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase (PhaZ7) sowie der dPHB-Depolymerasen A (PhaZ5) und B (PhaZ2)

Aus der Literatur war bekannt, daß *P. lemoignei* bei Wachstum auf Succinat mit Überschreiten eines pH von 6,9 bei abnehmender Wachstumsrate vermehrt extrazelluläre PHA-Depolymerasen ausscheidet (STINSON und MERRICK, 1974, TERPE et al., 1999). Für die Anzuchten wurde eine 80 h Batchkultur gewählt, weil Vorversuche auf eine zunehmende Akkumulation von PhaZ7 mit guter Stabilität in der stationären Wachstumsphase deuteten.

Für die präparative Enzymreinigung wurden 20 x 1 Liter Mineralmedium (MM) nach STINSON und MERRICK, pH 6,8 (2.2.1.) mit sukzessive in 50 ml MM, 0,5 % (w/v) 3-HB und 500 ml MM, 0,4 % (w/v) Succinat, 0,1 % (w/v) 3-HB angezogenen Zellen mit einer Start OD<sub>436 nm</sub> von 0,1 beimpft. Der End-pH der zweiten Vorkultur lag bei 7,3. Als alleinige Kohlenstoffquelle der Hauptkultur dienten 1,35 % (w/v) Natriumsuccinat x 6 H<sub>2</sub>O. Die optische Dichte und der pH-Wert wurden exemplarisch anhand eines Kulturkolbens verfolgt (Abb. 10). Nach etwa 25 h exponentiellen Wachstums gingen die Zellen in die stationäre Wachstumsphase über. Der Verbrauch von Succinat schlug sich, beginnend nach etwa 6 h bei Überschreiten der Pufferkapazität des Mediums, in einem über die folgenden 50 h nahezu linearen Anstieg des pH-Wertes im Kulturüberstand nieder. Beginnend mit dem Überschreiten eines pH-Wertes von 7 stieg die Volumenaktivität der nPHB-Depolymerase auf bis zu 1860 U/ml gegen Ende des Wachstums. Die Kulturen wurden nach 80 h auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation bei 4°C der Depolymerase-haltige Überstand von Zellen gereinigt. Die erreichte OD<sub>456 nm</sub> zum Erntezeitpunkt lag bei 2,06; der pH Wert des Kulturüberstandes bei 8,7. Tropftests mit je 2 µl des Kulturüberstandes auf nPHB-Tris-Agaroseplatten und dPHB-Tris-Aktivitätsagarplatten (2.2.5., 2.2.6.) zeigten nach 10 min die Bildung deutlicher Aufklärungshöfe (Hofdurchmesser auf nPHB 6 mm und auf dPHB 4 mm). Im Trübungstest zeigte der Kulturüberstand eine Volumenaktivität von 1,7 \* 10<sup>3</sup> U/ml (nPHB-Hydrolyse). Die Volumenaktivität mit dPHB als Substrat lag bei lediglich 6 % dieses Wertes.



**Abb. 10:** Wachstum und Alkalisierung des Mediums einer 1 Liter Batchkultur *P. lemoignei* mit Natriumsuccinat x 6 H<sub>2</sub>O (1,35 % w/v). Dargestellt sind die optische Dichte bei 436 nm (●), die nPHB-Depolymerase-Volumenaktivität im Trübungstest (Δ; s. 2.10.1.2.) und der pH-Wert des Kulturüberstandes nach Abtrennung der Zellen (□).

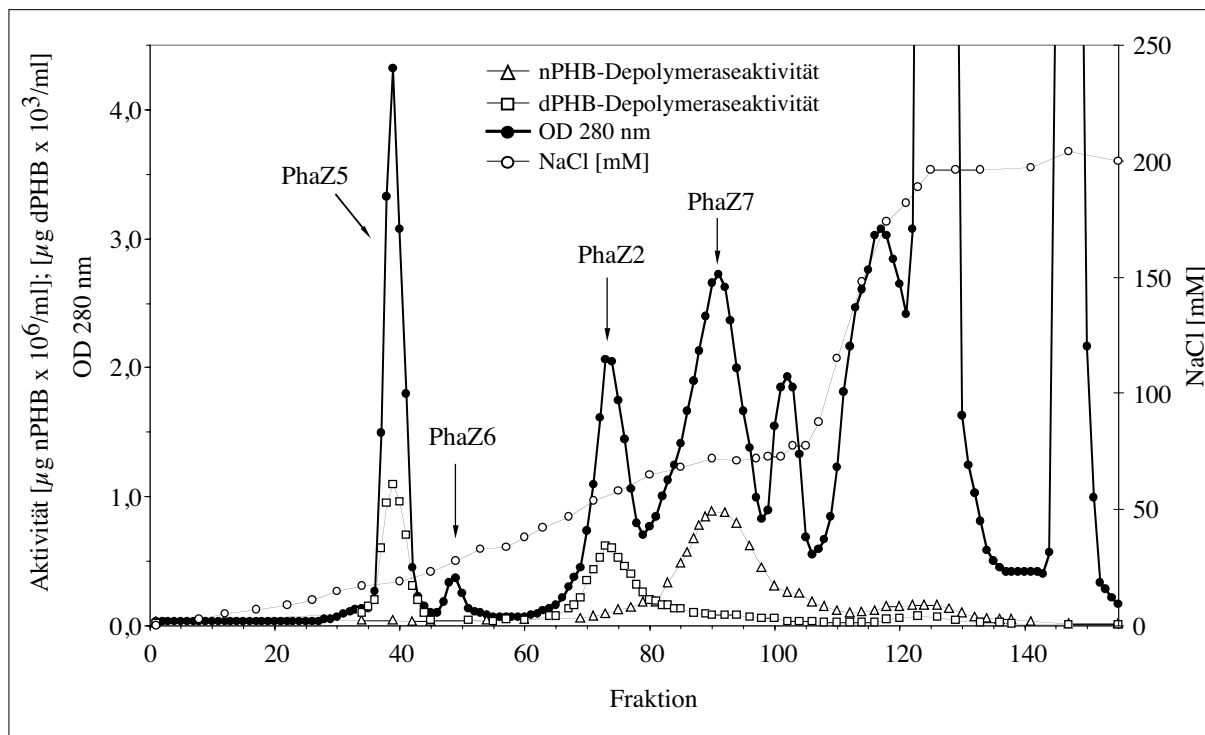
Der zellfreie Überstand aus 20 Litern Kultur wurde anschließend mit Hilfe einer YM10-Spiralkartusche gegen 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) diafiltriert und auf 1200 ml eingengt. Die konzentrierte Proteinlösung zeigte eine bernsteinartige bis orangerote Färbung (unkonzentrierter Kulturüberstand erschien schwach grüngelb). Mit Hilfe eines ersten Ammoniumsulfatfällungsschrittes der im Vorversuch ermittelten optimalen Sättigungskonzentration von 30 % wurden überwiegend niedermolekulare Fremdproteine abgetrennt. Die im Überstand verbliebenen PHA-Depolymerasen wurden durch Erhöhen der Salzkonzentration auf 85 % Sättigung nahezu quantitativ gefällt. Das Depolymerase-haltige leicht rosa gefärbte Pellet wurde in 20 mM Tris/HCl (pH 8,0) resuspendiert und gegen Succinat-Puffer (10 mM Succinat/NaOH, pH 4,7; 5 % Glycerol, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) diafiltriert. Dieser Schritt erwies sich als kritisch, da es mit fortschreitender Dialyse zum Auftreten von Proteinaggregaten kam. Wurden Pellets der 30-85 % Fällung sofort in Succinat-Puffer resuspendiert und auf Glycerol verzichtet, zeigte sich dieser Effekt noch ausgeprägter. Die Probe wurde bis zu einer Proteinkonzentration von etwa 1 mg/ml (730 ml) eingengt.

### 3.3.1. Ionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose CL-6B

Ausgehend von 730 ml gegen Succinat-Auftragspuffer (10 mM Succinat/NaOH, pH 4,7; 5 % v/v Glycerol, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) diafiltrierter Probe wurde eine mit Auftragspuffer äquilibrierte CM-Sepharose CL-6B Säule (150 ml BV) mit einem Fluß von 1 ml/min mit Protein geladen. Durch das anschließende Waschen mit 230 ml Auftragspuffer wurde ungebundenes Protein entfernt. Mit Erreichen der UV-Absorptionsbasislinie wurde die Elution der Depolymerasen mit Hilfe eines Gradienten von 0 bis 200 mM NaCl (in 850 ml Succinat/NaOH-Auftragspuffer) bei 0,75 ml/min gestartet. Die erhaltenen Chromatogramme wiesen in allen Fällen eine charakteristische Abfolge von Proteinpeaks bei 280 nm auf (Abb. 11). Depolymerase A (PhaZ5) eluierte als scharfer Peak bei ca. 20 mM NaCl, gefolgt von einer am Gesamtprotein nur mit maximal 0,1 % beteiligten PHV-Depolymeraseaktivität bei 28 mM NaCl. Wahrscheinlich handelte es sich bei diesem Protein um die von SCHÖBER et al. (2000) beschriebene PHV-Depolymerase PhaZ6. Bei ca. 60 % NaCl erschien wiederum dPHB-Depolymeraseaktivität (PhaZ2). Unmittelbar nach Elution dieses Peaks wurde der bis dahin lineare Gradient gestoppt. Der sich anschließende Hauptanteil der nPHA-Depolymeraseaktivität (PhaZ7) wurde im dargestellten Experiment isokratisch bei etwa 70 mM NaCl eluiert. Fraktionen mit PhaZ5 erwiesen sich als bereits sehr gut aufgereinigt. Die Peaks von PhaZ2 und PhaZ7 hingegen zeigten im Test mit nativen und denaturierten PHB-Granula noch geringe „Kreuzaktivitäten“ (Abb. 11), was auf eine wechselseitige Kontamination schließen ließ.

Eine an CM-Sepharose CL6B zeitversetzt erfolgende Elution von nPHB-Depolymeraseaktivität ( $V_{\text{Elution}}$  675 ml) und dPHB-Depolymeraseaktivität ( $V_{\text{Elution}}$  293 ml und 548 ml) sowie die Bandenverteilung im Proteinmuster der Fraktionen (SDS-PAGE) wiesen auf eine Unterscheidung von PhaZ2 und PhaZ7 hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Ausgehend von der Annahme, daß ein enzymatischer Abbau der untersuchten PHB-Substrate eine Bindung der Proteine an das hydrophobe

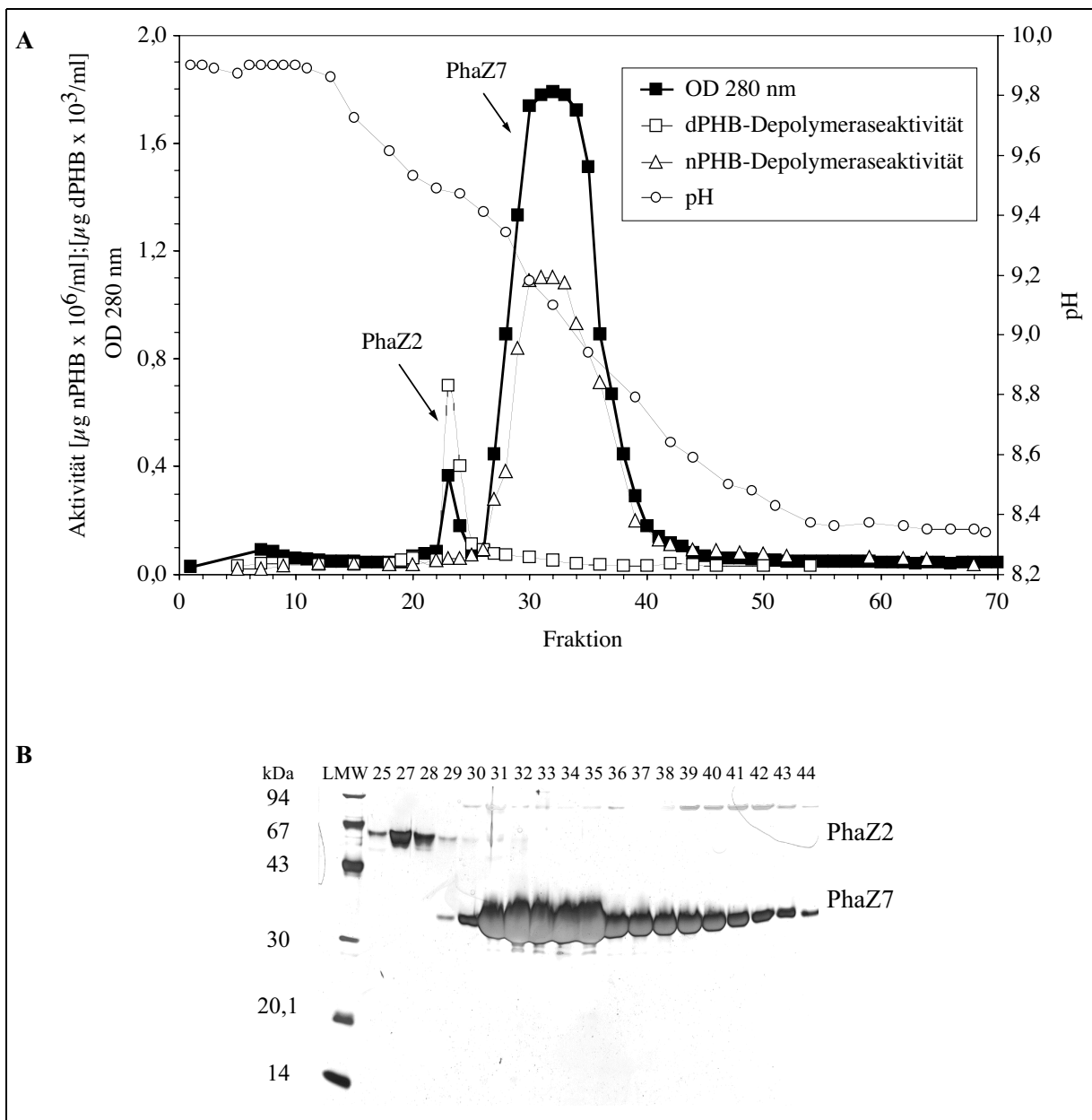
Polymersubstrat voraussetzt, wurden chromatographische Reinigungsversuche an Butyl- und Phenyl-Sepharose vorgenommen, welche jedoch keine zufriedenstellende Trennung ergaben.



**Abb. 11:** Säulenchromatographische Reinigung der dPHB-Depolymerasen PhaZ2, PhaZ5 und der nPHB-Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei* (740 mg Protein) durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose CL-6B (BV 150 ml; Laufpuffer 10 mM Succinat/NaOH, pH 4,7, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; Fraktionsgröße 7,5 ml; Flußrate 0,75 ml/min). Die nPHB und dPHB-Depolymeraseaktivitäten wurden durch Trübungstest im Mikrotiterplattenphotometer bestimmt (s. 2.10.1.2.).

### 3.3.2. Chromatofokussierung an Mono P

Die bisher erhaltenen Daten legten die Divergenz der isoelektrischen Punkte von PhaZ2 und PhaZ7 nahe. Der Versuch einer Reinigung beider Aktivitäten durch Chromatofokussierung an Mono P schien daher aussichtsreich. Nachdem sich in Vorversuchen bereits deutliche Hinweise auf eine hohe Stabilität in alkalischen Puffersystemen ergaben (Nativgel s. 3.2.3.), wurde für die Trennung ein pH-Bereich von 10,5 bis 8,0 gewählt. Zu Beginn mußte der nach CM-Sepharose CL6B erhaltene Pool mit überwiegender nPHB-Depolymeraseaktivität (97 ml) gegen den Startpuffer 1,3-Diaminopropan/HCl (25 mM, pH 10,5) diafiltriert werden. Die Probe wurde zugleich auf 40 ml eingengt, da das Bettvolumen der verfügbaren Säule lediglich 4 ml betrug. Probenauftrag, Spülen mit 19,5 ml Auftragungspuffer und die sich anschließende Elution erfolgten bei 0,5 ml/min. Für die Elution wurde Pharmacia Pharmalyte (pH-Bereich 8,0 - 10,5) 1:60 in  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und mit HCl auf pH 8,0 titriert. Dieser Elutionspuffer ermöglichte im dargestellten Experiment einen nahezu linearen pH Gradienten von 10 bis 8,5. PhaZ2 eluierte bei Erreichen eines pH von ca. 9,5. Der Wert für PhaZ7 lag mit pH 9,2 bis 8,8 nur geringfügig niedriger (Abb. 12 A). Offensichtlich reichte diese Differenz jedoch aus, um beide Aktivitäten voneinander zu separieren.



**Abb. 12:** Elutionsprofil einer Chromatofokussierung von PhaZ7 an Mono P.

(A) Auf eine Mono P Säule mit 4 ml Bettvolumen wurden 20,5 ml gegen 1,3-Diaminopropan/HCl (25 mM, pH 10,5) diafiltrierte Probe nach CM-Ionenaustauschchromatographie aufgetragen. Die Elution erfolgte durch einen abnehmenden pH Gradienten mit Hilfe von Pharmacia Pharmalyte/HCl [1:60 (v/v); pH 8,0] bei einer Flußrate von 0,5 ml/min. Die Fraktionsgröße betrug 0,5 ml.

(B) Mono P Fraktionen nach SDS-PAGE und Silberfärbung. Es wurden 2  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Fraktionen aufgetragen. Die Fraktionen 25-28 (PhaZ5) sowie 32-35 (PhaZ7) wurden vereinigt und nach Einfrieren in Flüssigstickstoff bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert. Die Fraktionen 36-43 zeigten eine Kontamination mit einem 80 kDa Protein und wurden separat gepoolt.

Der Erfolg der Trennung wurde durch eine eindeutige Zuordnung von nPHB- und dPHB-Depolymeraseaktivitäten zu den im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch > 99 % homogen vorliegenden Proteinfractionen bestätigt (Abb. 12 B). Zum Erhalt einer optimalen Trennleistung erwies es sich von Vorteil, die aufgetragene Proteinmenge auf 5 mg zu limitieren. Für die präparative Reinigung aus 20 L Kulturüberstand wurden deshalb zwei bis maximal fünf separate Chromatofokussierungen durchgeführt und die aktiven Fraktionen nach Überprüfung der Reinheit (SDS-PAGE) vereinigt.

Für gereinigte reife PhaZ7 wurde ein spezifischer (konzentrationsabhängiger) Absorptionskoeffizient  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 1,89 \text{ ml/mg Protein}$  ermittelt.

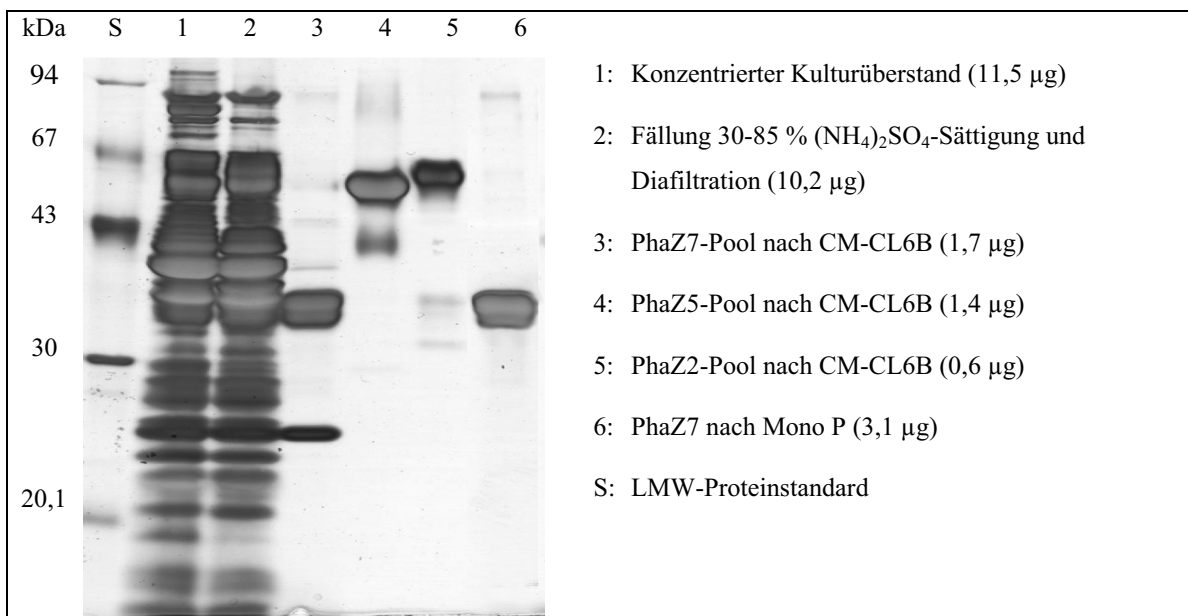
### **3.3.3. Ergebnis der Anreicherung extrazelluläre nPHA- und dPHA-Depolymerasen aus *P. lemoignei***

Alle untersuchten extrazellulären PHA<sub>SCL</sub> Depolymerasen konnten mindestens zehnfach angereichert werden. Die für nPHA Depolymerase PhaZ7 erzielte Ausbeute lag mit 29 % etwa im Bereich der Ausbeute für die extrazelluläre dPHB-Depolymerase PhaZ5 (34 %). Nach CM-Sepharose CL6B 11-fach angereicherte, noch mit Spuren von PhaZ7 kontaminierte PhaZ2 wurde keiner weiteren Reinigung unterzogen. Hochreine PhaZ2 wurde nach der bereits beschriebenen Methode (3.3.2.) durch Chromatofokussierung aus dem partiell an CM-Sepharose CL6B gereinigten PhaZ7-Pool gewonnen. Der Verlauf der Gesamtaktivitäten (Tab. 12) zeigte, daß die Gegenwart einer hohen Konzentration anderer Proteine zu einer Verringerung der nPHB-Aktivität führte. Eine Abtrennung im Zuge der Reinigung war möglicherweise die Ursache für die nach Fällung und Dialyse sowie nach Chromatographie an Kationenaustauscher beobachtete scheinbare Zunahme der Gesamtaktivität. Wie in späteren Versuchen gezeigt (3.7.9.), kam es offenbar zu einer wechselseitigen Beeinflussung der Aktivitäten von nPHB- und dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen. Der Erfolg der Reinigung konnte nach SDS-PAGE zweifelsfrei nachgewiesen werden (Abb. 13). Bei in der Silberfärbung für einige Reinigungsexperimenten beobachteten Doppelbanden nach Chromatographie an Mono P handelte es sich offenbar um Isoenzym oder aber Artefakte, da beide Banden den gleichen N-Terminus aufwiesen (s. 3.5., Abb. 19).

**Tab. 12:** Reinigungsverlauf extrazellulärer nPHA-Depolymerase PhaZ7 sowie der dPHAS<sub>CL</sub>-Depolymerasen PhaZ2 und PhaZ5 aus dem Kulturüberstand von *P. lemoignei*.

Arbeitsschritt	Protein- konzentration [mg/ml]	Protein [mg]	Aktivität* [U] x 10 <sup>4</sup>	Spezifische Aktivität* [U/mg] x 10 <sup>4</sup>	Ausbeute [%]	Anreicherung [x-fach]
<u>Kulturüberstand</u>	0,07	1400	3351/195	2,4/0,14	100/100	1,0/1,0
Konzentrierter Überstand	1,15	1380	3308/188	2,4/0,14	98,7/96	1,0/1,0
<u>Ammoniumsulfatfällung</u> (nach Dialyse):						
30-85 % Sättigung	1,02	741	4341/185	5,9/0,25	130/94,9	2,5/1,8
<u>CM-Sepharose CL-6B:</u>						
PhaZ7 -Pool	1,71	167	4268/1,9	25,6/0,01	127,5	10,6
<b>PhaZ5 (Dep A)</b>	1,37	41	0,001/66	0,0005/1,6	<b>33,8</b>	<b>11,4</b>
PhaZ2 (Dep B)	0,57	34	81/51	2,4/1,5	<b>26,2</b>	<b>10,7</b>
<u>Mono P:</u>						
<b>PhaZ7-Pool</b> (5 x Mono P)	0,62	37,2	<b>973/&lt;0,01</b>	<b>26,1/&lt;0,001</b>	<b>29</b>	<b>10,9</b>
<b>PhaZ2 (Dep B) aus</b> PhaZ7 CM-Pool nach Mono P	0,72	3,6	0,035/0,6	0,032/0,11	<b>0,31</b>	<b>0,79</b>

\*Der erste Wert steht jeweils für die nPHB-Depolymeraseaktivität (1U = 1 µg native PHB Granula/min), dunkel hinterlegte Angaben bezeichnen die Aktivität gegen parakristalline dPHB-Granula (1U = 1 µg denaturierte PHB Granula/min) bzw. die zugehörigen Ausbeuten. Die Bestimmungen erfolgten durch Trübungstest (2.10.1.1, 2.10.1.2.).

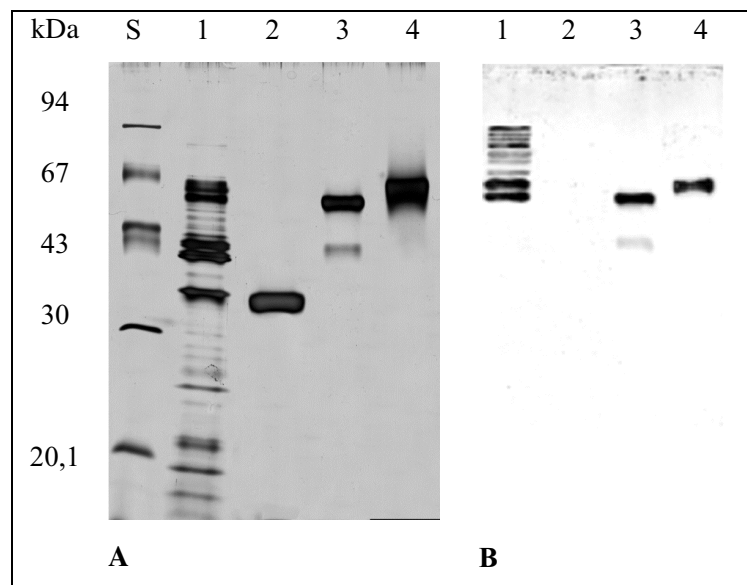
**Abb. 13:** Darstellung der Reinigungsschritte extrazellulärer PHAS<sub>CL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* im 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (Silberfärbung). Bei der sichtbaren Doppelbande handelt es sich offenbar um PhaZ7-Isoenzym (s. 3.5.).



### 3.3.4. Immunologische Abgrenzung der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 von den extrazellulären dPHB-Depolymerasen PhaZ2 und PhaZ5

Ausgehend von in Versuch 3.3 gereinigtem Protein wurden polyklonale Maus-Antikörper gegen die extrazelluläre dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ5 hergestellt (2.9.2.). Im Western-Blot (2.9.1.) wurden sowohl PhaZ5 als auch PhaZ2 durch die Antikörper markiert (Abb. 14 B), was die beschriebene Ähnlichkeit zwischen den beiden Proteinen auf Aminosäureebene (37 % Identität; JENDROSSEK et al., 1995b, BRIESE und JENDROSSEK, 1998) unterstrich. Mit PhaZ7 hingegen wurden selbst bei Einsatz von 6 µg Protein im Dot-Blot keine Kreuzreaktionen mit dem dPHB-Depolymerase-Antikörper beobachtet.

Die Beobachtung stützte die Annahme, daß es sich bei PhaZ7 möglicherweise um einen neuartigen bisher unbekanntem Typ einer PHA-Depolymerase handeln könnte, deren Primär- und Tertiärstruktur sich von anderen durch *P. lemoignei* gebildeten extrazellulären dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen grundlegend unterscheiden sollte.

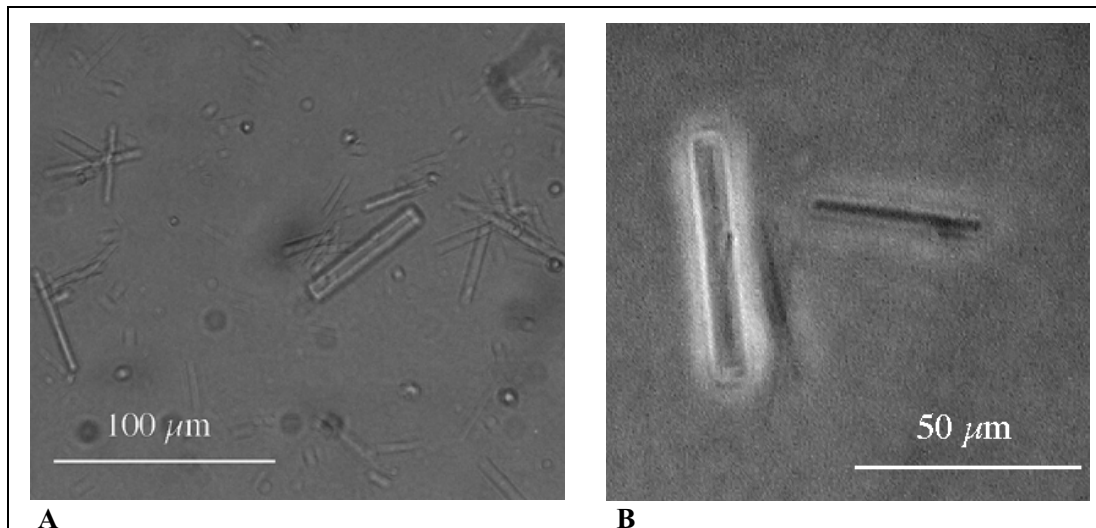


**Abb. 14:** Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel (A) und Western-Blot (anti-PhaZ5 Maus-Antikörper) extrazellulärer dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* (B). Aufgetragen wurden: LMW-Standard (S), konzentrierter Kulturüberstand von *P. lemoignei* nach Wachstum auf Natriumsuccinat (1), 1,9 µg gereinigte PhaZ7 nach Mono P (2), 1,4 µg dPHB-Depolymerase PhaZ5 (3) sowie 1,5 µg dPHB-Depolymerase PhaZ2 nach Reinigung an CM-CL6B (4). Die in Spur 4 zu erkennende Bande bei 40 kDa stellte ein bereits von BRIESE (1997) beschriebenes, während der Denaturierung bei 95°C entstandenes Abbauprodukt von PhaZ5 dar.

### 3.3.5. Gewinnung von Kristallen der nPHB-Depolymerase PhaZ7

Bereits während der Reinigung von PhaZ7 konnte bei Proteinkonzentrationen oberhalb 8 mg/ml unter bestimmten Bedingungen eine offenbar stark ausgeprägte Tendenz zur Aggregation und das vermehrte Auftreten eines makroskopisch sichtbaren flockenartigen weißen Niederschlages in alkalischen Puffern beobachtet werden. Durch eine insgesamt 38-stündige Diafiltration (2,5 ml/h) eines an Mono P gereinigten Probenpools über YM10-Membranen unter gleichmäßigem Rühren (60 Upm) bei 4°C entstanden die in Abb. 15 gezeigten säulchen- und nadelförmigen Kristalle. Die Mono P-Probe

(22 ml, 1,6 mg Protein/ml) wurde hierfür mit 8,7 ml 5 M NaCl (Endkonzentration 1,4 M) zur Abtrennung der Pharmalyte versetzt und auf 6 ml konzentriert. Anschließend wurden dreimal je 24 ml eines 25 mM 1,3-Diaminopropanpuffers (pH 9,5) zugegeben und der Ansatz auf 6 ml eingengt. Nach einer weiteren Zugabe von Puffer wurde die Probe in 12 Stunden auf ein Volumen von 4 ml konzentriert. Die Entstehung der Kristalle konnte anhand der auftretenden Eintrübung der Proteinlösung verfolgt werden. Eine weitere Konzentrierung wurde durch die zunehmende Dichte der entstandenen Suspension unmöglich.

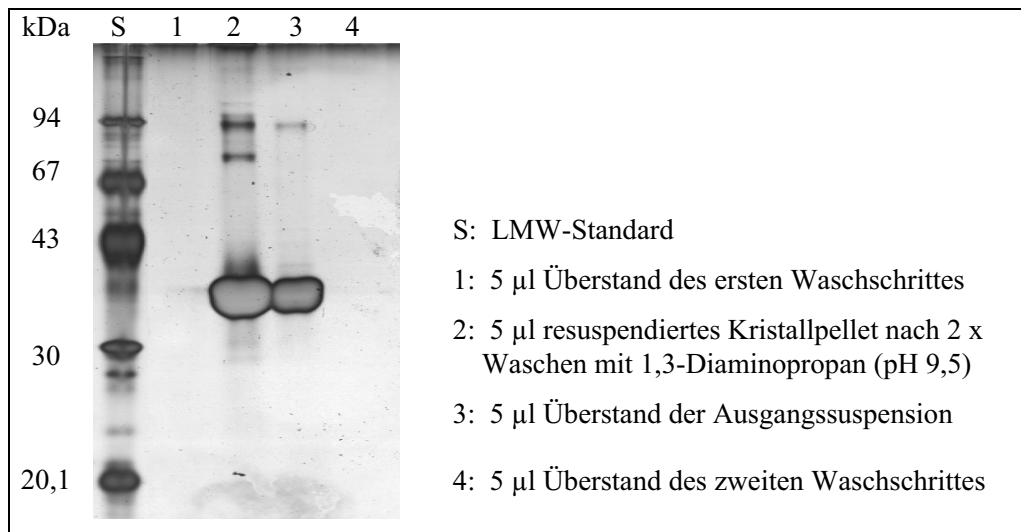


**Abb. 15:** Proteinkristalle von PhaZ7 im Phasenkontrastmikroskop (Primärvergrößerung **A:** 400fach; **B:** 1000fach).

Daß es sich bei den beobachteten säulenförmigen Kristallen mit bis zu 70 µm Länge und einem Durchmesser zwischen 1 und 10 µm tatsächlich um Proteinkristalle von PhaZ7 handelte, wurde in einem Waschexperiment nachgewiesen. 5 µl der Kristallsuspension wurden bei 6000 Upm (1 min, 4°C) abzentrifugiert und das Kristallpellet zweimal schonend mit 10 µl eiskaltem 1,3-Diaminopropanpuffer gewaschen und schließlich in 10 µl Puffer aufgenommen. Das resuspendierte Pellet als auch die Überstände der Zentrifugationsschritte wurden in der SDS-PAGE analysiert (Abb. 16). Sowohl im Überstand der Ausgangssuspension, als auch im resuspendierten Pellet wurde zweifelsfrei PhaZ7 nachgewiesen, wobei die Pelletprobe die stärkere Proteinbande zeigte.

Kleinere Kristalle der beschriebenen Form wurden auch in dem unter 3.3. beschriebenen Wachstumsversuch mit 3-Hydroxybutyrat als alleiniger Kohlenstoffquelle in der späten stationären Wachstumsphase und in Kulturen, welche für mindestens 60 Stunden mit höherer Na-Succinat-Konzentration (1,35 % w/v; wasserfrei) angezogen worden waren, beobachtet. Möglicherweise handelte es sich auch in diesen Fällen um Proteinkristalle. Die Kristallbildung in mit 3-Hydroxybutyrat gewachsenen Kulturen ging einher mit einer Verringerung der löslichen nPHB-Depolymerase Volumenaktivitäten im Kulturüberstand um über 30 % mit fortschreitender Inkubation.

Weiterführende Experimente zur Kristallisation und Tertiärstrukturanalyse von PhaZ7 wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Tassos Papageorgiou (Turku Centre for Biotechnology, Turku, FINLAND) initiiert.

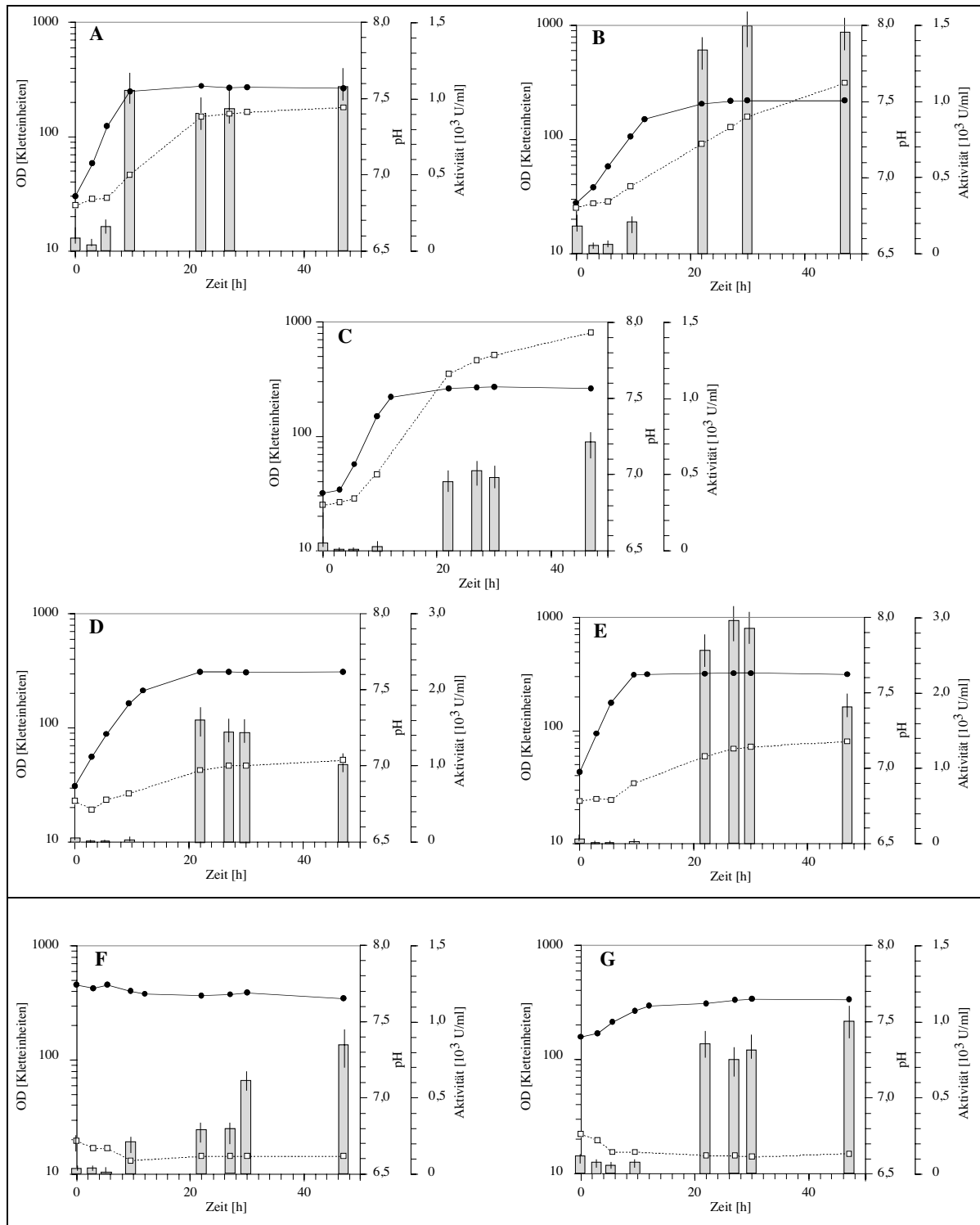


**Abb. 16:** 12 %-iges SDS-Polyacrylamidgel (Silberfärbung) der Fraktionen des Waschexperimentes mit Kristallen von PhaZ7 aus *P. lemoignei*.

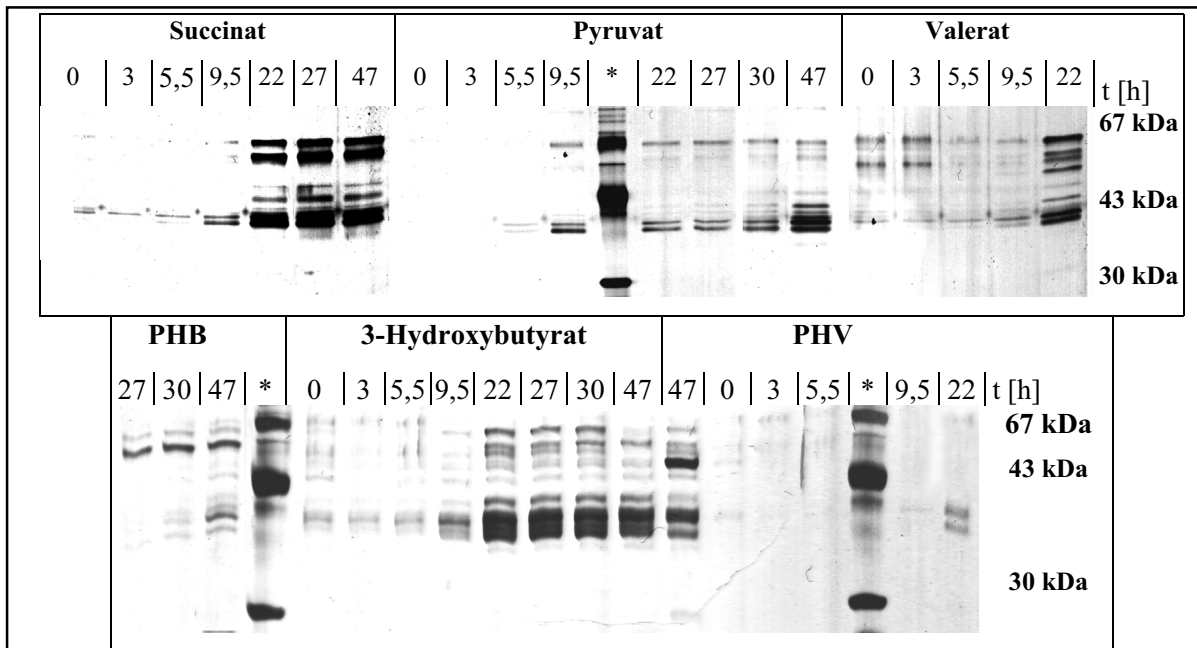
### 3.4. Bildung der nPHA<sub>SCL</sub> Depolymerase PhaZ7 bei Wachstum auf verschiedenen Substraten

Das für *P. lemoignei* beschriebene Spektrum verwertbarer Substrate ist auf wenige organische Säuren wie Acetat, Pyruvat, Succinat, Butyrat, 3-Hydroxybutyrat, Valerat sowie 3-Hydroxyvalerat (JENDROSSEK, 2001a) und PHA<sub>SCL</sub> in Form von Poly- und Copoly- oder Oligomeren von 3-Hydroxybutyrat sowie 3-Hydroxyvalerat (BRIESE et al., 1994b; SCHÖBER et al., 2000) begrenzt. Die bereits durchgeführte Kultivierung mit Succinat wies auf eine mögliche Regulation der Enzymsekretion in Abhängigkeit von der Substratverfügbarkeit, dem pH-Wert und der Wachstumsphase hin. Für eine genauere Untersuchung der Enzyymbildung wurden Wachstumsexperimente in Mineralmedium nach STINSON und MERRICK (2.2.1.) in Gegenwart der Natriumsalze organischer Mono- und Dikarbonsäuren sowie mit PHB oder PHV als jeweils einziger Kohlenstoff-Quelle durchgeführt. Die Zellen wurden nach 20-stündiger Aktivierung mit 0,4 % (w/v) Na-3-HB (10 ml Kultur) in einer zweiten Vorkultur (10 ml, jeweils mit 1 ml der ersten Vorkultur beimpft) mit 0,05 % (w/v) Na-3-HB und 0,3 % (w/v) der entsprechenden neuen Kohlenstoffquelle (im Falle der Polymere 0,15 %, w/v) an die Substrate der folgenden Hauptkulturen adaptiert, um die Effekte einer Umstellung des Stoffwechsels beim Start der Hauptkulturen gering zu halten. 100 ml der Hauptkultur [MM mit jeweils 0,3 % w/v Acetat, Pyruvat, 3-Hydroxybutyrat, 0,5 % w/v Succinat x 6 H<sub>2</sub>O oder 0,2 % w/v Valerat (Natriumsalze), bzw. 0,15 % w/v dPHB oder dPHV] wurden mit 2 ml Vorkultur beimpft. Mit Pyruvat, 3-Hydroxybutyrat und Valerat wuchsen die Zellen im

Gegensatz zu Acetat unter den beschriebenen Bedingungen sofort mit exponentieller Rate (Abb. 17). Durch den Verbrauch der Substrate kam es mit organischen Säuren beginnend nach etwa 4 Stunden zu einem Anstieg der pH-Werte im Kulturüberstand, wobei die Zunahmerate in allen Fällen außer für Succinat nach etwa 20 h signifikant sank. Die Generationszeit lag mit 3-HB (2,7 h) am niedrigsten, gefolgt von Pyruvat (3,1 h), Valerat (3,5 h), Acetat (4,2 h), Succinat (4,4 h). Mit PHB bzw. PHV blieb der pH-Wert im weiteren Verlauf nahezu unverändert. Da die Eigentrübung der Polymersuspensionen im Wachstumsverlauf aufgrund der Verwertung der PHA-Substrate ständig sank und den durch die Zunahme der Zellzahl bedingten Trübungsanstieg überdeckte, waren die zugehörigen Ergebnisse nur unter Vorbehalt interpretierbar. Nach 9 bis 10 h wurde in allen Kulturen der Übergang zur stationären Wachstumsphase beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt lagen die pH Werte im Bereich von 7,0. Auf allen C-Quellen konnte, beginnend in der frühen stationären Wachstumsphase (9,5 bis 22 h), ein signifikanter Anstieg der nPHB-Depolymeraseaktivität im Medium beobachtet werden. Auf PHB stieg die Aktivität mit fortschreitender Inkubationsdauer in der stationären Phase scheinbar nur allmählich an. Im Verlauf der Arbeit wurde für PhaZ7 festgestellt, daß das Enzym hohe Affinität zu dPHB besitzt (3.7.9.), so daß ein erheblicher Teil des gebildeten Enzyms in Polymer-gebundener Form vorlag und erst nach dPHB-Hydrolyse durch dPHAS<sub>CL</sub>-Depolymerasen (z. B. PhaZ2, PhaZ5) im Kulturmedium nachweisbar war. In den zugehörigen SDS-Gelen korrelierte der Anstieg der Volumenaktivität mit einer Zunahme der 36 kDa Bande für PhaZ7 (Abb. 18). In allen Fällen konnten ebenfalls Proteinbanden nachgewiesen werden, welche mit der dPHB-Depolymeraseaktivität korrelierten und bei denen es sich offenbar um PhaZ5 und PhaZ2 handelte. Lediglich bei Wachstum auf 3-Hydroxybutyrat und Pyruvat dominierte PhaZ7 offenbar das Proteinmuster sekretierter Proteine. Die spezifischen nPHB-Depolymeraseaktivitäten erreichten in der stationären Phase maximal  $2,3 \cdot 10^4$  U/mg (PHB, PHV),  $3,3 \cdot 10^4$  U/mg (Acetat),  $4 \cdot 10^4$  (Succinat) sowie  $5 \cdot 10^4$  U/mg Protein (Valerat, Pyruvat) und  $5,8 \cdot 10^4$  U/mg mit 3-Hydroxybutyrat.



**Abb. 17:** Wachstum (OD, ●) pH-Verlauf (□) und Sekretion von nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymeraseaktivität (graue Säulen) durch *P. lemoignei* auf 0,3 % (w/v) Pyruvat (A), 0,5 % (w/v) Succinat x 6 H<sub>2</sub>O (B), 0,3 % (w/v) Acetat (C), 0,2 % (w/v) Valerat (D), 0,3 % (w/v) 3-Hydroxybutyrat (E), 0,15 % (w/v) dPHB (F) sowie 0,15 % (w/v) dPHV (G). Die Bestimmung der Volumenaktivitäten des Kulturüberstandes erfolgte im Trübungstest (2.10.1.2.).



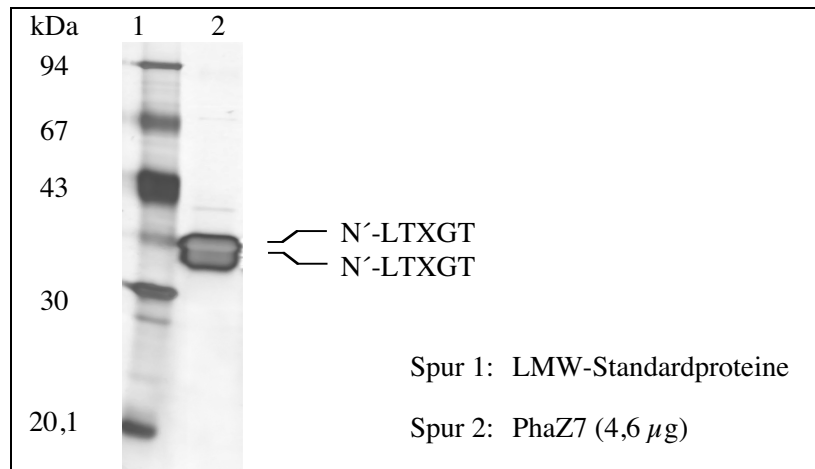
**Abb. 18:** Expression von PhaZ7 und Proteinmuster der Kulturüberstände von *P. lemoignei* bei Wachstum mit angegebenen Kohlenstoffquellen nach angegebener Kulturdauer. Es wurden je 6 µl zellfreier Kulturüberstand auf ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. \* LMW-Proteinstandard.

### 3.5. Der N-Terminus der reifen (extrazellulären) nPHA-Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei*

Um eine Klonierung des Strukturgenes der nPHA Depolymerase (PhaZ7) durchführen zu können, sollte eine Southern-Hybridisierung von restriktionsverdauter Gesamt-DNA aus *P. lemoignei* mit einer spezifischen Nukleotidsonde erfolgen. Es gelang, ausgehend von etwa 200 µg Protein nach Immobilisierung auf einer PVDF-Membran, in 35 N-terminalen Abbauschritten mit Ausnahme der Positionen 3, 11, 33 und 34 insgesamt 31 Aminosäuren zu identifizieren. Die erhaltene Aminosäuresequenz ist in Tab. 13 dargestellt.

Interessanterweise traten in SDS-Gelen von Proteinfraktionen mit über 99 % Reinheit nach Mono P immer wieder Doppelbanden auf (Abb. 19). Der Anteil der beobachteten Banden erschien nicht äquimolar zu sein. SCHIRMER (1994) hatte bereits für die PHO-Depolymerase aus *Pseudomonas fluorescense* GK13 das Vorkommen zweier Proteinspecies mit jeweils um eine Aminosäure am N-Terminus divergierender Sequenz beschrieben. Zum Nachweis der Homogenität der gereinigten nPHA Depolymerase (PhaZ7) aus *P. lemoignei* wurde deshalb eine im 12 % SDS Gel (2.8.1.) getrennte Doppelbande mittels Western-Blot auf PVDF immobilisiert (2.9.1.) und mit Coomassie nach 2.8.4. gefärbt. Die am weitesten entfernten Bereiche beider Proteinbanden wurden mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten und separat dem Edman-Abbau unterzogen. In fünf Abbauzyklen konnte eine identische Abfolge von Aminosäuren nachgewiesen werden (Abb. 19). Demnach kann das unterschiedliche Laufverhalten nicht wie im Falle von SCHIRMER (1994) durch Unterschiede im N-Terminus infolge variabler Prozessierung erklärt werden. Möglicherweise konnte PhaZ7 zwei

unterschiedliche Konformationen einnehmen, deren Laufverhalten im Gel voneinander abwich, oder es handelte sich um Isoformen des Enzyms (s. 4.).



**Abb. 19:** Doppelbande einer gereinigten Fraktion von PhaZ7 im 12 % SDS Gel nach Silberfärbung (s. 2.8.3.). Die N-terminale Sequenzierung erfolgte ausgehend von auf PVDF immobilisiertem Protein.

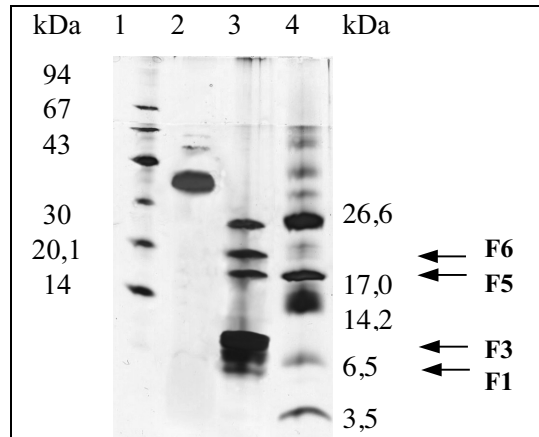
### 3.6. Gewinnung interner Peptide und Analyse der Fragmente

Da aus der Aminosäuresequenz des N-Terminus der gereinigten nPHA Depolymerase aus *P. lemoignei* aufgrund der Häufigkeit von Aminosäuren mit starker Degeneration des genetischen Codes (4 oder bei Serin und Leucin 6 mögliche Codons) nur stark degenerierte Nukleotisonen abgeleitet werden konnten, wurden interne Peptide hergestellt, gereinigt und sequenziert.

#### 3.6.1. Chemische Spaltung mit Bromcyan

Eine Möglichkeit zur Herstellung interner Peptide bestand in der Spaltung mittels Bromcyan. Es wurde nach dem unter 2.15.4. detailliert beschriebenen Protokoll verfahren. Die erhaltenen Peptidfragmente wurden durch Tricin-SDS-PAGE (2.8.2.) getrennt und nach Immobilisierung auf PVDF-Membranen N-terminal sequenziert. Abgeleitet aus der im weiteren Verlaufe der Arbeit erhaltenen Aminosäuresequenz (s. 3.8.6.2., Abb. 51) wären, ausgehend von 7 Methioninresten für das reife Protein, bei vollständiger Spaltung 8 Peptidfragmente zu erwarten (5,7; 8,6; 0,4; 9,0; 0,4; 6,9; 3,0 und 2,3 kDa). Eine Trennung der Fragmente unter 0,5 kDa im verwendeten System war nicht möglich. Im Gel traten neben Banden bei 5,7; 6,9 kDa und einer dominanten Doppelbande bei 8,6 kDa weitere Fragmente der Größen 18, 23 und 26 kDa auf (Abb. 20), welche nachfolgend mit F1, F2 etc. bezeichnet werden. Obwohl unter Stickstoff gearbeitet wurde, muß von einer unvollständigen Peptidspaltung ausgegangen werden. Der beobachtete, für die chemische Spaltung mittels Bromcyan typische Effekt beruht auf der Oxidierbarkeit der Methioninreste (SCOTT, 1988; SCHROEDER et al., 1969). Es wurden vier Peptide ansequenziert (F1, F3, F5, F6). Die Banden F1 und F6 bei 5,7 bzw. 23 kDa entsprachen dem zuvor bestimmten N-Terminus von PhaZ7. Das 18 kDa Peptid (F5) sowie die Bande bei 8,6 kDa (F3) wurden ebenfalls ansequenziert. Die Aminosäureabfolge des unvollständig gespaltenen 18 kDa Peptides (F5) fand sich als Nebensequenz vollständig in der für das 8,6 kDa

Fragment ermittelten Doppelsequenz wieder. Unter Berücksichtigung der Größen der nächstbenachbarten Peptide lag offenbar eine Kontamination von F3 mit dem theoretisch zu erwartenden 8,9 kDa Fragment vor. Die ermittelten Aminosäuresequenzen der Peptide sind in Tab. 13 zusammengefasst.



**Abb. 20:** Chemische Spaltung der nPHA Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei* mit Bromcyan. Die Fragmente wurden durch 12 stündige Behandlung mit Bromcyan nach 2.15.4. generiert und nach Auftrennung im Tricine-SDS-Gel (s. 2.8.2.) einer Silberfärbung unterzogen. Spur 1: LMW-Proteinstandard; Spur 2: PhaZ7 nach Elektroelution aus einem präparativen SDS-Gel ohne Bromcyanzusatz.(2,7 µg); Spur 3: Peptide nach Behandlung mit Bromcyan (2,7 µg); Spur 4: UMW-Proteinstandard.

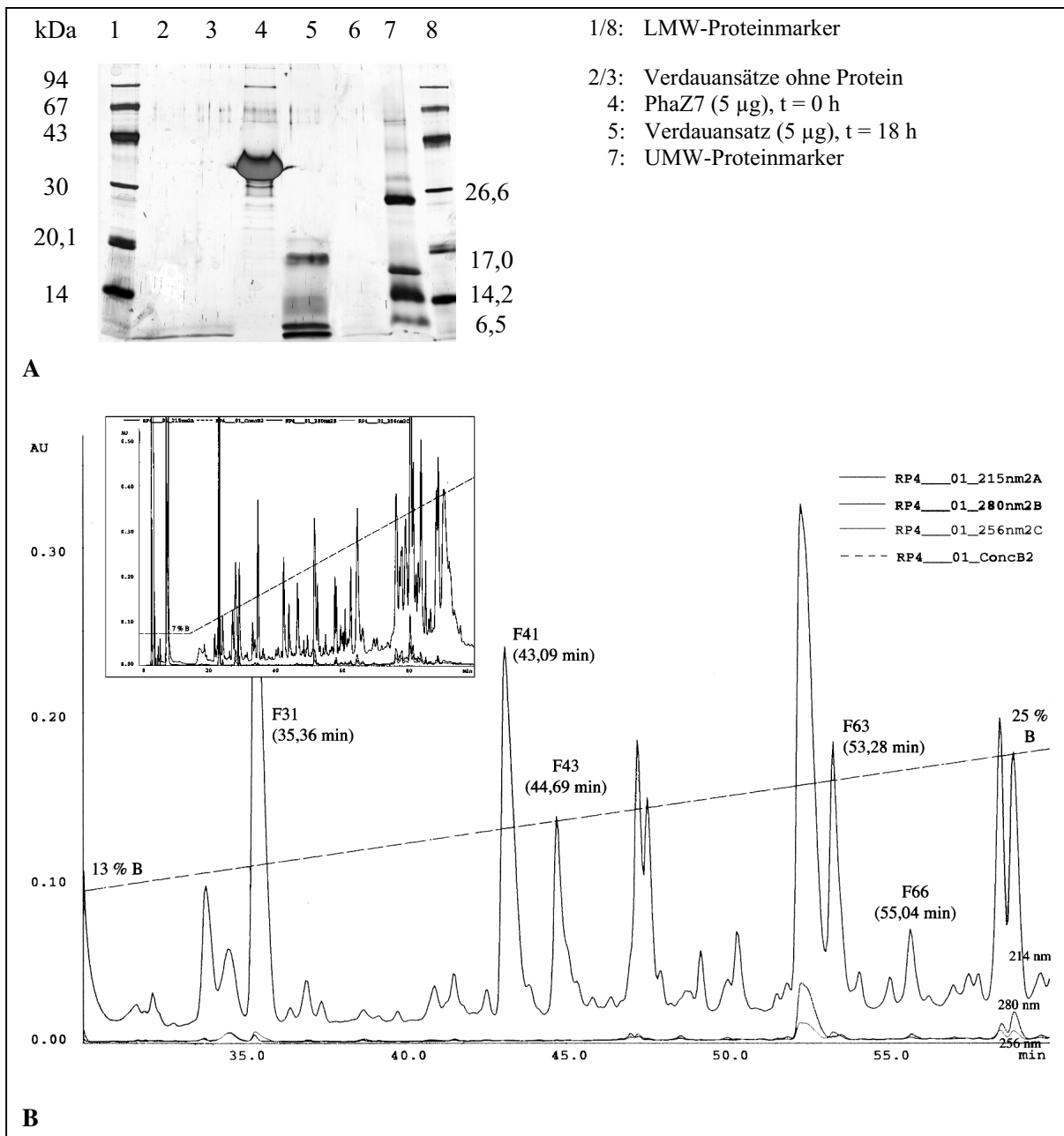
### 3.6.2. Proteolytische Spaltung der nPHA Depolymerase aus *P. lemoignei*

Parallel zur chemischen Spaltung (3.6.1.) wurde ein Verdau des nativen Enzyms mit Trypsin nach 2.15.1. durchgeführt. Trypsin spaltet Proteine C-terminal von Arginin und Lysin, was aufgrund der Häufigkeit beider Aminosäuren die Entstehung relativ kurzer Peptide zur Folge hatte. Der Verdau führte nach 18 h reproduzierbar zu dem in Abb. 21 A (Spur 5) gezeigten Muster mit dominierenden Banden unterhalb 6 kDa. Zur Gewinnung einzelner Peptide für eine Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurde das Peptidgemisch mittels Reverse-Phase-HPLC (s. 2.6.10.) aufgetrennt. Von den im vorderen Bereich des Gradienten eluierten Peaks (Abb. 21 B) wurden F31, F41, F43, F63 sowie F66 nach einer Überprüfung der Reinheit und Größenbestimmung mittels MALDI-TOF-MS (2.6.12.) für den anschließenden Edman-Abbau eingesetzt (s. Tab. 13) und erfolgreich sequenziert.

Aufgrund der durch MALDI-TOF-MS gewonnen Informationen zur Masse der Peptide war es unter Berücksichtigung einer Massenungenauigkeit von 5 Dalton möglich die in der Edman-Sequenzierung nicht eindeutig bestimmten Aminosäuren vorherzusagen. Im Falle von Fragment 41 handelte es sich bei den nach der Sequenzierung nicht eindeutigen Positionen 6 und 7 [Isoleucin (130 Da) oder Lysin (145 Da)] offensichtlich um zwei aufeinanderfolgende Isoleucinreste. Die theoretische Masse lag unter Annahme von Isoleucin mit 972 Dalton nur ein Dalton unter dem experimentell ermittelten Wert [973 = (974 (Wert im Positiv-Modus) – 1)] wohingegen alle anderen Kombinationen der beiden möglichen Aminosäuren mindestens um 15 Dalton vom empirischen Wert abwichen. Im Falle von Lysin an den fraglichen Positionen wären zusätzliche potentielle Schnittstellen für Trypsin vorhanden. Fragment 43



unterschied sich von Fragment 41 durch zwei zusätzliche N-terminale Aminosäuren, das Peptid war offenbar unvollständig gespalten. Die Identität von Position 2 konnte hier nicht durch eine Kombination mit den Molekularmassen verschiedener Aminosäuren ermittelt werden. Wie in der später aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz erkennbar, handelte es sich um ein Lysin. Dieser Befund wurde durch Fragment 41 gestützt, welches bei vollständiger tryptischer Spaltung am N-Terminus unmittelbar an ein Arginin oder Lysin anschließen sollte.



**Abb. 21:** Verdau der nativen nPHA-Depolymerase PhaZ7 aus *Paucimonas lemoignei* mit Trypsin.

(A) Bandenmuster von PhaZ7 nach tryptischem Verdau und Auftrennung im 16 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (Silberfärbung).

(B) Trennung tryptischer Peptide von PhaZ7 an Reverse-Phase C18 Hypersil ODS (25 µl Probe mit 125 µg Protein). Puffer A bestand aus 0,1 % (v/v) TFA in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Nach einem 15 minütigen isokratischen Schritt bei 7 % (v/v) Puffer B [0,085 % (v/v) TFA in Acetonitril] erfolgte die Elution durch einen linearen Gradienten auf 50 % B in 105 min bei einer Flußrate von 0,1 ml/min. Das Gesamtchromatogramm ist im Fenster dargestellt. Gezeigt sind Absorption (214, 256, 280 nm) und Gradientenverlauf (unterbrochene Linie). Mit Fraktionsnummer und Retentionszeit gekennzeichnete Peaks wurden im Edman-Abbau analysiert.

Fragment F63 entsprach dem N-Terminus des reifen Proteins. Wie in der zuvor ermittelten N-terminalen Sequenz von reifer PhaZ7 waren jedoch Aminosäure 3 und 10 durch Edman-Abbau nicht zuzuordnen. Wurden diese Positionen jeweils mit Cystein besetzt ergab sich für das Peptidfragment eine theoretische Molekülmasse von 1228 Dalton. Dies entsprach exakt dem in der Massenspektrometrie bestimmten Wert (1229-1). Bei Fragment 31 handelte es sich um ein vollständig gespaltenes Peptid, dessen theoretische Masse mit den massenspektrometrischen Daten übereinstimmte. Aufgrund der um mindestens 143 Dalton geringeren theoretischen Molekülmasse gegenüber der durch MALDI-MS ermittelten Peptidmasse von Fragment 66 unter Annahme von Tryptophan an Position 2 bei gleichzeitigem Fehlen des für den tryptischen Verdau typischen Arginin oder Lysin am Ende der erhaltenen Sequenzdaten wurde von einem vorzeitigen Abbruch der Sequenzierreaktion ausgegangen. Eine gezielte Datenbanksuche ermöglichte die Zuordnung zu einem durch Autoproteolyse entstandenen Trypsinfragment einer theoretischen Masse von 1152 Dalton mit Serin an Position 2 und zusätzlichem Leucin und Lysin am C-Terminus.

**Tab. 13:** Im Edman-Abbau bestimmter N-Terminus von PhaZ7 sowie Sequenzen interner Peptide nach Verdau mit Trypsin oder chemischer Spaltung mit Bromcyan.

Fragment	Aminosäuresequenz	$M_w$ [Dalton] (*experimentell)
<b>N-Terminus des reifen Proteins</b>	LT (X) GTNSGFV (X) <u>KGTQTQYAGGFAPGVGYGGFGXXS</u>	-
<b>Bromcyanspaltung</b>		
F1	LT (X) GT	-
F3 Hauptsequenz	[ M] P ( <b>P</b> /V) GNVSGYGTPA	-
Nebensequenz	[ M] S ( <b>L</b> /V) ATLQYYNN	-
F5	[ M] P (P/V) GN ( <b>V</b> /L) SGYGTPARS	-
F6	LT (X) GT	-
<b>Trypsinverdau</b>		
F31	FASTTSNVK	954
F41	<u>TNTGA (I/K) (I/K) QR</u>	974
F43	T (X) TNTGA (I/K) (I/K) QR	1247
F63	LT (X) <u>GTNSGFV (X) K</u>	1229
F66**	S (X) <u>GTSYPDV**</u>	1154

\*MALDI-MS/ Polarität: (+); \*\*Trypsin zugeordnetes Fragment; Aminosäuresequenzen, die zur Ableitung von degenerierten Oligonukleotidprimern verwendet wurden, sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Nicht eindeutig bestimmte Aminosäuren sind durch (X) oder die Schreibweise in runden Klammern markiert. Kursivgedruckte Aminosäuren in eckigen Klammern stellen postulierte Methioninreste der Bromcyanspaltung dar.

Mit Hilfe der erhaltenen Aminosäuresequenzen sollte das *phaZ7*-Strukturgen durch Gewinnung spezifischer Sonden mittels PCR zugänglich sein (s. 3.8.). Der molekularbiologischen Beschreibung des *phaZ7*-Gens ist eine eingehende biochemische Charakterisierung des Proteins vorangestellt.

### **3.7. Biochemische Charakterisierung der nPHB Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei***

#### **3.7.1. Bestimmung der Molekularmassen von PhaZ7**

##### **3.7.1.1. Molekularmasse unter reduzierenden Bedingungen**

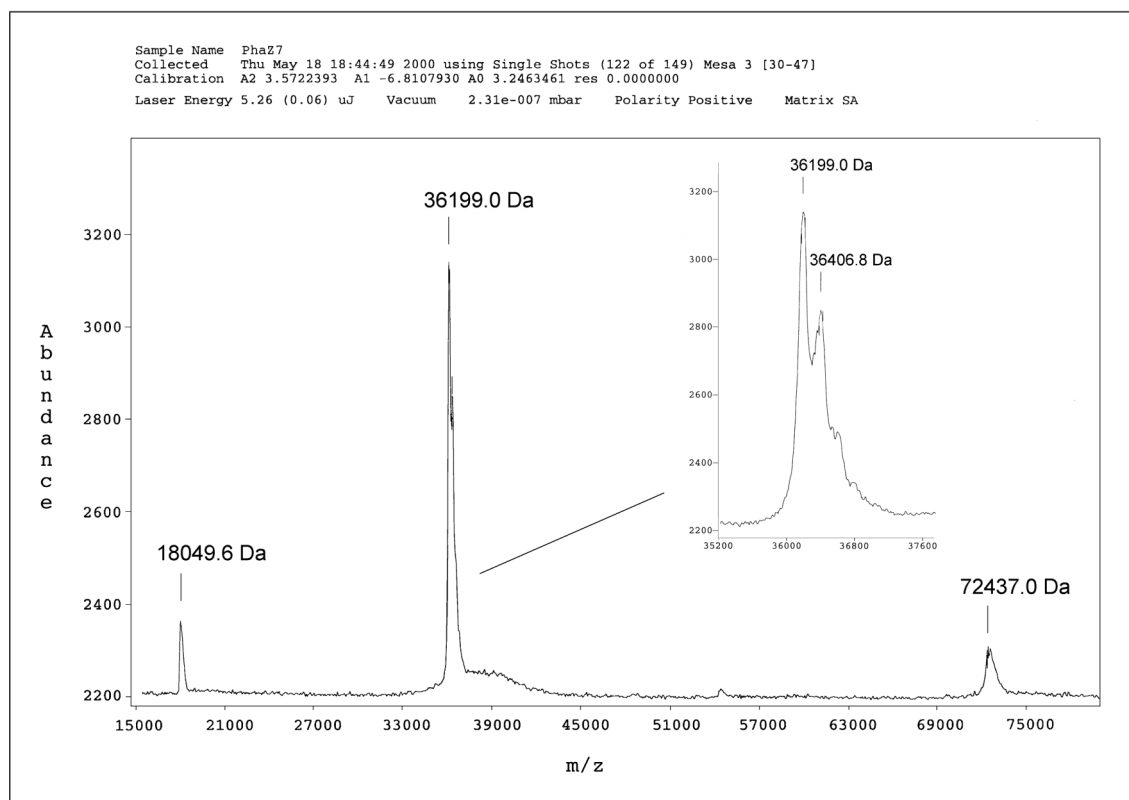
Wie aus Abb. 13 (3.3.3.) ersichtlich, wies die extrazelluläre nPHA Depolymerase PhaZ7 nach Denaturierung mit Mercaptoethanol im 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel ein apparentes Molekulargewicht von  $36 \pm 2$  kDa bei einem  $R_f$ -Wert von 0,5 auf. Im Falle des Auftretens einer Doppelbande (3.3.5., Abb. 19) wurde für die untere Bande ein  $R_f = 0,53$  bestimmt, was einem apparenten Molekulargewicht von 34 kDa entsprach.

##### **3.7.1.2. Bestimmung der apparenten Molekularmasse von PhaZ7 durch Gelpermeationschromatographie**

Zur Ermittlung der apparenten Molekularmasse des nativen Proteins wurde eine Gelfiltration mit Superdex™ 75 PC 3.2/30 (Matrix: Dextran, 12 % quervernetzte Agarose) durchgeführt. Die verwendete Säule besaß ein mit Blue Dextran (2000 kDa) bestimmtes Totvolumen von 1,94 ml. In einem ersten Experiment wurden 20 µl Probe (6,2 µg Protein) in 25 mM Tris-HCl, pH 7,4, in Gegenwart von 150 mM NaCl auf die Säule aufgetragen. Auftretende Peaks wurden gesammelt und im turbidimetrischen Test nach 2.10.1.2. auf Aktivität getestet. Unter den gewählten Bedingungen konnte keine Aktivität von der Säule eluiert werden. Um mögliche Wechselwirkungen zwischen Protein und Säulenmatrix zu minimieren, wurde die Salzkonzentration auf 500 mM erhöht, was jedoch nicht zum Erfolg führte. Erst mit einer deutlichen Erhöhung des pH-Wertes auf 11,5 (25 mM 1,3-Diaminopropan) wurde in Gegenwart von 0,5 M NaCl PhaZ7 als homogener Peak von der Säule eluiert. Die Retention in einem anschließend durchgeführten Versuch mit 25 mM 1,3-Diaminopropan (pH 11,5), 1 M NaCl erfolgte jedoch auch unter diesen Bedingungen zu einem deutlich späteren Zeitpunkt als die des kleinsten eingesetzten Eichmoleküls Vitamin B12 (1,357 kDa). Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration sowie der Zusatz von Glycerol zum Elutionspuffer führte zu keiner signifikanten Verkürzung der Retentionszeit. Es kam trotz stark alkalischen pH und hoher Salzkonzentration zu Wechselwirkungen mit der als schwachem Kationentauscher wirkenden Säulenmatrix. Offenbar waren neben ionischen noch weitere Wechselwirkungen am Retentionsshift beteiligt. Das Phänomen schien für die Gruppe der PHA-Depolymerasen charakteristisch. Bereits bei Untersuchungen der dPHO-Depolymerase aus *P. fluorescens* GK13 (SCHIRMER, 1991) und der dPHB-Depolymerasen PhaZ5, PhaZ2 sowie PHV-Depolymerase aus *P. lemoignei* (MÜLLER, 1992; SCHÖBER, 1997) wurden ähnliche Phänomene beschrieben, wobei die Matrixbindung im Falle von PHV-Depolymerase (54 kDa) zu einem scheinbaren nativen Molekulargewicht von  $< 10$  kDa führte. Für eine Molekularmassenbestimmung der nativen nPHAS<sub>CL</sub>-Depolymerase PhaZ7 war die Gelpermeationschromatographie daher nicht geeignet.

### 3.7.1.3. Bestimmung der Molekularmasse von PhaZ7 durch MALDI-TOF-MS

Da die Molekularmasse der nPHA<sub>SCL</sub> Depolymerase PhaZ7 aus den unter 3.7.1.2. beschriebenen Experimenten mittels Gelpermeationschromatographie nicht ermittelt werden konnte, und weil für andere extrazelluläre dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* eine deutliche Abweichung der apparenten Molekularmassen unter reduzierenden Bedingungen und der zugehörigen nativen Molekulargewichte infolge Glycosylierung zu beobachten war (BRIESE et al., 1994b; SCHÖBER et al., 2000; JENDROSSEK, 2001b), wurde eine Größenbestimmung des Proteins und eventueller Untereinheiten mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie nach 2.6.12. durchgeführt. Die externe Kalibrierung erfolgte mit Carbonic Anhydrase B (28980 Da). Das MALDI-Massenspektrum der gereinigten nPHA Depolymerase (Abb. 22) zeigte ein charakteristisches Peakmuster.



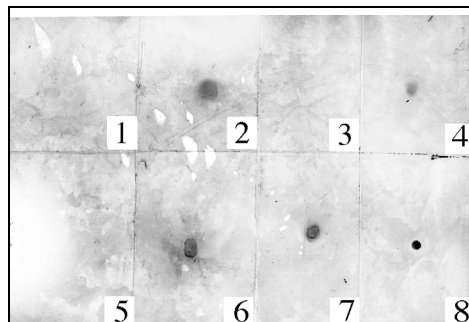
**Abb. 22:** MALDI-TOF-Massenspektrum der extrazellulären nPHB Depolymerase PhaZ7 (Matrix Sinapinsäure; s. 2.6.12.).

Neben einem Hauptpeak bei  $m/z = 36199 \pm 45$ , welcher dem einfach geladenen Protein ( $[M+H]^+$ ) entsprach, traten zwei Peaks geringerer Signalintensitäten auf. Im Rahmen der Messgenauigkeiten handelte es sich hierbei offenbar um das doppelt geladene Monomer ( $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  18049,6) sowie das Signal des einfach geladenen Dimeres ( $[2M+H]^+$ ,  $m/z$  72437). Der für Proteinspektren typische Dimerpeak war in Abhängigkeit von der eingesetzten Laserenergie unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei genauerer Analyse des dominierenden Peaks schienen Mikroheterogenitäten in Form weiterer Peaks bei  $m/z = 36406,8$  bzw.  $36614,6$  aufzutreten, deren Intensitäten maximal zwei bzw. ein Drittel des Hauptsignals erreichten. Die Substitution der zur Kokristallisation verwendeten Matrix Sinapinsäure durch 2,5-Dihydroxybenzoesäure ergab innerhalb der beobachteten Mikroheterogenität des signalintensivsten Peaks deutlich verringerte relative Abstände der Einzelpeaks (146,8 Da). Es

handelte es sich offenbar um Addukte aus Protein und Matrixmolekülen. Der Masse des einfach geladenen Monomers ( $m/z = 36199 \pm 45$ ;  $[M+H]^+$ ) zeigte gute Übereinstimmung mit der apparenten Molekularmasse von  $36 \pm 2$  kDa in der SDS-PAGE

#### 3.7.1.4. Glycosylierungstests

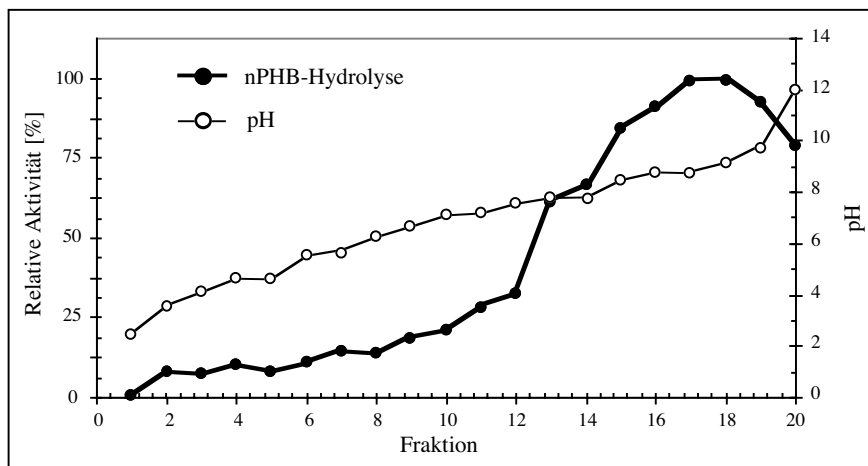
Bei allen bisher beschriebenen extrazellulären dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* handelte es sich um Glykoproteine (JENDROSSEK et al., 1995b; SCHÖBER et al., 2000; JENDROSSEK, 2001b). Um zu prüfen, ob auch PhaZ7 einen Kohlenhydratanteil enthält, wurde ein immunologischer Glycosylierungsnachweis nach 2.9.4. durchgeführt. Wie aus Abb. 23 ersichtlich, konnte die Glykoproteinnatur der dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen (PhaZ2, PhaZ5) sowie der Positivkontrolle Transferrin bestätigt werden. PhaZ7 verhielt sich jedoch ebenso wie die als Negativkontrolle eingesetzte Creatinase und die nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZRr aus *R. rubrum* negativ. Es handelt sich bei PhaZ7 im Gegensatz zu anderen von *P. lemoignei* sekretierten PHA-Depolymerasen offenbar nicht um ein glykosyliertes Protein. Das Fehlen einer Glykosylierung bei PhaZ7 stand in Einklang mit dem später beobachteten identischen Molekulargewicht des heterologen Proteins sowie der, im Verlauf der Arbeit aus der Gensequenz abgeleiteten, theoretischen Größe des reifen Wildtyp-Proteins (s. 3.8.7.). Auch ein Vergleich der aus der Sequenz abgeleiteten Proteingrößen mit dem MALDI-TOF-Massenspektrum (36,2 kDa) sowie das Fehlen eines für Glykosylierungen typischen Peakmusters in der MALDI-TOF-MS unterstützten das erhaltene Ergebnis.



**Abb. 23:** Nachweis von Glykosylresten mittels DIG-Glycan Detection Kit. Spur 1: PhaZ7 (nach Mono P, 5  $\mu$ g), 2: PhaZ5 (nach CM, 5,1  $\mu$ g); 3: Creatinase (1  $\mu$ g); 4: Transferrin (1  $\mu$ g); 5: nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* (PhaZRr ; 2,5  $\mu$ g nach Mono S); 6: PhaZ2 (nach Mono P, 5  $\mu$ g); 7 und 8: PhaZ2 (nach CM, 5  $\mu$ g).

#### 3.7.2. Isoelektrischer Punkt

Die isoelektrische Fokussierung in einer trägerfreien Fokussierkammer (2.6.8.) ergab für PhaZ7 einen experimentellen isoelektrischen Punkt von  $pH 9 \pm 0,7$  (Abb. 24). Das Ergebnis stimmte mit dem während der Chromatofokussierung an Mono P beobachteten Bindeverhalten, und der Retention bei pH-Werten zwischen 8,8 und 9,25 überein.



**Abb. 24:** Bestimmung des pI der nPHB-Depolymerase PhaZ7 durch Flüssigfokussierung in einer 18 ml Rotofor®-Kammer. Es wurden 25  $\mu$ l (126  $\mu$ g) an Mono P gereinigtes Enzym in 18 ml  $H_2O_{\text{bidest.}}$  mit 1 % (v/v) Ampholyt, pH-Bereich 3-10, für 3 h fokussiert und anschließend die Aktivität im Trübungstest (2.10.1.2.) ermittelt.

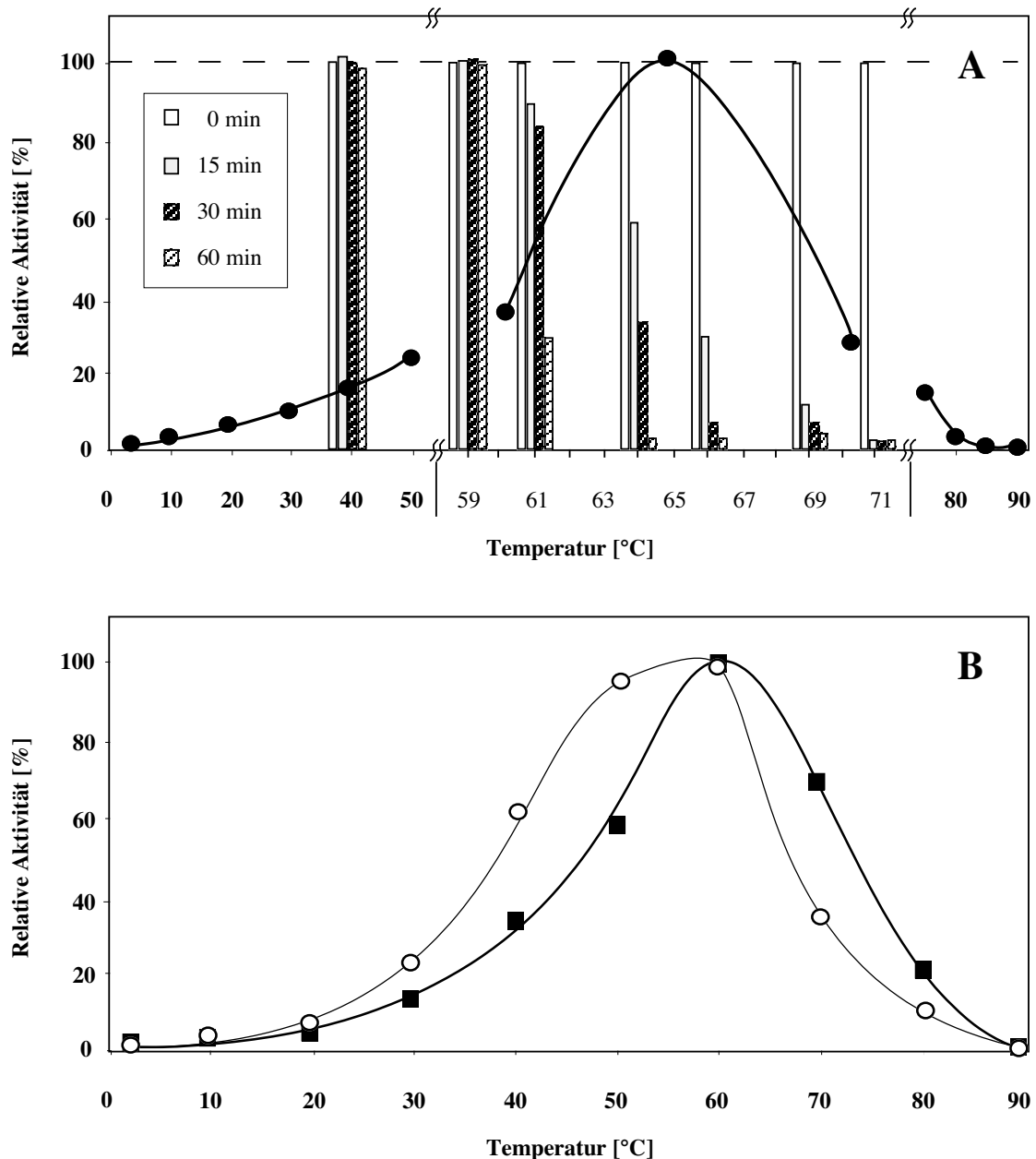
### 3.7.3. Temperaturstabilität der gereinigten nPHA-Depolymerase PhaZ7 und Temperaturoptimum der nPHA-Hydrolyse

Die nPHAS<sub>CL</sub>-Hydrolyse durch PhaZ7 erwies sich in hohem Maße temperaturabhängig. Untersuchungen zur Hydrolyse von nPHB im turbidimetrischen Test (2.10.1.2.) ergaben ein Temperaturoptimum der Depolymerasereaktion von 65°C (Abb. 25). Während die Aktivität im Bereich zwischen 4°C (keine signifikante Polymerhydrolyse) bis 60°C kontinuierlich anstieg, kam es mit nativen PHB-Granula aus *R. eutropha* H16 bei Erhöhung der Temperatur von 60 auf 65°C zu einer drastischeren Aktivitätszunahme, welche jedoch von einer zunehmend rascheren Inaktivierung des Enzyms begleitet wurde. Bei Temperaturen oberhalb 75°C war kaum noch signifikante enzymatische Hydrolyse nachweisbar (Abb. 25 A). Jedoch bedurfte es einer 30-minütigen Behandlung bei 100°C, um eine 100%-ige Inaktivierung zu erreichen. Der Einsatz artifizierender Na-Cholat-stabilisierter amorpher PHB-Granula als Substrat ergab einen ähnlich temperaturabhängigen Aktivitätsverlauf, jedoch wurde wie auch für artifizierliche PHV-Granula ein geringfügig niedrigeres Temperaturoptimum bei 60°C bestimmt. Die Hydrolyse von PHV erreichte bereits bei 50°C über 90 % der bei Optimaltemperatur gemessenen Hydrolyserate.

PhaZ7 besaß bei 66°C in 1,3-Diaminopropanpuffer (pH 9,0) eine Halbwertszeit von 11,4 min. Bei niedrigeren Temperaturen erwies sich die nPHA-Depolymerase hingegen in Abhängigkeit vom verwendeten Puffer bemerkenswert stabil. So lag die Halbwertszeit in 1,3-Diaminopropan (pH 10,5) bei Raumtemperatur (23°C) bei 9 Tagen, in Tris/HCl (pH 7,5) bei 52 h und selbst in wässriger Lösung konnten noch eine Halbwertszeit von 34 Stunden gemessen werden. Diese Werte unterschieden sich nur geringfügig von Halbwertszeiten des bei 4°C gelagerten Proteins.

Da PhaZ7 bei optimaler Reaktionstemperatur bereits instabil war, die Reaktion bei physiologischen Temperaturen jedoch mit deutlich geringerer Geschwindigkeit ablief, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit Aktivitätsmessungen routinemäßig bei 40°C durchgeführt. Die beobachtete hohe Stabilität bei Raumtemperatur und im alkalischen Milieu dürfte möglicherweise auch unter physiologischen

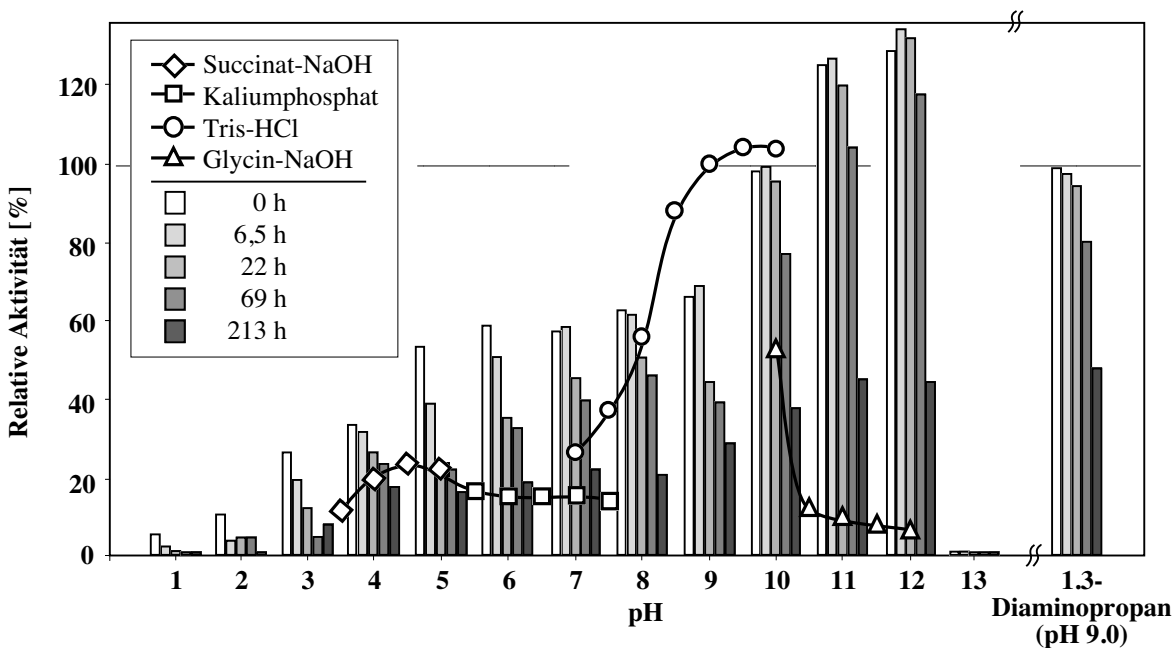
Bedingungen von Bedeutung sein und konnte für andere extrazelluläre PHA Depolymerasen aus *P. lemoignei* (PhaZ2, PhaZ5) ebenfalls beobachtet werden. Eine Reihe von extrazellulären dPHA<sub>SCL</sub>- und dPHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen zeigen hinsichtlich des Temperaturoptimums ein qualitativ ähnliches Verhalten (JENDROSSEK, 2001c; SCHIRMER, 1994). Die beschriebenen Aktivitätsmaxima lagen jedoch unterhalb der für PhaZ7 ermittelten Werte.



**Abb. 25:** Temperaturoptimum der Hydrolyse (A) nativer PHB-Granula aus *R. eutropha* H16 (●), sowie (B) artifizierlicher amorpher PHB- (■) und PHV-Granula (○) durch PhaZ7 und Stabilität des Enzyms bei angegebenen Temperaturen in 25 mM 1,3-Diaminopropan-Puffer, pH 9,0 (A, Säulendiagramme). Die Hydrolyserate in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur wurde in temperierten 1 ml Küvetten nach 2.10.1.1. bestimmt und die erhaltenen Aktivitäten zur jeweils bestimmten maximale Rate (Temperaturoptimum) der Meßreihe korreliert. Die verwendeten artifizierlichen PHA-Granula wurden mit Na-Cholat als Stabilisator nach 2.13. hergestellt. Zu den in A) gegebenen Zeiten wurden je 10 µl der Stabilitätstestansätze entnommen und ein Aktivitätstest mit 5 µl Probe als Doppelbestimmung im Mikrotiterplattenmaßstab nach 2.10.1.2. durchgeführt. Um Adsorptionseffekte des verdünnten Proteins (5 µg/ml) während der Inkubation zu vermindern, wurden alle Stabilitätstestproben in 200 µl PCR-Reagiergefäßen (Biozym, Hessisch Oldendorf) in einem Gradiententhmoblock bei der gewünschten Testtemperatur inkubiert.

### 3.7.4. Einfluß des pH-Wertes auf die nPHB Depolymeraseaktivität und die Stabilität von PhaZ7

Während der Reinigung von PhaZ7 durch Chromatofocussierung an Mono P (s. 3.3.2.) sowie in den vorangegangenen Versuchen zur Bestimmung von Temperaturstabilität und optimaler PHA-Hydrolysetemperatur wurde bereits die hohe Stabilität des Enzyms in alkalischen Puffern deutlich. Wie die Mehrheit der beschriebenen extrazellulären dPHB-Depolymerasen (JENDROSSEK, 2001c) war auch PhaZ7 im sauren Milieu nur schwach aktiv. Das Optimum der nPHB-Hydrolyse durch das Enzym lag bei pH 9,5-10,0 im Tris-HCl-System (Abb. 26).



**Abb. 26:** nPHB-Hydrolyseaktivität von PhaZ7 (offene Symbole) in Succinat-NaOH (pH 3,5-5,0), Kaliumphosphatpuffer (pH 5,0-7,5), Tris-HCl (pH 7,0-10,0) sowie Glycin-NaOH (pH 10,0-12,0) und Stabilität des Enzyms in Abhängigkeit von Art und pH des Puffers (Säulendiagramm).

Zur Bestimmung des pH Optimums wurde nPHB-Granulasuspension im entsprechenden 100 mM Puffer 5 min bei 40°C vorinkubiert und die Reaktion nach Zugabe von 14,7 ng Enzym ( $10^{-3}$  verdünnt in  $H_2O$ ) durch Messung der Trübungsabnahme (s. 2.10.1.2.) verfolgt. Mitgeführte Kontrollen dienen der Erfassung der Autohydrolyserate der Granula bei entsprechendem pH.

Die pH-Stabilität (Säulendiagramme) wurde nach  $10^{-3}$  Verdünnung des in 25 mM 1,3-Diaminopropan (pH 9,0) gelagerten Enzyms im gewünschten Puffer und sich anschließende Inkubation bei 4°C untersucht. Zu den angegebenen Zeiten wurden je 5  $\mu$ l Probe entnommen und die verbliebene nPHB-Depolymeraseaktivität in 250 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1 mM  $CaCl_2$  bei 40°C bestimmt (s. 2.10.1.2.). Um Effekte der Probenpuffer auf das Testsystem auszuschließen, wurden Kontrollen nur mit 5  $\mu$ l Puffer ohne PhaZ7 durchgeführt. Als Stabilitätstestpuffer dienen: 130 mM HCl, 45 mM KCl, (pH 1,0); 84 mM Zitronensäure, 2,25 mM HCl, 12,5 mM NaCl (pH 2,0); 40,3 mM Zitronensäure, 20,6 mM NaOH, 59 mM NaCl, (pH 3,0); 46 mM Zitronensäure, 54 mM NaCl, 68 mM NaOH (pH 4,0); 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 5,0-7,0); 100 mM Tris-HCl (pH 7,0-9,0) sowie 100 mM Glycin-NaOH (pH 10,0-13,0).

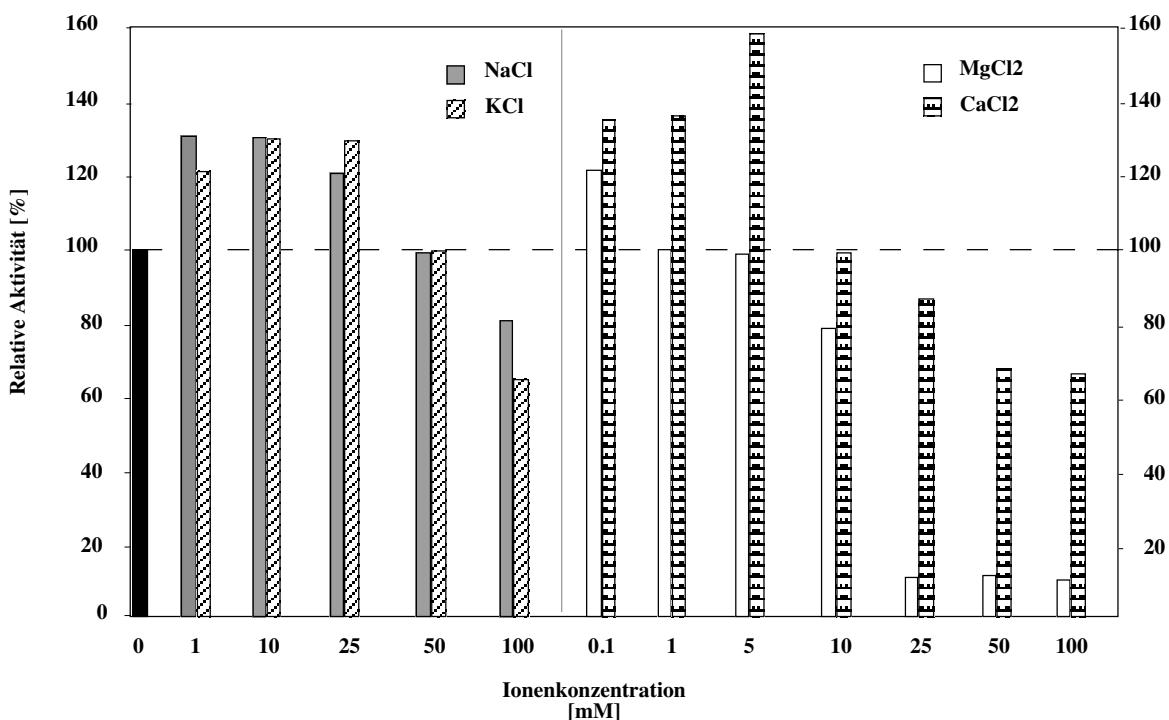
Die Aktivität war in diesem Bereich abhängig von der Art des eingesetzten Reaktionspuffers. So wurde für pH 10,0 bei Verwendung von Glycin-NaOH anstelle von Tris-HCl eine um 52 % geringere hydrolytische Aktivität gemessen. Die Stabilität von PhaZ7 in diesem Puffersystem war jedoch bemerkenswert und eine Lagerung in Glycin-NaOH führte bis pH 12,0 offenbar zu einer höheren Aktivität im nachfolgenden turbidimetrischen Test (Tris-HCl, pH 9,0). Die Kontrollen ohne PhaZ7



ließen weder eine signifikante Zunahme der Autohydrolyserate noch der chemischen Hydrolyse nativer PHB-Granula erkennen, was eine Wirkung des Lagerungspuffers auf die spätere Aktivität des Enzyms bestätigte. Auch im hier als Referenz eingesetzten 1,3-Diaminopropanpuffer zeigte PhaZ7 hohe Stabilität (s. 3.7.4.). Das Enzym war im pH-Bereich von 7,0 bis 12,0 mindestens 6,5 Stunden stabil. Lag der pH unter 7,0, so kam es zu einer partiellen Inaktivierung. Bereits die unmittelbar nach dem Verdünnen des Proteins in sauren Puffern beobachteten Aktivitäten lagen mit abnehmendem pH zunehmend unterhalb der Referenzwerte. Bei pH 1,0 bzw. 13,0 wurde das Enzym vollständig inaktiviert. Es handelte sich im Falle von PhaZ7 offenbar um ein optimal an seine mögliche Funktion als extrazelluläre Depolymerase angepaßtes Enzym.

### 3.7.5. Einfluß von Ionen auf die PHA-Depolymerisation durch PhaZ7

PhaZ7 zeigte eine Abhängigkeit der nPHB-Depolymeraseaktivität von der Gegenwart ein- und zweiwertiger Kationen (Abb. 27).  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  führten in niedriger Konzentration zwischen 1 und 25 mM zu einem Anstieg der Hydrolyseraten um 15 bis 32 %. Überschritt die Konzentration dieser Ionen im Testpuffer 50 mM, kam es mit steigender Konzentration zur Verringerung der hydrolytischen Aktivität mit nPHB. Einen etwas stärkeren Einfluß auf die Hydrolyserate hatte offenbar die Gegenwart von 0,1 bis 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . Die Aktivität erhöhte sich bereits bei Zugabe von 0,1 mM signifikant. Mit 5 mM  $\text{CaCl}_2$  stieg die enzymatische nPHB-Hydrolyserate auf 151 % der Referenz ohne Ionenzusätze. Sowohl mit  $\text{CaCl}_2$  als auch in Gegenwart von  $\text{MgCl}_2$  kam es bei Überschreiten von etwa 10 mM Endkonzentration jedoch zu Ausfällungen im Testansatz.

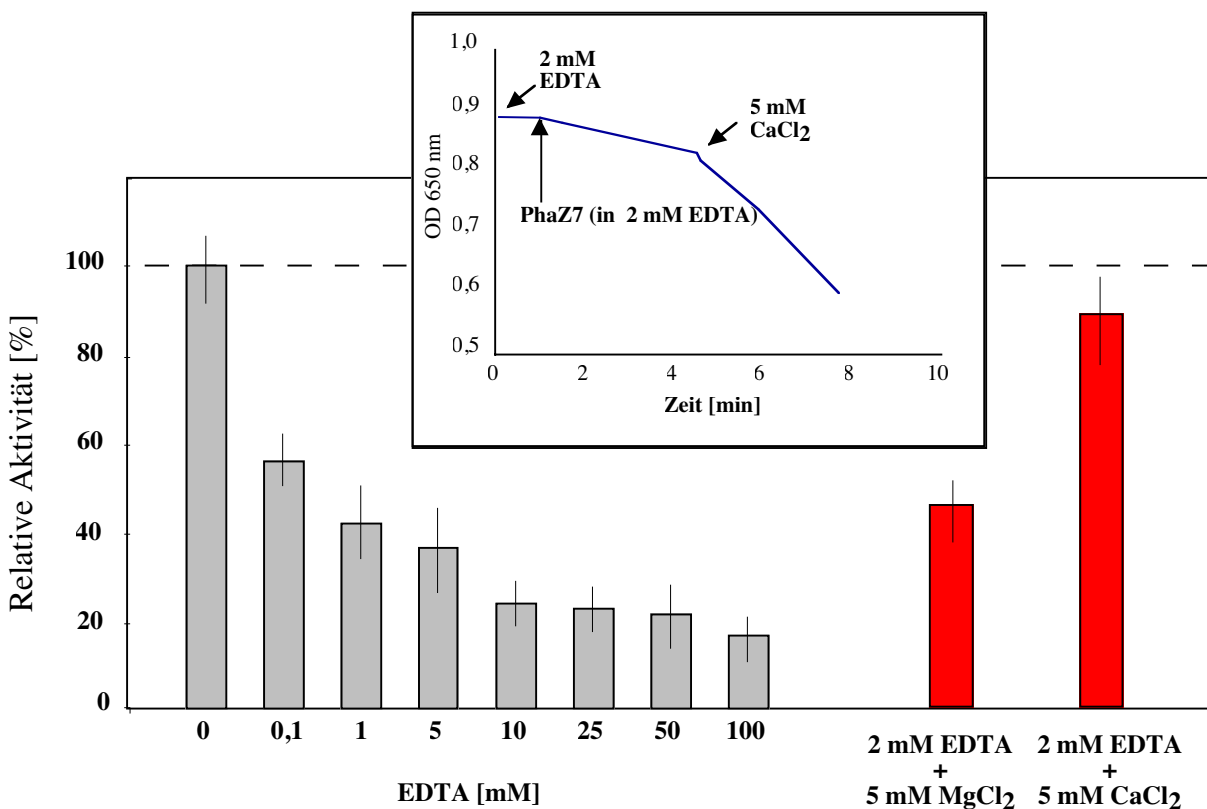


**Abb. 27:** Einfluß der Konzentration ein und zweiwertiger Kationen auf die nPHB-Hydrolyseaktivität von PhaZ7. Die photometrischen Tests wurden nach 2.10.1.1. durchgeführt. Als Referenz (100 %) dienten Kontrollansätze in 50 mM Tris-HCl, pH 9,0.

Routineaktivitätstests erfolgten aufgrund der Ergebnisse in Gegenwart von 1 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Interessanterweise zeigte die dPHB-Depolymerase PhaZ5 wie bereits von anderen Autoren beobachtet (BRIESE, 1994, JENDROSSEK, 2001b) eine weitaus striktere Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ . Signifikanter Abbau von dPHB konnte erst nach Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  zum Testansatz nachgewiesen werden. Der Abbau von dPHB durch PhaZ2 hingegen erfolgte ähnlich wie bei PhaZ7 bereits in Puffern ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Supplementation und ein Zusatz von divalenten Kationen hatte nur einen vergleichsweise geringen Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit.

Um den Einfluß insbesondere von  $\text{CaCl}_2$  auf das Enzym genauer zu charakterisieren, wurden Hemmversuche mit Komplexbildnern durchgeführt. Wie aus Abb. 28 ersichtlich, kam es mit zunehmender EDTA-Konzentration im Testansatz zu einer deutlichen Verminderung der Aktivität. Bereits ab 1 mM EDTA sank die nPHB-Hydrolyserate um > 50 %. Dieser Hemmeffekt erwies sich nach Zugabe eines Überschusses an  $\text{CaCl}_2$  reversibel. Magnesiumionen konnten offenbar die Wirkung von  $\text{Ca}^{2+}$  nicht substituieren.



**Abb. 28:** Hemmung der nPHB-Depolymerase PhaZ7 durch EDTA sowie Reaktivierung durch zweiwertige Ionen. Die Aktivitäten wurden nach 2.10.1.2. im turbidimetrischen Test in 50 mM Tris-HCl (pH 9,0) ohne Ionen als Referenz bestimmt. Der dargestellte Trübungstest zeigt exemplarisch den Verlauf eines Reaktivierungsexperimentes. In diesem Falle wurden dem Reaktionspuffer zu Beginn 2 mM EDTA zugesetzt und der Ansatz 1,5 min bei 40°C vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 µl einer in 2 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  inkubierten Probe von PhaZ7. Zur Reaktivierung wurden nach 4,5 min 5 mM Kalziumchlorid zugefügt, so daß die Endkonzentration theoretisch verfügbaren Kalziums 3 mM betrug.

### 3.7.6. Untersuchungen zur Substratspezifität von PhaZ7

Für die meisten der in der Literatur beschriebenen PHA-Depolymerasen war eine ausgeprägte Spezifität gegenüber den Kettenlängen der im Polymer vorkommenden Monomereinheiten charakteristisch. Sie zeichneten sich dadurch aus, entweder PHA<sub>SCL</sub> (C3 bis C5) oder PHA<sub>MCL</sub> (C6-C14) hydrolysieren zu können. Die gereinigte nPHB-Depolymerase PhaZ7 zeigte ein offenbar strikt auf amorphe PHA<sub>SCL</sub> begrenztes Substratspektrum. So wurden native PHB-Granula aus *R. eutropha*, *B. megaterium* mit vergleichbarer maximaler Rate umgesetzt (Tab. 14). Nur 35 % niedriger lag die spezifische Aktivität mit nPHV aus *Chromobacterium violaceum*. Die absoluten Werte für die gleiche Granulaart divergierten in Abhängigkeit von den verwendeten Granulapräparationen um bis zu 16 % (Titration) bzw. um bis zu > 20 % im Trübungstest, was auf Unterschiede in der Granulabeschaffenheit und -größe und damit verbunden auf die verfügbare Substratoberfläche zurückzuführen war. Aus diesem Grunde wurde für die Enzymcharakterisierung in einer Meßreihe nach Möglichkeit Material ein und derselben Granulapräparation verwendet. Um Effekte der, an native biochemisch intakte PHA-Granula gebundenen, intrazellulären Depolymerase im Falle von nPHB aus *R. eutropha* H16 zu minimieren, deren pH Optimum bei 7,0 lag (HANDRICK et al., 2000), wurde bei pH Werten von 9,0 gearbeitet und Kontrollen zur Autohydrolyse der Granula mitgeführt. Unter diesen Bedingungen lag die Rate der Autohydrolyse mit 0,017 µmol/min pro mg nPHB im Test nach 2.10.1.5. (Titristat) nicht signifikant über den geringen beobachteten Raten der chemischen Hydrolyse des Polyesters. Die Verwendung von nPHB aus rekombinanten *E. coli* HMS174 (*phaCAB* mit und ohne Phasinproteinen: *phaP*), welche die Gene des PHB-Operons aus *R. eutropha* trugen, jedoch keine intrazelluläre PHB-Depolymerase besaßen, bestätigte die Spezifität von PhaZ7 für nPHB. Der PHB-Donororganismus und die An- oder Abwesenheit von Phasinproteinen schienen die prinzipielle Abbaubarkeit von nPHB<sub>SCL</sub> kaum zu beeinflussen. Die nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase erwies sich hingegen vollkommen inaktiv mit nPHO-Granula aus *P. oleovorans* (Sowohl ohne als auch, zum Schutz vor Autohydrolyse, mit 1% (w/v) SDS isoliert).

Um einen Einfluß der Oberflächenstruktur nativer nPHA<sub>SCL</sub>-Granula als Voraussetzung einer Hydrolysierbarkeit ausschließen zu können, wurden ausgehend von in Lösungsmittel gelöstem PHB oder PHV sogenannte artifizielle Polymergranula hergestellt (2.13.). In diesen wurden PHA in ihrer amorphen Form von einer Detergenzschicht umhüllt und der amorphe, dem des Polymers in nativen Granula ähnliche Zustand stabilisiert. Mit SDS oder Natriumcholat präparierte PHB- oder PHV-Granula-Latices wurden von PhaZ7 ebenfalls abgebaut, wohingegen Latices aus PHO oder P(3HD-co-3HO) kein verwertbares Substrat darstellten. Wurde zur Herstellung der artifiziellen PHB- oder PHV-Granula CTAB als Detergenz verwendet, so konnte keine signifikante Hydrolyse nachgewiesen werden. Eine positive Oberflächenladung hemmte offenbar die Aktivität des Enzyms, wohingegen die negative Ladung durch SDS oder Natriumcholat dem natürlichen Zustand eines biochemisch intakten von strukturellen Phasinproteinen und polaren Phospholipiden umgebenen nPHA-Granulum offenbar besser entsprach.

Der Trübungsverlust der anfangs milchigen Granulasuspensionen ging in allen Fällen einer Aktivität von PhaZ7 einher mit einer durch Titration nachgewiesenen Freisetzung von Säuregruppen infolge der Spaltung der Esterbindungen.

Eine Behandlung nativer Granula mit Proteasen (Trypsin) und anschließender Inaktivierung der Protease mittels Ovomucoïd (Trypsin-Inhibitor, MERRICK et al., 1965) erhöhte die Säurefreisetzung durch PhaZ7 von 9300 U/mg auf bis zu 12200 U/mg Protein, was die Bedeutung der Oberflächenstruktur der PHA-Granula hinsichtlich der Zugänglichkeit des Polymersubstrates unterstrich. Interessanterweise konnten auf diese Art behandelte nPHB-Granula auch von der bisher als klassischer Vertreter der dPHB-Depolymerasen eingeordneten extrazellulären Depolymerase PhaZ5 hydrolysiert werden, sobald die Ansätze  $\text{CaCl}_2$  (1 mM) enthielten. Die Aktivität lag um 125 % über der Säurefreisetzung aus vergleichbaren Mengen dPHB. nPHB-Granula mit intakter Oberflächenstruktur hingegen erwies sich als vollkommen inert gegenüber PhaZ5. dPHB-Depolymerase PhaZ2 zeigte überraschenderweise mit nPHB aus *E. coli* nahezu die gleiche spezifische Aktivität wie mit dPHB (350 U/mg versus 370 U/mg) unabhängig von der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration. Selbst bei Verwendung von PhaZ2 aus rekombinanten *E. coli* war eine im Vergleich zu PhaZ7 geringe jedoch signifikante Aktivität von 90 U/mg (titrimetrischer Test, s. 2.10.1.5.) nachweisbar.

Um zu untersuchen, ob niedermolekulares, mit Polyphosphat und  $\text{CaCl}_2$  stabilisiertes sogenanntes „channel“ cPHB (DAS et al., 1997) und Protein assoziiertes PHB, welches offenbar in allen Organismen in geringer Konzentration vorkommt (REUSCH und GRUHN, 1997), durch PhaZ7 hydrolysiert werden kann, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. R. REUSCH (Department of Microbiology and Public Health, Michigan State University, USA) entsprechende Abbauprobe durchgeführt. Es konnte keine PhaZ7-abhängige Hydrolyse der genannten Polymerformen festgestellt werden (R. REUSCH, pers. Mitteilung).

Wurde nach 2.2.3. gewonnene parakristalline dPHA als Substrat eingesetzt, konnte weder mit dPHB oder dPHV bzw. dPHO noch mit den Copolymeren d(3-HB-co-HV) oder dP(3HD-co-HO) (Copolymer aus 3-Hydroxyoctanoat und 3-Hydroxydecanoat) eine Hydrolyse nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob es sich um Polymerfilme oder Suspensionen handelte. PhaZ2 und PhaZ5 hingegen zeigten signifikante Säurefreisetzung aus dem parakristallinen Polymer. Die Werte lagen jedoch nur bei etwa 25 % der Raten, welche für diese Enzyme bei Protease-behandelten nPHB-Granula beobachtet wurden.

Um sicherzustellen, daß es sich bei diesem Enzym um eine echte PHA-Depolymerase handelte, wurden im Ausschlußverfahren weitere Substrate getestet. Die im folgenden beschriebenen Tests wurden bei pH 7,5 als auch bei pH 9,0, dem für PhaZ7 bestimmten pH-Optimum (3.7.4.) ausgeführt:

(I) Mit Suspensionen aus Polycaprolacton [Poly(6-hydroxyhexansäure)] (s. 2.2.4.), welche von den Kontroll-Lipasen (Schweineleber, CalB *Candida antarctica*) jedoch nicht von *P. aeruginosa* Lipase oder Esterasen (*Streptomyces diastatochromogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, KHALAMEYZER und BORNSCHEUER, 1999; KREBSFÄNGER et al., 1998) hydrolysiert wurden, konnte keine Polycaprolactonase-Aktivität für PhaZ7 nachgewiesen werden.

**Tab. 14:** Substratspezifitäten der extrazellulären dPHA<sub>SCL</sub> and nPHA<sub>SCL</sub> Depolymerasen aus *P. lemoignei*.

	Hydrolytische Aktivität		
	dPHB- Depolymerase PhaZ2	dPHB- Depolymerase PhaZ5	nPHB- Depolymerase PhaZ7
<b>nPHA-Granula isoliert aus:</b>			
<i>R. eutropha</i> H16	350 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	9300 <sup>a)</sup> / 26100 <sup>b)</sup>
<i>E. coli</i> ( <i>phaCAB+phaP</i> )	350 <sup>a)</sup> / 90 <sup>a)</sup> *	< 0,01 <sup>a)</sup>	9800 <sup>a)</sup> / 21400 <sup>b)</sup>
<i>E. coli</i> ( <i>phaCAB</i> )	110 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	2650 <sup>a)</sup> / 8100 <sup>b)</sup>
<i>B. megaterium</i>	n. b.	< 0,01 <sup>a)</sup>	++ / (19900 <sup>b)</sup> )
<b>nPHA-Granula nach Trypsin- /Ovomucoidbehandlung</b>			
<i>R. eutropha</i> H16	1150 <sup>a)</sup>	2130 <sup>a)</sup>	12200 <sup>a)</sup>
<i>E. coli</i> ( <i>phaCAB+phaP</i> )	1010 <sup>a)</sup>	1800 <sup>a)</sup>	10300 <sup>a)</sup>
<b>n-PHV-Granula:</b>			
<i>C. violaceum</i>	9 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	++
<b>n-PHO-Granula:</b>			
<i>P. oleovorans</i> ±1 % (w/v) SDS	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
<b>ataktisches PHB</b> [Poly( <i>R</i> -, <i>S</i> -3-HB)]	< 3 <sup>c)</sup>	< 3 <sup>c)</sup>	25 <sup>c)</sup> /20 <sup>a)</sup>
<b>denaturierte P[<i>R</i>-HA] (isotaktisch, parakristallin)</b>			
dPHB	370 <sup>a)</sup>	530 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
dPHV	9 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
dPHO; dP[HO- <i>co</i> -HD] <sup>f)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
<b>artifizielle (amorphe) PHA</b>			
PHB stabilisiert mit SDS oder Natriumcholat	+	+	5680 <sup>a)</sup> (Na-Cholat) 5200 <sup>a)</sup> (SDS)
PHV stabilisiert mit SDS oder Natriumcholat	+	-	1360 <sup>a)</sup> (Na-Cholat) 1190 <sup>a)</sup> (SDS)
PHO-; dP[HO- <i>co</i> -HD] <sup>f)</sup> -Latex	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
PHB, PHV stabilisiert mit CTAB	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,8 <sup>a)</sup>
<b>weitere Hydrolase-Substrate:</b>			
Polycaprolacton	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
Triolein, Tributyrin, Olivenöl	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
polare und unpolare Lipide aus Eigelb, <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
Sphingolipide	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
Casein und N- $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin- nitranilid	-	-	-
Gurken-Kutin	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
<i>p</i> -Nitrophenylacylester <sup>d)</sup> :			
<i>p</i> -NP-Acetat	n.b.	0,58 <sup>e)</sup>	0,019 <sup>g)</sup>
<i>p</i> -NP-Butyrat	n.b.	0,50 <sup>e)</sup>	0,048 <sup>g)</sup>
<i>p</i> -NP-Hexanoat ( <i>p</i> -NP-Caproat)	n.b.	0,05 <sup>e)</sup>	0,18 <sup>g)</sup>
<i>p</i> -NP-Octanoat ( <i>p</i> -NP-Caprylat)	n.b.	< 0,001	0,38 <sup>g)</sup>
<i>p</i> -NP-Decanoat	n.b.	< 0,001	0,12 <sup>g)</sup>
<i>p</i> -NP-Hexadecanoat ( <i>p</i> -NP-Palmitat)	n.b.	< 0,001	0,055 <sup>g)</sup>

Legende Tab.14 (vorangehende Seite):

\* rekombinantes Enzym

a) Titritatmethode (2.10.1.5.);

$$1 \text{ U mg}^{-1} = 1 \text{ } \mu\text{mol Säure min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$$

b) Trübungstest (2.10.1.2.);

$$1 \text{ U mg}^{-1} = 1 \text{ } \mu\text{g PHB min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$$

c) Massenverlust definierter aPHB-Filme

$$[\text{mg cm}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}]$$

d) Optischer Test nach 2.10.3.;

$$[\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}]$$

e) MÜLLER et al., 1992

f) Copolymer aus 3-Hydroxyoctansäure und 3-Hydroxydecansäure

g) Test ohne Detergentien

-/+ /++ Trübungstest und qualitativer Nachweis der Säurefreisetzung durch Orange I-Test (2.10.1.4.); n.b. nicht bestimmt

(II) PhaZ7 war nicht in der Lage, die Triglyceride Tributyrin und Triolein als typische Esterase- und Lipasesubstrate zu hydrolysieren. Auf entsprechende Testagarplatten aufgebracht Enzym führte auch nach 72 h Inkubation zu keiner Hofbildung, während in Gegenwart von 2,5  $\mu\text{g}$  der Kontroll-Lipasen oder Esterasen bereits nach 10 min bei 366 nm deutlich fluoreszierende Aufklarungszonen entstanden. Die im Plattentest mit Rhodamin B nach 2.10.4. erhaltenen Ergebnisse wurden durch Titritatversuche (2.10.1.5.) bestätigt, wobei auch ein Verzicht auf die Gegenwart von Lösungsvermittlern (Natriumcholat oder Gummi arabicum) keinen Einfluß auf die für PhaZ7 negativen Resultate hatte. Olivenöl konnte von PhaZ7 offenbar ebenfalls nicht gespalten werden. Die Qualität der Testbedingungen wurde durch den Einsatz von Lipase aus Schweineleber, CalB aus *C. antarctica* sowie Esterasen (*S. diastatochromogenes*, *P. fluorescens*) sichergestellt.

(III) Serinproteasesubstrate wie Casein (Plattentest und Suspensionstest nach 2.10.5.; Positivkontrollen: Proteinase K, E und Trypsin) und N- $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin-4-nitrilid (BAPNA; Trypsin verursachte intensive Gelbfärbung) ergaben keine Anhaltspunkte für eine proteolytische Aktivität von PhaZ7.

(IV) Das Enzym zeigte auch keine Amidase-/Nitrilase-Aktivität gegen aliphatische oder aromatische Nitrile (Valeronitril, Benzonnitril, 2-Phenylpropionitril) (2.10.9.).

(V) PhaZ7 zeigte keine Amylaseaktivität auf Stärke-Testagar (2.10.8.) während die zur Kontrolle eingesetzte  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* innerhalb von 20 min zu nachweisbaren Hydrolysehöfen führte.

(VI) Tests mit chromosomaler DNA aus *E. coli* sowie 16S rRNA ergaben im Vergleich zu DNase I und RNase A keine signifikante Nukleaseaktivität.

(VII) Das erstmals aus Gartenerde/Kompost, als natürlichem Habitat isolierte und durch seine Ausstattung mit ungewöhnlichen vielen extrazellulären PHA-Depolymerasen auffallende Bakterium *P. lemoignei* (DELAFIELD et al., 1965a) wurde unlängst aufgrund von 16S rRNA-Analysen einer taxonomischen Reklassifikation unterzogen und als Vertreter einer neuen Gattung *Paucimonas* in unmittelbarer Verwandtschaft zu *Herbaspirillum* eingeordnet (JENDROSSEK, 2001a). Aufgrund des potentiellen Substratspektrums am natürlichen Standort sollte untersucht werden, ob natürliche Wachse, wie sie z. B. in der Kutikula von Pflanzenblättern vorhanden sind, als Substrate in Frage kamen. Hierfür wurde Gurken-Kutin (BONNEN und HAMMERSCHMIDT, 1989; DEISING et al., 1992) in Gegenwart von PhaZ7 im Titrationstest auf Abbaubarkeit geprüft (2.10.1.5.). Auch nach einwöchiger Inkubation der Ansätze bei 40°C zeigte PhaZ7 (bis 50  $\mu\text{g/ml}$ ) keine signifikante

hydrolytische Aktivität. Die als Positivkontrolle eingesetzte Pankreas-Lipase hingegen führte zur Freisetzung von Säuregruppen. Diese Lipase war wie Kutinasen in der Lage, durch preferenzielle Spaltung primärer Alkoholesterbindungen des Kutins, Oligomere zu generieren (BROWN und KOLATTUKUDY, 1978; RAY und STARK, 1998).

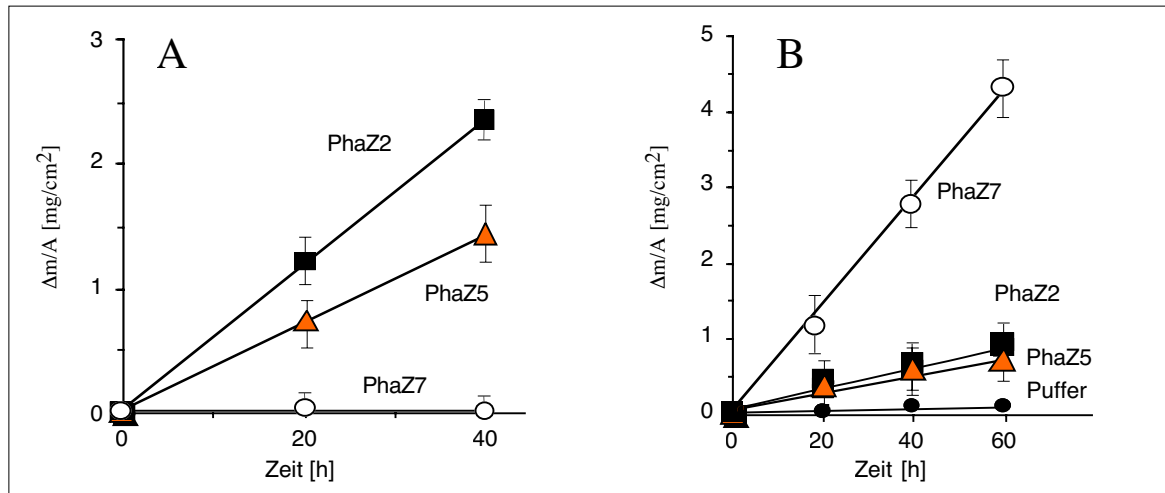
(VIII) Experimente mit nach 2.14. gewonnenen Fraktionen polarer und unpolarer Lipide aus Eigelb, den Membranen von *E. coli* und *B. subtilis*, sowie Sphingolipidgemische aus *Sphingomonas sp.* gaben auch nach 60-stündiger Inkubation bei 37°C keinen Hinweis auf lipolytische Aktivität von PhaZ7 wohingegen Kontrollen mit Lipase aus Schweineleber und Schweinepankreas (Boehringer, Mannheim), Phospholipase A2 (Rinderpankreas), Sphingomyelinase/Phosphodiesterase (*Bacillus cereus*) [SIGMA, Deisenhofen] sowie CalB Lipase aus *Candida antarctica* (Chirazyme®; Roche AG, Schweiz) zur signifikanten Freisetzung von Säuren führten.

PhaZ7 unterschied sich hinsichtlich der engen Beschränkung des Substratspektrums auf nPHA<sub>SCL</sub> grundlegend von lipolytischen Enzymen und anderen Esterasen/Hydrolasen. Offenbar handelte es sich bei PhaZ7 um eine Hydrolase mit nPHA<sub>SCL</sub> als physiologischem Substrat.

### 3.7.6.1. Abbau ataktischer PHA-Filme durch PhaZ7

Aus den Ergebnissen unter 3. ging hervor, daß im Gegensatz zu anderen dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen ausschließlich PHB oder PHV in amorpher Form als Substrat durch PhaZ7 hydrolysiert wurden. Wäre die Depolymerase in der Lage, zwischen amorphem und parakristallinem Polymer zu unterscheiden, so könnte die Inaktivität mit dPHB tatsächlich ausschließlich auf dessen parakristalliner Natur beruhen, welche die Freiheitsgrade der Polymerketten stark herabsetzt. Um dies zu verifizieren wurde, zusammen mit Dr. L. Focarete, ein Abbaueversuch mit ataktischen (a)PHB-Filmen, welche durch Polymerisation aus racemischem  $\beta$ -Butyrolakton gewonnen wurden, durchgeführt. Aufgrund der statistischen Zusammensetzung des Polymers aus *R*- und *S*-Monomeren weist aPHB keine parakristallinen Bereiche auf und ist somit vollständig amorph (SCANDOLA et al., 1997). Abb. 29 zeigt die Freisetzung von löslichen Hydrolyseprodukten nach Bestimmung des Massenverlustes der eingesetzten aPHB- im direkten Vergleich zu dPHB-Filmen (bestehend aus *R*-3-HB). dPHA Depolymerase PhaZ2 und PhaZ5 führten zur deutlichen Hydrolyse der dPHB Filme (21 bzw. 13 mg Polymer  $\times$  cm<sup>-2</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup>  $\times$  mg Protein<sup>-1</sup>; Abb. 29 A) während PhaZ7 völlig inaktiv schien. Die Relationen kehrten sich mit aPHB um. PhaZ7 hydrolysierte das amorphe Polymer mit einer Rate von 25 mg Polymer  $\times$  cm<sup>-2</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup>  $\times$  mg Protein<sup>-1</sup> (Abb. 29 B), nach 20 h makroskopisch erkennbar an einer Oberflächenerosion des Polymerfilmes. Die mit PhaZ2 und PhaZ5 ermittelte Abbaurrate lag unter 3 mg Polymer  $\times$  cm<sup>-2</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup>  $\times$  mg Protein<sup>-1</sup>. Der Versuch bestätigte die Spezifität von PhaZ7 für amorphes PHA<sub>SCL</sub>. Im Titrationsexperiment mit aPHB (2.10.1.5.) ergab sich eine Säurefreisetzung von 106  $\mu$ mol  $\times$  cm<sup>-2</sup>  $\times$  h<sup>-1</sup>  $\times$  mg Protein<sup>-1</sup>. Als Hydrolyseprodukte wurden in den Überständen der Abbaueversuche mittels ESI-MS (s. 2.11.7.) ausschließlich Oligomere vom Trimer bis zum Nonamer identifiziert. Die Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß die Ursache für das verschiedenartige Verhalten von PhaZ7 und den dPHB-Depolymerasen PhaZ5, PhaZ2 offenbar im amorphen Zustand des Polymers innerhalb der

nPHB-Granula zu finden war. Die Resultate stützten desweiteren die Annahme, daß es sich bei PhaZ7 um eine Depolymerase mit überwiegender *endo*-Aktivität handeln sollte, weil im Falle einer reinen *exo*-Aktivität der Abbau ataktischen Materials mit Erreichen einer *R-S* oder *S-S* Bindung (s. Oligomerspezifität; 3.7.6.3., Tab. 15) zum Erliegen gekommen wäre, und keine höherkettigen Oligomere nachweisbar sein sollten.



**Abb. 29:** Zeitabhängiger Massenverlust denaturierter (A) und ataktischer (B) PHB-Filme in Gegenwart von PhaZ2, PhaZ5 oder PhaZ7. Die Tests erfolgten bei 37°C in 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM CaCl<sub>2</sub> nach 2.10.1.6. mit je 2,8 µg/ml Protein und wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt. Der Massenverlust wurde auf die exponierte Filmoberfläche normalisiert [ $\Delta m/A$ ].

Das ataktische Polymer wurde weder durch Esterasen (*S. diastatochromogenes*, *P. fluorescens*) noch durch Lipasen (aus *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* und Schweineleber) hydrolysiert. Sowohl nPHB als auch dPHB erwiesen sich im Titrationsexperiment ebenfalls als inert gegen einen Angriff durch diese Esterasen und Lipasen, was die genannten Enzymgruppen deutlich von PhaZ7 abgrenzte.

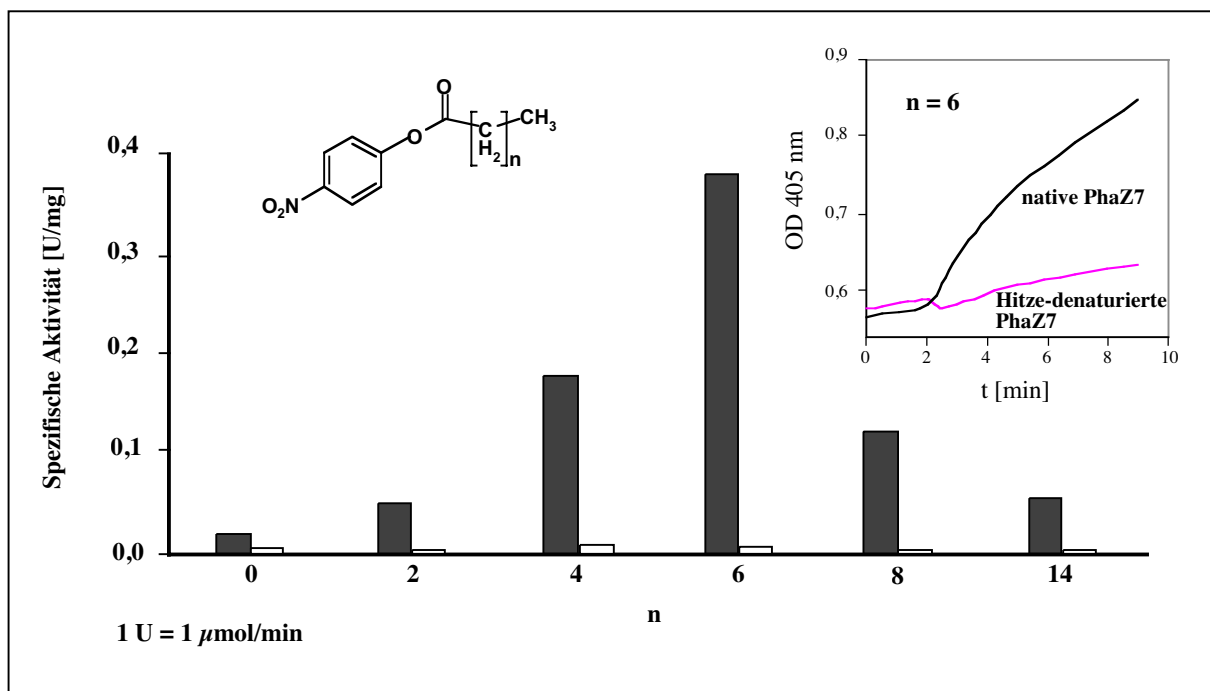
Bei PhaZ7 aus *P. lemoignei* handelte es sich offenbar um die erste isolierte **extrazelluläre** PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase mit ausschließlicher Spezifität für PHB und PHV in seiner amorphen Form. Das Enzym wurde aufgrund der biochemischen Daten und zur Abgrenzung von anderen extrazellulären dPHA-Depolymerasen als nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase bezeichnet. In Tabelle 14 wurden die ermittelten Aktivitäten und Substratspezifitäten von PhaZ7 sowie den dPHB-Depolymerasen PhaZ5 und PhaZ2 im direkten Vergleich gegenübergestellt.

### 3.7.6.2. Esteraseaktivität der nPHB Depolymerase PhaZ7

Eine Reihe hydrolytischer Enzyme (PHA-Depolymerasen, Lipasen, Esterasen) sind in der Lage, substratverwandte *p*-Nitrophenylacylester [(*p*-NP)-Acylester] umzusetzen. Im Falle der Verfügbarkeit eines löslichen Substrateanalogons, dessen Umsatz zur Freisetzung von Phenolat ( $\epsilon = 15000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , Tris-HCl, pH 8,0) führte, stände eine Methode zur genaueren Quantifizierung der Hydrolyseaktivitäten mit Hilfe eines photometrischen Tests zur Verfügung. Desweiteren wären Aufschlüsse über die Spezifität für löslicher Ester im Vergleich zum wasserunlöslichen PHA möglich. Der erste Test mit *p*-NP-Acetat, *p*-NP-Butyrat, *p*-NP-Hexanoat, *p*-NP-Octanoat, *p*-NP-Decanoat sowie *p*-NP-Palmitat



wurde entsprechend einer für Lipasen beschriebenen Vorschrift (KOUKER und JAEGER, 1987; EGGERT et al., 2000) in Gegenwart von 1 % (w/v) Gummi arabicum oder 50 mM Natriumcholat, sowie 0,01 % (v/v) Tween20 bzw. Tween80 durchgeführt (s. 2.10.3.), um insbesondere Ester mit größeren Seitenketten in stabiler Emulsion zu halten. Unter diesen Bedingungen zeigte PhaZ7 mit allen Estern eine sich von der auftretenden Autohydrolyse ohne Enzym kaum unterscheidbare Aktivität von  $< 0,002$  U/mg Protein. Wurden die Versuche jedoch in Abwesenheit von Emulgatoren und Detergentien durchgeführt, kam es bei Zugabe der Enzymlösung zu einer signifikanten Phenolatfreisetzung mit einem Aktivitätsmaximum von 0,38 U/mg für *p*-NP-Octanoat (Abb. 30). Mit abnehmender Kettenlänge sanken die Aktivitäten bis auf 0,019 U/mg (*p*-NP-Acetat). *p*-NP-Palmitat setzte PhaZ7 nur noch mit 0,055 U/mg um. Es war erforderlich, die Substratkonzentration der eingesetzten Ester auf 0,25 mM zu begrenzen, da sonst im Falle der höhermolekularen Substrate eine stärkere Anfangstrübung das Testergebnis verfälschte. Die beobachtete Reaktion war wiederum strikt pH abhängig. Bei pH 7,5 konnte weder in Tris-HCl noch in Kaliumphosphatpuffer signifikante Esteraseaktivität nachgewiesen werden. Um auszuschließen, daß es sich bei der beobachteten Esterhydrolyse um einen chemischen Artefakt infolge der Zugabe von Verdünnungspuffer oder eine unspezifische Reaktion handelte, wurden Kontrollansätze mit identischen Volumina denaturiertem Enzym (30 min, 96°C) versetzt. Es kam zu keiner Erhöhung der Hydrolyseraten über das Maß der Autohydrolyse hinaus, was darauf schließen ließ, daß PhaZ7 für die beobachtete Esteraseaktivität verantwortlich war. Die im Vergleich zur mittels Titration bestimmten nPHB-Depolymeraseaktivität (s. Tab. 14) um  $> 1/20000$  niedrigeren Esteraseaktivitäten des Enzyms stützten die Vermutung, daß es sich bei PhaZ7 um eine echte Polymerhydrolyase handelte.



**Abb. 30:** Esteraseaktivität der nPHB-Depolymerase PhaZ7 mit *p*-Nitrophenylacylestern in 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM CaCl<sub>2</sub> ohne (■) und in Gegenwart von 0,01% (v/v) Tween80 (□) bei 40°C nach 2.10.3. Zum Zeitpunkt t = 2 min wurden den Ansätzen (1 ml) je 12,5 µl in H<sub>2</sub>O vorverdünntes (in der Kontrolle 30 min bei 96°C hitzeinaktiviertes) Enzym (6,3 µg) zugesetzt.

### 3.7.6.3. Titrationsexperimente mit oligomeren PHA

Zur Klärung der Frage nach der Spezifität von PhaZ7 und zur Bestätigung des unter 3. ermittelten, für bisher untersuchte extrazelluläre PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen ungewöhnlichen Produktspektrums wurden Titrationsexperimente nach 2.10.1.5. mit synthetischen PHB-Oligomeren (Abb 31) durchgeführt. Neben PhaZ7 wurden auch die dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen PhaZ2 und PhaZ5 getestet. Aufgrund der geringen Löslichkeiten insbesondere höherkettiger Oligomere (R6 und R8) wurde mit maximal 1-2 mg pro 4 ml Ansatz gearbeitet. Da in den ersten bei pH 9,0 durchgeführten Versuchen eine signifikante chemische Hydrolyse der kurzkettigen Polyester auftrat [von 22 (3-HB-Dimer) bis 85 nmol min<sup>-1</sup> mg Polymer<sup>-1</sup> (3-HB-Oktamer)] wurden die Experimente bei pH 7,5 wiederholt [Spontanhydrolyse von 9 (3-HB-Dimer) bis 55 nmol min<sup>-1</sup> mg Polymer<sup>-1</sup> (3-HB-Oktamer)]. Die qualitativen Ergebnisse der Experimente bei pH 7,5 und 9,0 zeigten gute Übereinstimmung. Während das 3-HB-Dimer nicht und das 3-HB-Trimer von PhaZ2 und PhaZ5 nur mit vergleichsweise geringer Rate gespalten wurden, ergab sich mit höherkettigen Oligomeren eine im Vergleich zum Trimer um 20 bis 45 mal höhere Anfangsrate der Hydrolyse (Tab 15). PhaZ2 zeigte maximale Aktivität mit dem 3-HB-Tetramer. Die Aktivität mit höherkettigen Oligomeren sank bis auf ein Drittel dieses Wertes für das Oktamer. Von PhaZ5 wurde das Hexamer mit der höchsten Rate umgesetzt. Auch hier kam es mit dem Oktamer zu keiner weiteren Erhöhung der Hydrolyserate. Insgesamt lagen die maximalen Oligomer-Abbaugeschwindigkeiten für beide Enzyme um bis zu 90 % über den mit dPHB ermittelten Werten (Tab 15). Da die Hydrolyse der wasserunlöslichen Polymergranula und PHB-Filme jedoch strikt oberflächenabhängig erfolgte, sollte ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen für wasserlösliche Oligomere stets unter Vorbehalt erfolgen.

PhaZ7 unterschied sich auffällig von dem für dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen beobachteten Verhalten. Die Hydrolysegeschwindigkeiten für Oligomere 3-HB lagen um bis zu 1/18 unter der maximalen Säurefreisetzung aus polymerem nPHB. Vom R-3-HB-Dimer bis zum R-3-HB-Pentamer wurde kaum signifikante enzymatische Hydrolyse festgestellt. Die Aktivitäten stiegen über 23 U/mg für das Hexamer auf 440 U/mg für das Oktamer. In diesen Fällen erreichte die Reaktion bereits nach weniger als 10 % der theoretisch möglichen Spaltungen wieder die Spontanhydrolyserate der Oligomere. Verglichen mit den Aktivitäten der extrazellulären dPHB-Polymerase PhaZ5 lag die Aktivität von PhaZ7 um 90 % niedriger. Die mit zunehmender Kettenlänge ansteigende und mit nPHB maximale Aktivität stützte im Konsens mit der geringen Aktivität gegen lösliche *p*-Nitrophenylacylester (3.7.6.2.) und dem gefundenen Produktspektrum nach Abbau von nPHA<sub>SCL</sub> (Hauptprodukte: 3-HA-Penta- und 3-HA-Hexamere; 3.7.7.) die Aussage, daß es sich bei PhaZ7 um eine echte Polymerhydrolase handelte.

PhaZ7 war in der Lage, auch zyklisches 3-HB-Hexamer mit über der Rate für linearisiertes Hexamer und der Spontanhydrolyse des Oligolides (42 nmol min<sup>-1</sup> mg Polymer<sup>-1</sup>) liegender Aktivität zu spalten. Dies lieferte einen weiteren Hinweis auf eine signifikante *endo*-hydrolytische Aktivität des Enzyms, welche bereits aus den Ergebnissen mit aPHB (3.7.6.1.) postuliert wurde. Im Gegensatz zu linearem

Oligomer, welches aufgrund der Hydroxyl- und Carbonsäurereste eine polare Kette darstellte, stellte das hydrophobere Oligolid offenbar ein besseres Substrat dar.

Um die Spezifität der Depolymerasen für verschiedene Stereoisomere zu testen, wurden diverse Oligomere mit unterschiedlicher Abfolge von *S*-3-HB- und *R*-3-HB-Monomereinheiten im Titristatexperiment eingesetzt. Die Verbindungen wurden in der Arbeitsgruppe Prof. SEEBACH (ETH-Zürich, Schweiz) hergestellt (Für eine Übersicht der eingesetzten 3-HB-Oligomerester siehe Abb. 31).

Syndiotaktisches 3-HB-Oktamer wurde nicht abgebaut. Während die vollgeschützten all-*R*-3-HB-Tetramere bzw. all-*R*-3-HB-Oktamere (Abb. 31) hydrolysiert wurden, war PhaZ7 mit dem ebenfalls Schutzgruppen-tragenden all-*S*-Tetramer vollständig inaktiv. Die Spezifität der Hydrolyse schien für alle getesteten extrazellulären Depolymerasen aus *P. lemoignei* ausschließlich auf *R*-*R*-Bindungen beschränkt (Tab. 15). Im Gegensatz zu *R*-3-HB-Tetramer, welches offenbar kein Substrat für PhaZ7 darstellte, wurde mit hydroxyterminalem Benzoyl- und carboxyterminalem *tert.*-Butyl-Rest vollgeschütztes Tetramer hydrolysiert. Dies stärkt die Annahme, daß die Hydrophobizität des Substrates von erheblicher Bedeutung für die enzymatische Substraterkennung sein sollte. Die Spaltung von Bn-S4-*t*-But und Bn-R8-*t*-But deutete ebenfalls auf eine bevorzugte *endo*-Hydrolyse von PHB durch PhaZ7.

Eine Hydrolyse von an den Hydroxyl- oder Carboxylgruppen *S*-konfigurierten Oktameren deutete ebenfalls auf einen *endo*-Hydrolysemechanismus. Die Hydrolyserate fiel offenbar höher aus, wenn sich die *S*-Untereinheiten am Hydroxylende der polaren Oligomerkette befanden. Mit zunehmender Zahl der *S*-Untereinheiten sank die Säurefreisetzung durch PhaZ7.

Strukturformel	Konfiguration	Abkürzung
	<i>RR</i>	R2
	<i>RRR</i>	R3
	<i>RRRR</i>	R4
	<i>RRRRR</i>	R5
	<i>RRRRRR</i>	R6
	<i>RRRRRRRR</i>	R8
	<i>SSSS</i>	S4
	<i>RRRRSSSS</i>	R4 S4
	<i>SSSSRRRR</i>	S4 R4
	<i>RRRRRRRS</i>	R7 S1
	<i>SRRRRRRR</i>	S1 R7
	<i>RSRSRSRS</i>	[RS]4
	<i>RSSS</i>	oR1 S3
	<i>RRRRR</i>	oR5
	<i>RRRRRR</i>	oR6
$R^1 = R^2 = H$	entschützt	
$R^1 = Bn$ (Benzoyl-); $R^2 = H$	hydroxy-geschützt	
$R^1 = H$ ; $R^2 = t\text{-But}$ ( <i>tert.</i> -Butyl-)	carboxy-geschützt	
$R^1 = Bn$ (Benzoyl-); $R^2 = t\text{-But}$ ( <i>tert.</i> -Butyl-)	vollgeschützt	

**Abb. 31:** Für die Abbauntersuchungen mit PhaZ7 eingesetzte lineare und zyklische Oligomere (Synthese s. 2.11.5.).

**Tab. 15:** Ergebnisse der Abbauntersuchungen mit 3-HB-Oligomeren durch dPHA<sub>SCL</sub> Depolymerasen (PhaZ2; PhaZ5) und nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7.

	dPHB-Depolymerase PhaZ2		dPHB-Depolymerase PhaZ5		nPHB-Depolymerase PhaZ7	
	A	B	A	B	A	B
<b>3-HB Oligomere</b>						
R2	0	< 0,01	0	< 0,01	0	< 5
R3	0,7	114	1,0	112	0	< 5
R4	1,1	<b>3560</b>	1,0	3840	< 0,2	7
R5	1,5	1800	1,8	3860	< 0,2	7
R6	2,2	1950	2,9	<b>4970</b>	0,6	23
R8	4,1	1150	3,5	4160	0,7	<b>440</b>
R4S4		+		2600		6
S4R4		++		4400		18
R7S1		++		3400		98
S1R7		++		3200		210
[RS]4		< 0,01		< 0,01		< 0,01
S4		< 0,01		< 0,01		< 0,01
Bn-R4- <i>t</i> -But (vollgeschützt)		n.b.		n.b.		210
Bn-S4- <i>t</i> -But (vollgeschützt)		n.b.		n.b.		< 0,01
Bn-R8- <i>t</i> -But (vollgeschützt)		++		++		270
<b>zyklische Oligomere (Oligolide)</b>						
oR1S3			-	< 0,01	-	< 0,01
oR5			2,8	1960	n.b.	16
oR6			4,1	910	1,2	170

**A:** Äquivalente gespaltene Esterbindungen nach 12 h Inkubation. Für die Endpunktbestimmung wurden die Ansätze nach 2 h dem Titristaten entnommen und die bei weiterer Inkubation nach erneutem Enzymzusatz gebildeten Säuren in 5 h-Intervallen nachtitriert.

**B:** Im Titristaten (2.10.1.5.) bei pH 7,5 anhand der freigesetzten Säureäquivalente nach Abzug der Spontanhydrolyse bestimmte Abbauraten [ $1 \text{ U mg}^{-1} = 1 \mu\text{mol Säure min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ ]. Die jeweils stärkste Aktivität wurde durch Fettdruck hervorgehoben.

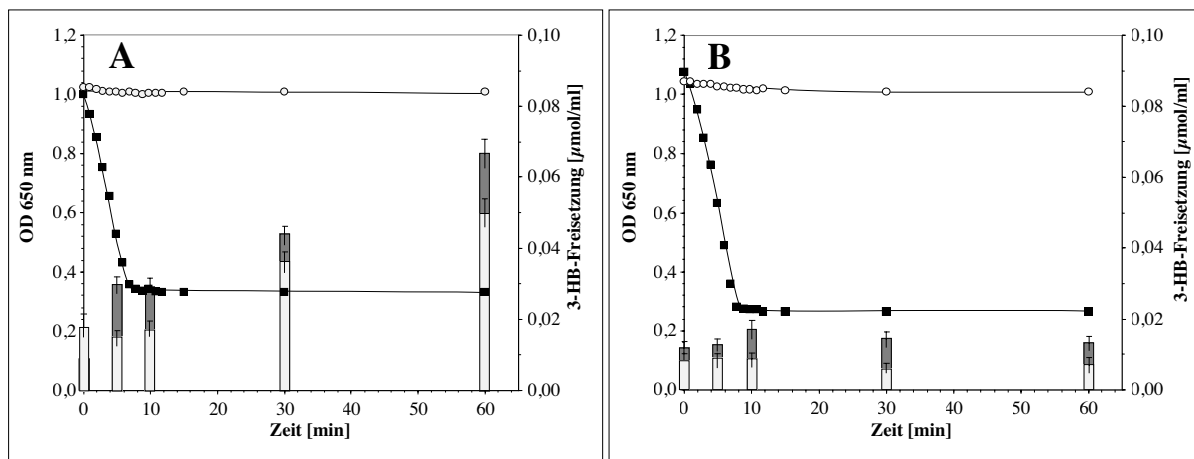
\* In Endpunktbestimmungen zur Untersuchung der Produktspektren getestet. ++ > 1000 U/mg; + > 100 U/mg

### 3.7.7. Produkte der PHA-Hydrolyse durch PhaZ7

Für die Produktanalyse der hydrolytischen Aktivität von PhaZ7 mit nPHA<sub>SCL</sub> erwies sich die zur Bestimmung der Polymerkonzentrationen nach 2.11.6. eingesetzte Gaschromatographie als nicht geeignet, da die Proben hierbei mit Methanol unter sauren Bedingungen zum Fettsäuremethylester derivatisiert werden mußten. Im Zuge einer solchen Probenaufbereitung wurden jedoch intakte Esterbindungen gespalten. Da aufgrund der unter 3.7.6.3. beschriebenen geringen Aktivität von PhaZ7 mit kurzkettigen Oligomereestern auch Oligomere mit Kettenlängen oberhalb von fünf Monomeruntereinheiten zu erwarten waren, schien auch die für PhaZRr aus *R. rubrum* etablierte Normalphasen-HPLC-Analytik (2.11.3.) der in Gegenwart von Diazomethan schonend unter Erhalt der Esterbindungen methylierten Oligomere als unpraktikabel.

Zur vollständigen Identifizierung der enzymatischen Hydrolyseprodukte wurde neben der Bestimmung von freier 3-HB im optisch enzymatischen Test mit 3-HB-Dehydrogenase (2.11.1.) die Elektronen Spray Ionisations (ESI) Massenspektrometrie (2.11.7.) eingesetzt, welche sich als gut geeignet für die zu bearbeitende Problemstellung erwies. Problematisch für die Endproduktbestimmung schien hingegen die, unter den für die Titrationsexperimente (2.10.1.5.) beschriebenen Bedingungen, nie vollständig zu unterbindende Entstehung von Crotonsäuren der oligomeren Spaltprodukte. In der späteren Produktanalyse von Titristatansätzen mittels ESI-MS war erkennbar, daß Crotonsäurederivate der Oligomere offenbar von PHA-Depolymerasen nicht weiter umgesetzt werden konnte. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Analyse von Hydroxyalkanoatestern aus Tris-HCl-gepufferten Ansätzen optimiert, in denen offenbar keine signifikante Crotonatbildung auftrat.

In Gegenwart von PhaZ7 kam es bei Verwendung von nPHB aus rekombinanten *E. coli* (*phaCAB<sub>Re</sub>* mit und ohne Phasinproteinen: *phaP*), als auch mit nPHB aus *R. eutropha* nach 1 h Inkubation nur zu einer vergleichsweise geringen Monomerefreisetzung während die Trübung der milchigen nPHB-Suspensionen mit PhaZ7 in weniger als drei Minuten nahezu vollständig verschwand (Abb. 32), was auf eine Bildung wasserlöslicher Produkte hinwies. Wurden die gaschromatographisch bestimmten 3-HB-Gehalte der Granula (*R. eutropha* H16: 81 % w/w; *E. coli*: 77 % w/w) zugrunde gelegt, so entsprachen die freigesetzten Monomermengen im dargestellten Experiment jedoch nur 0,3 bis 1,4 % der theoretisch vorhandenen Monomeruntereinheiten von 4,7 bzw. 4,5 µmol/ml Test bei vollständiger Hydrolyse (9,4 bzw. 9 µmol/mg nPHB). Dies schien bemerkenswert, da bisher für die Mehrheit extrazellulärer dPHA-Depolymerasen signifikante Mengen Monomer als Endprodukt der Hydrolyse nachgewiesen worden waren (JENDROSSEK, 2001b). Bei den Hauptprodukten der Hydrolyse von nPHB durch PhaZ7 sollte es sich überwiegend um oligomere 3-HB-Ester handeln. Eine leichte Zunahme der 3-HB-Konzentration bei Verwendung von nPHB aus *R. eutropha* H16 ohne die Gegenwart von PhaZ7 war offenbar auf die unter den verwendeten Bedingungen schwache an den nativen PHB-Granula verbliebene intrazelluläre nPHB-Depolymeraseaktivität aus dem Donororganismus zurückzuführen (HANDRICK et al., 2000; SAEGUSA et al., 2001). Die geringe Trübungsabnahme in den Kontrollen war ein Hinweis auf offenbar nur geringe *endo*-hydrolytische PHB-Depolymeraseaktivität dieses Enzyms unter den beschriebenen Bedingungen (Abb. 32 A).

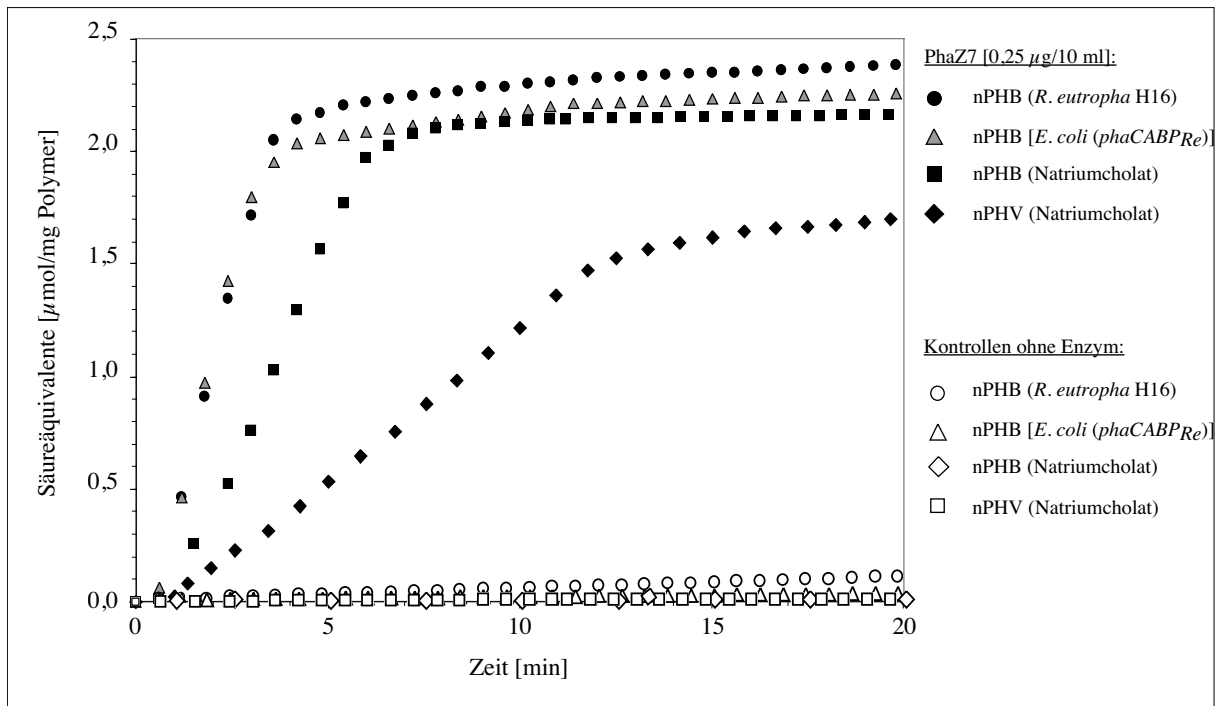


**Abb. 32:** 3-HB-Freisetzung und Trübungsabnahme von nPHB-Suspensionen aus *R. eutropha* H16 (A) und *E. coli* HMS174 (*phaABCP<sub>Re</sub>*) (B) in Abhängigkeit von PhaZ7 aus *P. lemoignei*.

Je 10 ml Suspension [5 mg native Granula in 5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,02 % w/v Natriumazid] wurden mit 0,51 µg PhaZ7 versetzt (■) und bei 40°C inkubiert. Unmittelbar nach Reaktionsstart wurde je 1 ml Probe entnommen und exemplarisch im temperierten Photometer die Trübung bei 650 nm verfolgt. In den mitgeführten Kontrollen ohne PhaZ7 (○) wurde die Eigenhydrolyse der Granula dokumentiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden weitere Proben entnommen (je 1 ml) und die Reaktion durch Absenken des pH-Wertes auf 6,0-6,5 (2,8 µl 4,25 %-ige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) sowie sofortiges Einfrieren in Flüssigstickstoff gestoppt. Nach Abzentrifugieren wurden die Überstände lyophilisiert, verbliebene Rückstände in 500 µl 10 mM KP-Puffer (pH 6,5) aufgenommen und je 100 µl in einer Parallelbestimmung unmittelbar dem 3-HB-Nachweis mittels 3-HB-Dehydrogenase (2.11.1.) unterzogen [Ansätze mit PhaZ7: **graue Säulen**; Kontrollen: **weiße Säulen**].

Die im Titrstatexperiment (2.10.1.5.) ermittelte Säurefreisetzung durch PhaZ7 lag weit höher als die Werte der 3-HB-Freisetzung, blieb aber zugleich deutlich unter der maximal freisetzbaren Anzahl von Säureäquivalenten. Für verschiedene PHA<sub>SCL</sub>-Granula charakteristische Titrationskurven sind in Abb. 33 zusammengefaßt. In allen Experimenten folgte nach kräftigem Anstieg der Säurefreisetzung (spezifische Aktivitäten s. 3.7.6., Tab. 14) eine zweite deutlich langsamere Hydrolysephase. Die Rate der Hydrolyse war in diesem zweiten Reaktionsabschnitt unabhängig von einer Erhöhung der Depolymerasekonzentration, stieg jedoch mit zunehmendem pH-Wert an. Unter 3.7.6.3. wurde ein ähnlicher Effekt für synthetische Oligomere in Abwesenheit von PhaZ7 beschrieben. Offenbar handelte es sich zum überwiegenden Teil um die pH-abhängige chemische Spontanhydrolyse von durch die enzymatische Aktivität von PhaZ7 entstandenen löslichen Oligomeren. Der Anteil von in der enzymatischen Reaktion freigesetzten Säuregruppen lag in allen Experimenten unabhängig von der Art der eingesetzten nPHA<sub>SCL</sub>-Granula zwischen 0,185 und 0,217 µmol pro µmol theoretisch eingesetzter, in Polymerketten von über 12 000 Untereinheiten (nPHB) vorliegender 3-HB. Alle Werte wurden auf die durch Gaschromatographie quantifizierte Polymermenge/mg nPHA-Granula (*R. eutropha* H16: 81 % w/w, *E. coli*: 77 % w/w) und die theoretisch ermittelte Menge an Monomeruntereinheiten,  $M_w = 86$  g/mol, unter Vernachlässigung der geringfügig schwereren Endgruppen einer Polymerkette bezogen, was einer durchschnittlichen theoretischen Spaltung jeder fünften Esterbindung im Polymer entsprach. (GPC-analytisch nach 2.6.11. bestimmte statistische Molekularmassen der Polymersubstrate, „number average molecular weight“,  $M_n$ : nPHB *R. eutropha* H16:  $M_n = 3,4 \times 10^5$  bis  $1,66 \times 10^6$ ; nPHB-*E. coli*:  $M_n = 1,09 \times 10^6$ ; artifizielle nPHV:  $M_n = 4,35 \times 10^4$ ). Da es sich um die durchschnittliche Spaltungshäufigkeit handelte, konnten noch

keine endgültigen Aussagen über die tatsächliche Länge der Hydrolyseprodukte getroffen werden. Gesichert schien jedoch die Freisetzung höherkettiger 3-HB-Oligomere. Alle Ansätze erschienen bereits gegen Ende des ersten Hydrolyseabschnittes weitgehend klar. Im Falle von artifiziellen PHV-Granula sank die  $OD_{650\text{ nm}}$  auf Werte unter 0,005 wohingegen mit den biochemisch intakten nPHB-Granula aus verschiedenen Organismen stets eine signifikante Resttrübung  $> 0,05$  beobachtet wurde, welche auch bei fortschreitender Inkubation nicht weiter abnahm.

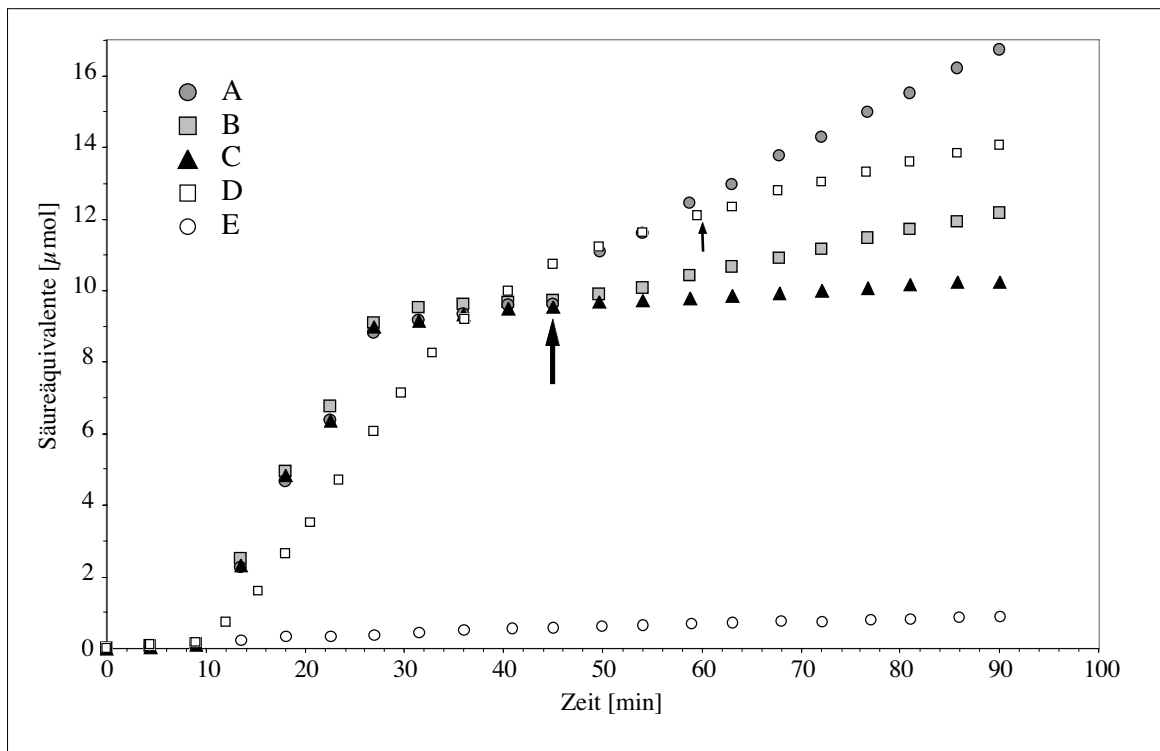


**Abb. 33:** Säurefreisetzung aus nPHB infolge der hydrolytischen Aktivität von PhaZ7 mit nPHB-Granula aus rekombinanten *E. coli* (*phaCABP<sub>Re</sub>*) sowie *R. eutropha* H16; artifiziellen PHB- und artifiziellen PHV-Granula (stabilisiert mit Natriumcholat). Vortitrierte nPHA-Suspensionen in  $H_2O$  mit 1 mM  $CaCl_2$  (5,005 mg PHA Granula/10 ml; pH 9,0) bei 40°C wurden nach 45 Sekunden mit 5 µl (0,25 µg) in Wasser vorverdünnter nPHB-Depolymerase PhaZ7 versetzt und die Reaktion gestartet (2.10.1.5.). Die freigewordenen Säureäquivalente wurden mit dem in der Gaschromatographie (2.11.6.) bestimmten 3-Hydroxyfettsäuregehalt der Granula korreliert.

Einen weiteres starkes Indiz für die Bildung von höherkettigen Oligomerprodukten im Zuge der Hydrolyse von nPHB durch PhaZ7 erbrachte die Zugabe von PhaZ5 zu Titristatansätzen nach deren Aufklaren infolge der Polymerhydrolyse durch PhaZ7. Während PhaZ5 mit intakten nativen PHB-Granula nahezu inaktiv war, kam es bei der beschriebenen Zugabe zu hydrolysierten Polymersuspensionen nach PhaZ7-Behandlung zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Freisetzung von weiteren Säuregruppen (Abb. 34). Dieser Effekt konnte auf die unter 3.7.6.3. (Tab. 15) gezeigte hohe Oligomerhydrolaseaktivität von PhaZ5 zurückgeführt werden. Im Zuge der enzymatischen nPHB-Hydrolyse durch PhaZ7 sollten also mindestens Trimere gebildet worden sein, da PhaZ5 nicht zur Dimerhydrolyse in der Lage war (s. Tab. 15). Die beobachteten Raten von bis zu 3900 U/mg PhaZ5 ließen den Schluß zu, daß nach einer Hydrolyse nativer PHB durch PhaZ7 noch höherkettige Oligomere in großer Menge vorhanden sein sollten. Versuche mit PhaZ7 und PhaZ2 führten zu ähnlichen Ergebnissen, wobei es zu einer Erhöhung der hier bereits vorhandenen Aktivität



mit nPHB um bis zu 65 % kam. Auch die Zugabe der genannten dPHB-Depolymerasen zu mit PhaZ7 versetzten 3-HB-Oligomeren im Anschluß an die unter 3.7.6.3. beschriebenen Tests (Tab. 15) erbrachte eine deutliche Säurefreisetzung und damit die Bestätigung, daß in den Überständen auch nach exzessiver Behandlung mit PhaZ7 noch Oligomere 3-HB-Ester vorhanden waren.



**Abb. 34:** Indirekter Nachweis der Entstehung höherkettiger Oligomerprodukte nach nPHB-Hydrolyse durch PhaZ7.

Die Ansätze **A**, **B** und **C** wurden bei  $t = 9$  min mit  $0,05 \mu\text{g}$  PhaZ7 gestartet. Je ein Reaktionsansatz mit PhaZ7 wurden nach 45 min mit  $0,08 \mu\text{g}$  PhaZ2 (**B**) bzw. PhaZ5 (**A**) oder erneut  $0,1 \mu\text{g}$  PhaZ7 (**C**) versetzt (s. **stärkerer Pfeil**). Kontrollen ohne PhaZ7 enthielten jeweils nur PhaZ2 ( $1,7 \mu\text{g}$ ; **D**) oder PhaZ5 ( $0,85 \mu\text{g}$ ; **E**). Zur Gegenprobe wurden in Reaktion (**D**) nach 60 min  $0,1 \mu\text{g}$  PhaZ7 zugesetzt (**schmäler Pfeil**). Die Ansätze wurden bei  $40^\circ\text{C}$  im Titristaten in Gegenwart von  $1 \text{ mM CaCl}_2$  nach 2.10.1.5. inkubiert.

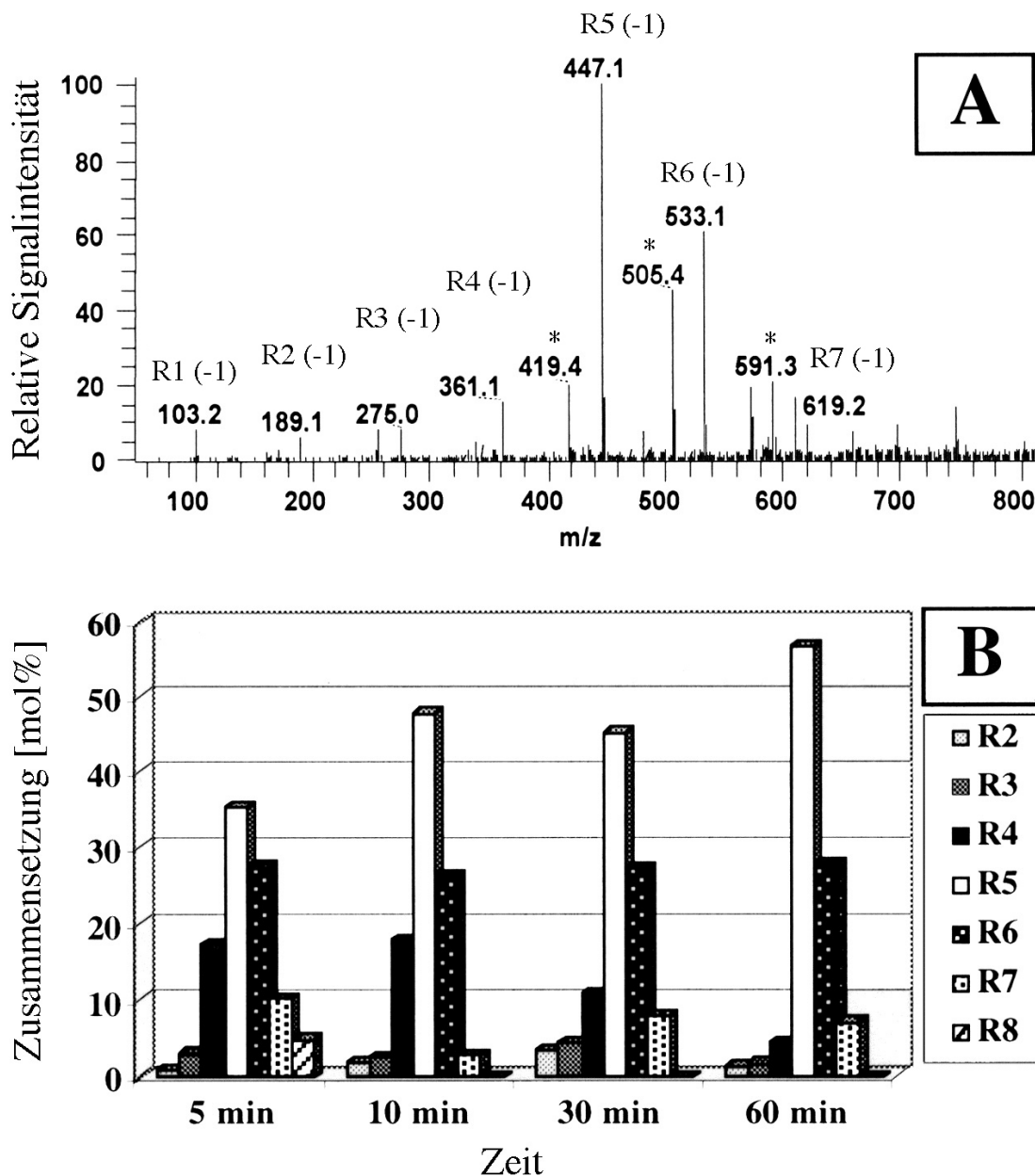
Interessanterweise kam es in den Überständen der Hydrolyse durch PhaZ7 nicht zu den unter 3.7.9. für dPHB beschriebenen Hemmeffekten auf dPHB-Depolymerase PhaZ2 oder PhaZ5 trotz Gegenwart von PhaZ7. Entstandene kurzkettigen Oligomerester stellten offenbar kein Substrat für PhaZ7, wohl aber für PhaZ2 bzw. PhaZ5 dar. Da es sich um lösliche Oligomere handeln sollte, könnte in diesem Falle wie schon mit löslichen *p*-NP-Estersubstraten (3.7.6.2.) die Ursache der Aufhebung der Hemmung im Fehlen der mit dPHB offenbar sehr wirksamen Substratmaskierung durch Proteinbindung und Oberflächenlimitierung bestehen.

### 3.7.7.1. Nachweis von Produkten der nPHA<sub>SCL</sub>-Hydrolyse durch PhaZ7 mittels ESI-MS

Um die bislang nur indirekt nachgewiesenen 3-HB-Oligomere als Reaktionsprodukte der nPHA<sub>SCL</sub>-Hydrolyse durch PhaZ7 auch direkt nachzuweisen, wurde die Elektronenspray Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS) eingesetzt. Die Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. M. KOWALCZUK (Polnische Akademie der Wissenschaften, Zentrum für Polymerchemie, Zabrze, Polen) Zur Gewinnung von Proben für die ESI-MS wurden die unter Abb. 32 beschriebenen Versuche mit nPHB aus rekombinanten *E. coli* (mit und ohne Granulastrukturprotein PhaP), nPHB aus *R. eutropha* H16 sowie artifiziellen PHB- und PHV- Granula (stabilisiert durch Natriumcholat, s. 2.13.) durchgeführt. Die in der ESI-MS erhaltenen Spektren sowie die molaren Anteile der identifizierten Oligomere sind in Abb. 35 dargestellt. Die Analyse der nPHB-Hydrolyseprodukte ergab eine Serie von Peaks mit konstantem Masseninkrement von 86 beginnend bei  $m/z$  103 (Abb. 35). Die Werte entsprachen dem deprotonierten 3-HB Monomer R1 ( $m/z$  103), 3-HB Dimer R2 ( $m/z$  189), 3-HB Trimer R3 ( $m/z$  275), 3-HB Tetramer R4 ( $m/z$  361), 3-HB Pentamer R5 ( $m/z$  447), 3-HB Hexamer R6 ( $m/z$  533), 3-HB Heptamer R7 ( $m/z$  619) sowie dem 3-HB Oktamer R8 ( $m/z$  705). Die Identitäten der Peaks wurden durch ESI-MS<sup>n</sup> überprüft und ergaben für deprotonierte 3-HB Oligomeranionen charakteristische Fragmentierungsmuster (KOWALCZUK et al., 2000). Abbildung 36 zeigt die ESI-MS/MS Spektren der dem 3-HB-Pentameren (R5) bzw. dem 3-HB-Hexameren (R6) entsprechenden Peaks aus Abbildung 35.

In den Massenspektren (Abb. 35) konnte eine zweite Serie von Peaks bei  $m/z$  419, 505, 591 identifiziert werden, deren Masseninkrement ebenfalls 86 betrug. Die Werte lagen jeweils um 58 über den  $m/z$ -Werten des deprotonierten 3-HB-Tetra-, Penta- und Hexamers. ESI MS<sup>n</sup>-Analysen ergaben wiederum das für 3-HB-Oligomere typische Fragmentierungsmuster. Offenbar handelte es sich um NaCl-Addukt-Ionen der 3-HB-Oligomere R4, R5 und R6. Die Annahme konnte durch die Übereinstimmung des erhaltenen mit dem theoretischen Isotopenmuster am Beispiel des Ions  $m/z$  505 mit der Summenformel C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>O<sub>11</sub>NaCl bestätigt werden. (Bei der ESI-MS<sup>n</sup> wurden im ersten Experiment mittels Ionenfalle selektierte monoisotopische Ionen durch Kollisionsaktivierung mit Helium fragmentiert und das Massenspektrum der erhaltenen Bruchstücke aufgenommen.)

Die relative Zusammensetzung der Oligomere im Überstand während der enzymatischen nPHB-Hydrolyse durch PhaZ7 änderte sich nach 5 min nur noch geringfügig. Ein Anteil von 55 mol% wies das 3-HB-Pentamer R5 als Hauptprodukt aus, gefolgt von Hexa- und einem deutlich geringeren Anteil Heptamer (Abb 35 B). Im Zeitraum zwischen 5 und 10 min wurde das Oktamer offensichtlich umgesetzt. Nach 10 min war im gezeigten Experiment keine signifikanten Änderungen mehr zu beobachten. Bei Verwendung von artifiziellen PHB-Granula und nPHB aus *R. eutropha* H16 wurden analoge Produktspektren ermittelt, wobei in letzterem Falle der nach 2.11.1. mit 3-HB-Dehydrogenase gemessene Monomeranteil bis auf 1,4 mol% stieg.



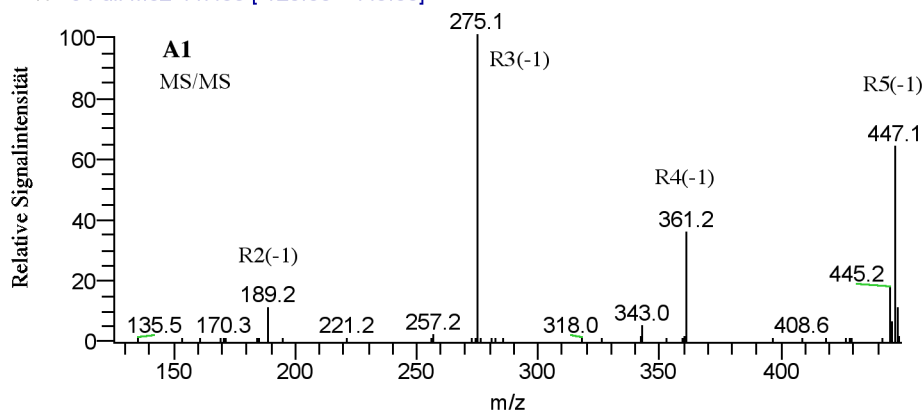
**Abb. 35:** Oligomere Abbauprodukte von nPHB aus rekombinanten *E. coli* (*phaCABP<sub>Re</sub>*) nach Hydrolyse durch PhaZ7.

(A) ESI-Massenspektrum (Negativ Modus) nach 10 min Inkubation des Polymers in Gegenwart von PhaZ7 (\* NaCl-Addukte).

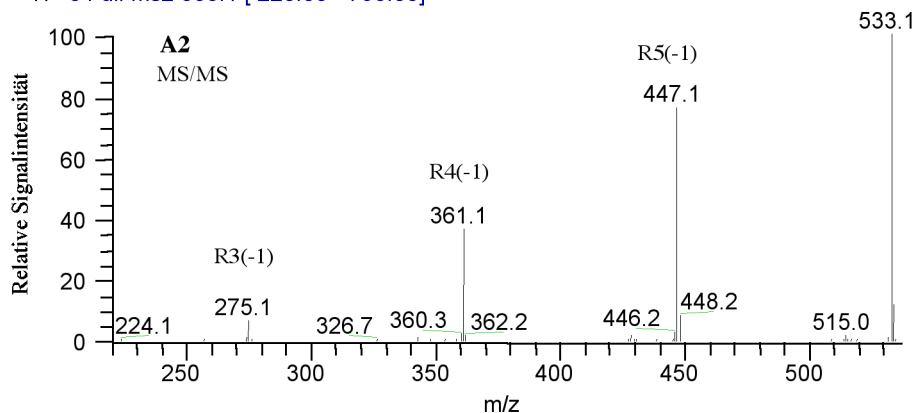
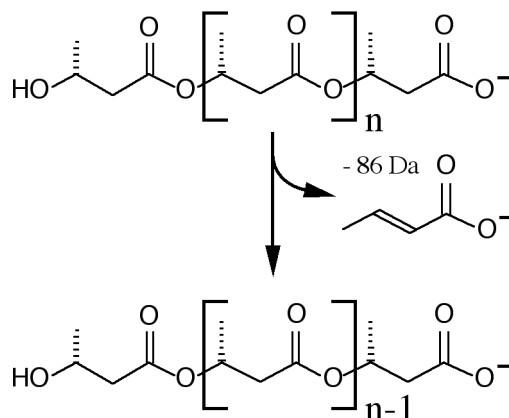
(B) Relative molare Zusammensetzung des Oligomerspektrums in Abhängigkeit vom Reaktionszeitpunkt. Die Freisetzung von Monomer ist in Abb. 32 dargestellt. 500 µg/ml nPHB wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Entnahme von je 1 ml Probe. Zum Reaktionsstop wurde der pH-Wert auf 6,0-6,5 abgesenkt (2,8 ml 4,25 %-ige H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) sowie 1 Vol. Aceton zugegeben und die Überstände nach Abzentrifugieren verbliebener Rückstände (4°C) in Flüssigstickstoff schockgefroren. Lyophilisiertes Probenmaterial wurde in Chloroform/Methanol (10:1, v/v) gelöst und nach 2.11.7. im ESI-Massenspektrometer analysiert. Nomenklatur siehe Abb. 31.

**A**

S#: 1044 RT: 22.05 AV: 1 NL: 2.96E5  
 T: - c Full ms2 447.00 [ 125.00 - 449.00]



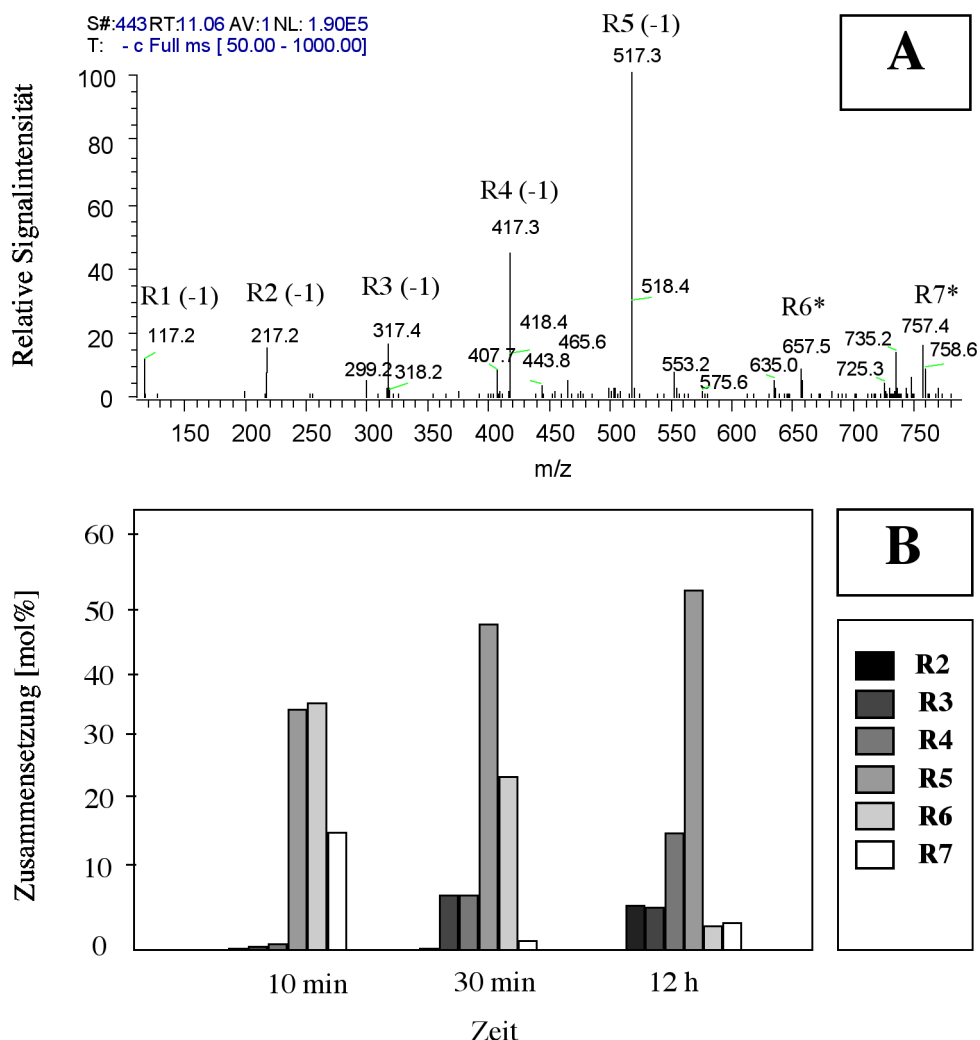
S#: 352 RT: 9.14 AV: 1 NL: 1.62E5  
 T: - c Full ms2 533.1 [ 220.00 - 795.00]

**B**

**Abb. 36:** Nachweis der Identitäten des 3-HB-Pentamers [ $m/z$  447; (**A1**)] und des 3-HB-Hexamers [ $m/z$  533; (**A2**)] aus dem Produktspektrum der nPHB-Hydrolyse in Abb. 35 durch ESI-MS<sup>2</sup>. Monoisotopische Ionen ( $m/z$  447;  $m/z$  533; Abb. 35 A) wurden anhand ihrer Masse mittels Ionenfalle selektiert. Durch den Zusammenstoß mit dem in der Stoßkammer befindlichen Gas (Helium) erfolgt die teilweise Umwandlung der kinetische Energie der selektierten Ionen in Vibrationsenergie (Kollisionsaktivierung), was zur Fragmentierung führt und in der anschließenden Massenanalyse ein charakteristisches Spektrum der Fragmente (**A1**; **A2**) ergibt.

(**B**) Mechanismus der Fragmentierung nach KOWALCZUK et al. (2000).

Mit artifiziellen dPHV-Granula sank unter identischen Versuchsbedingungen der Anteil der während der ersten 10 min gebildeten 3-HV-Hexa- ( $m/z$  617) und 3-HV-Heptamere ( $m/z$  717) nach weiteren 20 min ab, wohingegen offensichtlich 3-HV-Tri- ( $m/z$  317) und 3-HV-Tetramere ( $m/z$  417) in annähernd gleichem molarem Verhältnis erschienen (Abb. 37) und sich der relative Anteil 3-HV-Pentamer ( $m/z$  517) auf 48 mol% erhöhte. Nach 12-stündiger Inkubation stellte schließlich auch hier, wie schon für PHB beobachtet, das Pentamer mit 52 mol% den Hauptanteil der entstandenen Oligomere dar. 3-HV-Hexa- oder 3-HV-Heptamere waren zu diesem Zeitpunkt nur noch mit einem Anteil von unter 5 % nachweisbar, jedoch erhöhte sich der Anteil des 3-HV-Tetramers auf 15 mol%, und mit 6,5 mol% wurde auch 3-HV-Dimer ( $m/z$  217) nachgewiesen. Zum Versuchsende waren offenbar Spuren von 3-HV-Monomeren ( $m/z$  117) vorhanden. Bei den in Abb. 37 A gezeigten Ionen mit  $m/z$  657,5 und  $m/z$  757,4 handelte es sich offenbar um Addukte des 3-HV-Hexa- bzw. 3-HV-Heptamer Anions (Kowalczyk, persönliche Mitteilung).



**Abb. 37:** Oligomere Abbauprodukte artifizieller amorpher PHV-Granula (stabilisiert durch Natriumcholot) nach Hydrolyse mit PhaZ7.

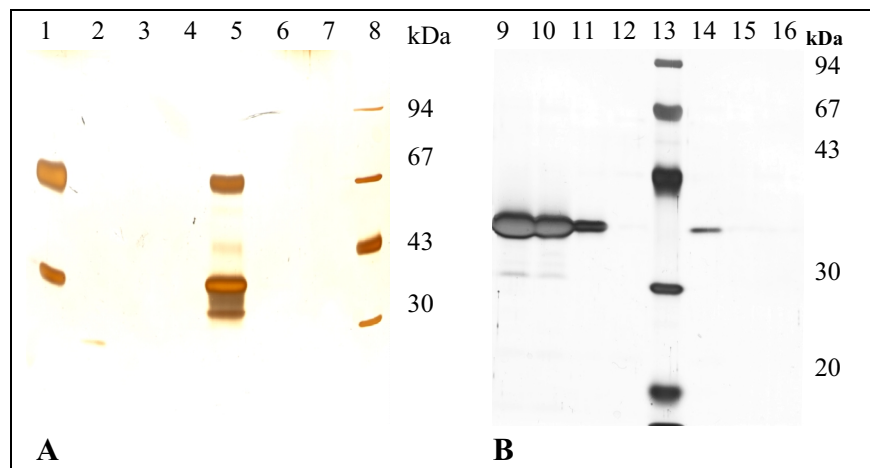
(A) Typisches ESI-Massenspektrum (Negativ-Modus) nach 12 h Inkubation des Polymers in Gegenwart von PhaZ7.

(B) Relative molare Zusammensetzung des Oligomerspektrums in Abhängigkeit vom Reaktionszeitpunkt. Der Ablauf entsprach Abb 35. (\*Für Erläuterungen siehe Text, Nomenklatur siehe Abb. 31).

Die Ergebnisse der Produktanalysen erklärten die unter 3.7.6.3. beschriebenen Befunde einer fehlenden Aktivität mit kurzkettigen 3-HB-Oligomereestern ( $C < 6$ ) sowie die beobachteten hohen Aktivitäten von PhaZ2 und PhaZ5 mit durch PhaZ7 hydrolysiertem nPHB. Ein solch ungewöhnliches Produktspektrum, einhergehend mit der offenbar hohen Spezifität für amorphes PHA<sub>SCL</sub>, und einem nahezu vollständigen Fehlen hydrolytischer Aktivität gegen oligomere 3-HB-Ester mit weniger als sechs Monomeruntereinheiten wurde in der verfügbaren Literatur bisher nicht beschrieben. PhaZ7 war offenbar eine echte extrazelluläre nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase mit präferentieller *endo*-Hydrolyseaktivität.

### 3.7.8. Spezifität der PHA-Hydrolyse durch PhaZ7 - Bindeexperimente mit denaturierten PHB-Granula

Wie unter 3.7.6.1. gezeigt, war die extrazelluläre nPHA<sub>SCL</sub> Depolymerase im Gegensatz zu den dPHB-Depolymerasen PhaZ2 und PhaZ5 offenbar nicht zur Hydrolyse denaturierter parakristalliner PHA in der Lage. Für extrazelluläre dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen wurde von verschiedenen Autoren die Notwendigkeit eines kristallinen Substratbereiches als essentiell für die Substratbindung und eine nachfolgende Depolymerisation von dPHA einhergehend mit dem Vorhandensein einer potentiellen Substratbindedomäne am N-Terminus des Proteins postuliert (SCANDOLA et al., 1997; HE et al., 2001; JENDROSSEK, 2001b; MURASE et al., 2002). Um zu prüfen, ob das beobachtete Fehlen der dPHA<sub>SCL</sub>-hydrolytischen Aktivität im Falle von PhaZ7 auf ein mangelndes Bindevormögen an parakristalline PHA zurückzuführen war, wurde das Enzym allein und in Gegenwart von PhaZ2 einem Bindungsassay nach 3.7.9. unterzogen. Wie aus Abb. 38 A zu erkennen, banden sowohl die dPHA-Depolymerase als auch die nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase unter schwach alkalischen Bedingungen (unter welchen beide Enzyme von *P. lemoignei* auch ins Medium sekretiert wurden, s. 3.4.) an dPHB-Granula und konnten mit diesen in einem Zentrifugationsschritt nahezu quantitativ aus dem Puffer entfernt werden. In einem weiteren Experiment konnte PhaZ7 nach Bindung an das parakristalline Polymer und einem Waschschrift durch Inkubation mit 50 % (v/v) Isopropanol in 25 mM 1,3-Diaminopropanpuffer wieder von den dPHB-Granula entfernt werden. Nach Abdampfen des Lösungsmittels (Gegenwart von 2-Propanol hemmte die nPHB-Hydrolyse, s. 3.7.10.) und Resuspendieren in Puffer waren 62 % der eingesetzten nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymeraseaktivität in dieser Fraktion nachweisbar. Die Ursache für ein Fehlen dPHA<sub>SCL</sub>-hydrolytischer Aktivität lag offenbar nicht in einer fehlenden dPHA-Bindekapazität begründet.

Legende:

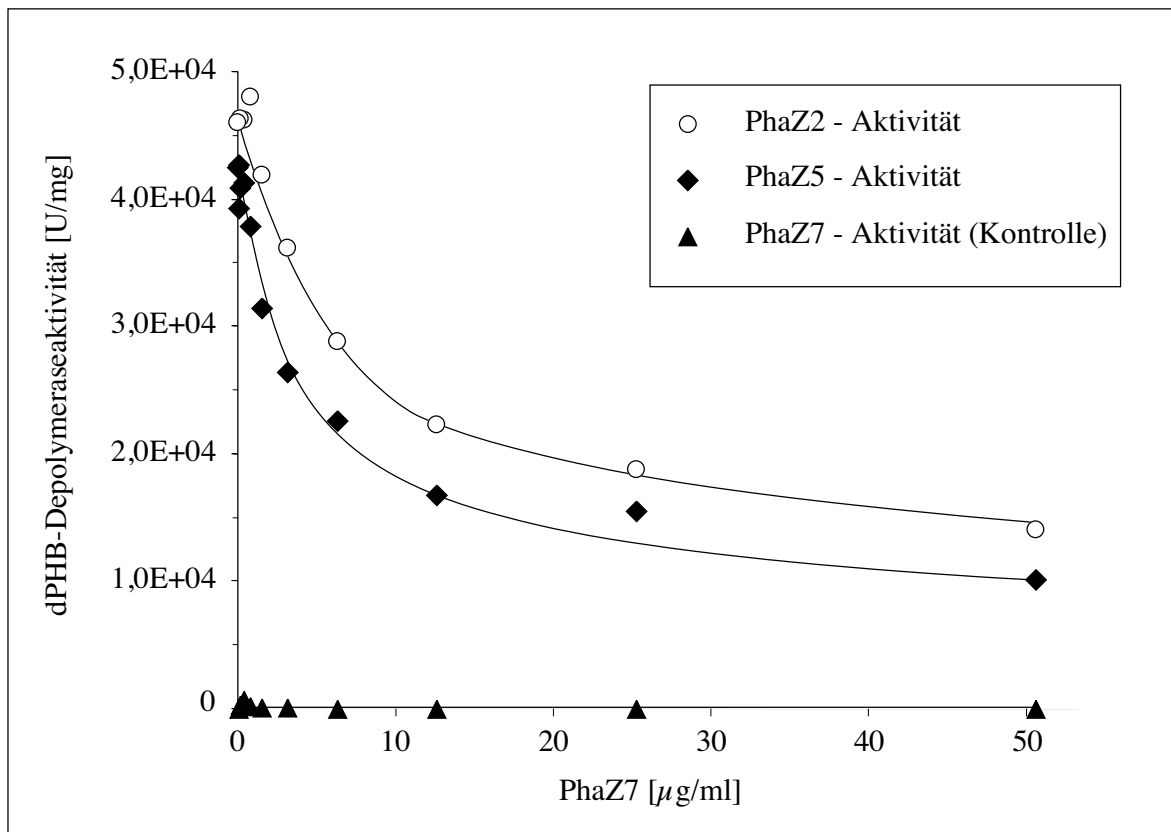
- |          |          |   |                |
|----------|----------|---|----------------|
| <b>A</b> | 1.       | Ansatz vor Granulazugabe = Start (10 $\mu$ l – 1,5 $\mu$ g Protein)   |                |
|          | 2.       | Überstand nach 5 min mit 30 mg dPHB bei 8°C (15 $\mu$ l)  |                |
|          | 3. u. 4. | Überstände der Waschschrte 10 und 15 min (15 $\mu$ l)   |                |
|          | 5.       | Granula nach 5 min (15 $\mu$ l der in 200 $\mu$ l 3x Denaturierungspuffer suspendierten und gekochten Granula. Ansatz färbte Bromphenolblau grün (Säurebildung während der 5 min bei 8°C durch PhaZ2) |                |
|          | 6. u. 7. | Frische Granula nach Inkubation mit 2. (erster Überstand) (in 200 $\mu$ l 3x Denaturierungspuffer suspendiert und von gekochten Ansatz 15 $\mu$ l aufgetragen)  |                |
|          | 8.       | LMW-Proteinstandard   |                |
| <hr/>    |          |   |                |
| <b>B</b> | 9.       | Ansatz vor Granulazugabe (4 $\mu$ l - 3,3 $\mu$ g Protein) = Start  | 170 U/ $\mu$ l |
|          | 10.      | Vereinigter Isopropanolwaschschritt der dPHB Pellets (4 $\mu$ l)  | 105 U/ $\mu$ l |
|          | 11.      | Überstand 1 der ersten Zentrifugation nach 5 min mit dPHB (4 $\mu$ l)   | 39 U/ $\mu$ l  |
|          | 12.      | Überstand 2 nach 5 min mit 10 mg frischem dPHB (10 $\mu$ l)   | 3 U/ $\mu$ l   |
|          | 13.      | LMW-Proteinstandard   |                |
|          | 14.      | Granula nach Extraktion mit 2-Propanol (10 $\mu$ l des in 120 $\mu$ l 3x SDS-Denaturierungspuffer suspendierten und gekochten Ansatzes)   |                |
|          | 15.      | Waschschritt (4 $\mu$ l)  | <0,2U/ $\mu$ l |
|          | 16.      | Waschschritt (10 $\mu$ l)   |                |

**Abb. 38:** Fraktionen des Bindeversuches von PhaZ2 + PhaZ7 (**A**) und PhaZ7 (**B**) mit dPHB-Granula nach SDS-PAGE (Silberfärbung). Die Proben wurden nach Zugabe der dPHB-Granula für die angegebenen Zeiten bei 8°C inkubiert. 1 U= 1  $\mu$ g nPHB-Granula/min.

### 3.7.9. Hemmung der dPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZ2 und PhaZ5 durch PhaZ7 – PhaZ7 als „dPHB-Depolymerase-Inhibitor“

Die Bindung von PhaZ7 an dPHB legte eine mögliche Beeinflussung der dPHA-Depolymeraseaktivitäten von PhaZ2 und PhaZ5 durch PhaZ7 über eine Konkurrenz um die Bindung an der dPHB-Granulaoberfläche nahe. Von MUKAI et al. wurde 1992 das Vorkommen großer Mengen eines als „PHB-Depolymerase-Inhibitor“ bezeichneten Proteins im Kulturüberstand von auf Succinat gewachsenen *P. lemoignei*-Kulturen beschrieben, dessen Funktion in einer direkten Inhibierung der dPHA-Depolymerasen bei Abwesenheit des Substrates dPHB bestehen sollte. Der physiologische Sinn eines solchen inhibitorisch wirkenden Proteins erschien zweifelhaft. Aus den veröffentlichten Daten (apparentes Molekulargewicht 35 kDa, Bindung an Kationentauscher) war zu vermuten, daß es sich bei dem beschriebenen Inhibitor um die in der vorliegenden Arbeit gereingte

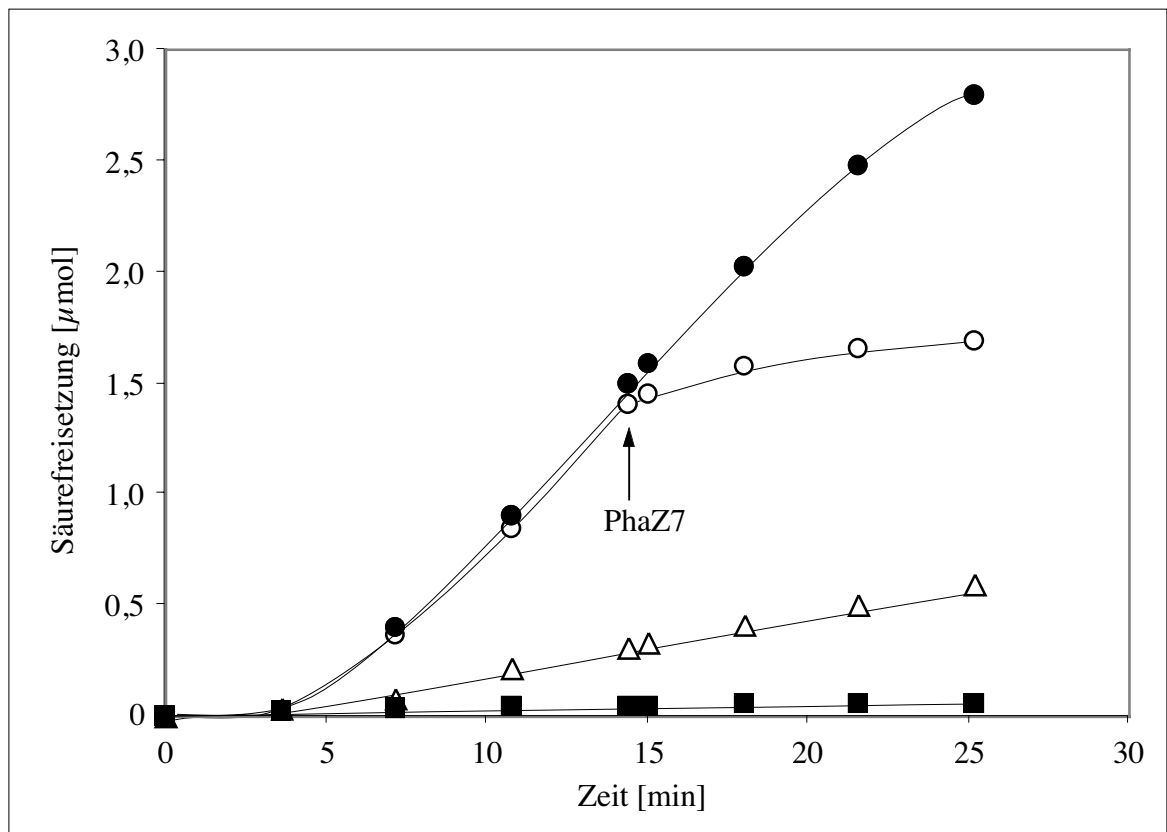
nPHB-Depolymerase PhaZ7 handeln könnte. Um diese Vermutung zu bestätigen und zugleich den von den Autoren postulierten Hemm-Mechanismus zu widerlegen, wurden neben Expressionsversuchen auf verschiedenen organischen Säuren und dPHA<sub>SCL</sub> (s. 3.4) im weiteren Inhibitionsversuche mit PhaZ2 sowie PhaZ5 in Gegenwart von PhaZ7 in unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen durchgeführt (Abb. 39). PhaZ5 wurde bereits bei Anwesenheit von 1,5 µg/ml PhaZ7 zu 50 % gehemmt. Für PhaZ2 lag die halbmaximale Hemmkonzentration bei 3,7 µg/ml PhaZ7.



**Abb. 39:** Hemmung der Hydrolyse von dPHB durch PhaZ2 und PhaZ5 in Abhängigkeit von der PhaZ7 Konzentration im Testansatz. dPHB-Suspensionen (Endvolumen 1 ml) wurden mit der angegebenen Menge PhaZ7 versetzt und die Reaktion nach Vorinkubation bei 37°C durch Zugabe von 0,69 µg PhaZ5 bzw. 0,86 µg PhaZ2 gestartet. 1 U = 1 µg PHB/min (Trübungstest nach 2.10.1.1.).

Wie aus den beschriebenen Versuchen ersichtlich, besaßen alle Depolymerasen eine hohe Affinität zu parakristalliner PHB. Auch im Titrationsexperiment konnte die Verringerung der dPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZ5 in Gegenwart von PhaZ7 bestätigt werden. Der Hemmeffekt trat hierbei sowohl bei Vorinkubation von dPHB mit PhaZ7 als auch bei Zugabe von PhaZ7 zu einer laufenden PhaZ5-Reaktion auf (Abb. 40). Die Ergebnisse bestätigten die von MUKAI et al. (1992) publizierten Beobachtungen, jedoch handelt es sich bei dem vermeintlichen Inhibitor um die n-PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase. Eine mögliche enzymatische Aktivität mit nPHA<sub>SCL</sub> war von den Autoren nicht untersucht worden.





**Abb. 40:** Hemmung der PhaZ5-abhängigen dPHB-Hydrolyse in Gegenwart von PhaZ7 im Titrstatexperiment. Als Kontrolle diente neben dem Leerwert ohne Enzym (■) ein Ansatz mit 0,5 µg PhaZ5 (●). In einem weiteren Test wurde dPHB mit 0,5 µg PhaZ7 vorinkubiert (△). Alle Reaktionsansätze enthielten 1 mg dPHB und wurden zum Zeitpunkt 4 min durch Zugabe von 0,55 µg PhaZ5 gestartet. Nach 15 min erfolgte die Zugabe von 5 µg PhaZ7 zu einer laufenden Hydrolyse (○).

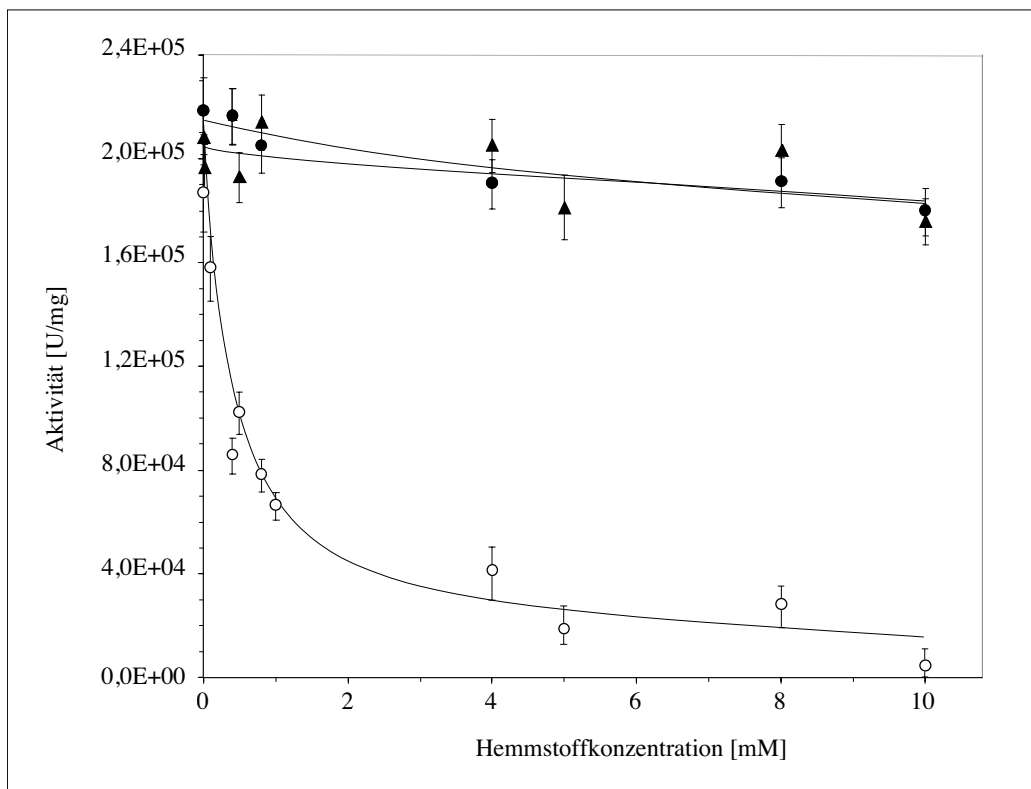
Da es sich bei PHB in seiner parakristallinen Form, ohne eine den nativen amorphen PHB-Granula eigene schützende Oberflächenstruktur aus amphiphilen Proteinen und Phospholipiden, um ein vergleichsweise hydrophobes Polymer handelte, lag die Vermutung nahe, daß auch andere Proteine zur (unspezifischen) Bindung an die Granulaoberfläche und damit zur Konkurrenz um die Substratbindung der dPHA-Depolymerasen in der Lage sein sollten. Tatsächlich wurde durch Zugabe von Super-Rich-, LB- oder NB-Stammlösungen sehr heterogener Protein/Peptid-Zusammensetzung (s. 2.2.2.) eine in ihren Wirkungen der genannten Reihenfolge entsprechende konzentrationsabhängige Hemmung der dPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZ5 und PhaZ2 erzielt. Auch mit BSA trat, jedoch erst bei etwa achtfacher Konzentration verglichen mit PhaZ7, eine signifikante Hemmung der Hydrolyse ein. Offenbar führte die Gegenwart von PhaZ7 und anderen Proteinen zu einer Inhibierung der Hydrolysierbarkeit von dPHB durch „Maskierung“ des Substrates. In diesem Falle sollte es bei Einsatz des von PhaZ2 und PhaZ5 hydrolysierbaren *p*-Nitrophenylbutyrates als Substrat (MÜLLER und JENDROSSEK, 1993; BRIESE et al., 1994b) zu keiner Verringerung der Esterspaltung kommen, da aufgrund der Löslichkeit des Esters eine Oberflächenlimitierung und die damit verbundene sterische Hinderung einer Enzymbindung an das Polymersubstrat entfallen sollte. Im entsprechenden Versuch zeigten weder PhaZ7 (6,3 µg/ml), welches selbst keine signifikante Aktivität mit dem Ester dieser Seitenkettenlänge besaß (s. 3.7.6.2., Abb. 30), noch LB- oder NB-Zugabe (10 %, v/v) eine

inhibitorische Wirkung auf die Esterhydrolyse durch dPHB-Depolymerasen. Die völlige Inaktivität von PhaZ5 mit biochemisch intakten nativen PHB-Granula (3.7.6.), welche durch Vorbehandlung der Granula mit Proteasen aufgehoben wurde, könnte neben anderen zu diskutierenden Effekten auch auf die „maskierende“ Wirkung der Granulaproteine und Phospholipide zurückgeführt werden. Eine direkte Inhibierung der dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase durch einen Proteininhibitor, wie von MUKAI et al. (1992) vorgeschlagen, war aufgrund der Ergebnisse auszuschließen. Bei PhaZ7 sollte es sich mit großer Sicherheit um den für *P. lemoignei* beschriebenen dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase-Inhibitor handeln.

### **3.7.10. Einfluß von Detergentien und Hemmstoffen auf die hydrolytischen Aktivitäten von nPHB-Depolymerase PhaZ7 und dPHB Depolymerase PhaZ5**

Da die Hydrolyse von PHA<sub>SCL</sub>, unabhängig vom physikalischen Zustand (der „Kristallinität“) des Polymers, eine Form der Esterspaltung in wässrigem Milieu darstellte, deren möglicher grundlegender Mechanismus für eine ganze Enzymklasse, die Serin-Hydrolasen (PERSSON et al., 1989; OLLIS et al., 1992; JAEGER et al., 1994, NARDINI und DIJKSTRA, 1999), charakteristisch ist, wurden Hemmtests mit Serin-Hydrolase-Inhibitoren durchgeführt (Abb. 41). Neben Dodecansulfonylchlorid (DDSC) wurde Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) auf eine mögliche inhibitorische Wirkung untersucht. Weder DDSC noch PMSF führten in Konzentrationsbereich unter 1 mM zu signifikanten Hemmeffekten. Wurden 10 mM Inhibitor eingesetzt, lag die verbliebene nachweisbare Depolymeraseaktivität noch immer bei 92 % (PMSF) bzw. 86 % (DDSC). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein weiteres hochtoxisches Substratanalogon, Diisopropylfluorophosphat (DFP), hinsichtlich einer Wirkung auf PhaZ7 getestet. Bereits in Konzentrationen unterhalb 1 mM war eine deutliche irreversible Hemmung der nPHB-Depolymeraseaktivität zu beobachten. Die halbmaximale effektive Hemmkonzentration lag bei 0,79 mM. DFP lag bei dieser Konzentration jedoch in deutlichem molaren Überschuß zum Enzym vor, was auf eine unter den Versuchsbedingungen relativ schlechte Zugänglichkeit des postulierten katalytisch aktiven Serins für den wasserlöslichen Inhibitor hinwies. Wurde in Puffer gelöstes DFP zur laufenden nPHB-Hydrolysereaktion zugegeben, konnten im beschriebenen Konzentrationsbereich keine signifikanten Wirkungen auf die Hydrolyserate beobachtet werden.

Wurde auf (Vor)titration der Hemmstoffstammlösungen verzichtet, kam es zur Überlagerung der unter 3.7.4. beschriebenen pH-abhängigen Inaktivierung von PhaZ7 mit der Hemmung durch den Serin-Hydrolase-Inhibitor. In diesem Falle wurde eine > 97 %-ige Verringerung der Aktivität bereits ab einer Konzentration von 0,8 mM DFP beobachtet.



**Abb. 41:** Einfluß von Serin-Hydrolase-Inhibitoren auf die Aktivität von PhaZ7. 2,5 ng Enzym wurden in 25 µl Hemmstofflösung der angegebenen Konzentrationen DFP (○), PMSF (▲) oder DDSC (●) für 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert und die verbliebene nPHB-Hydrolyseaktivität im turbidimetrischen Test (2.10.1.2.) ermittelt. Ansätze mit PMSF oder DDSC enthielten bis zu 10 % (v/v) 2-Propanol. Da das Lösungsmittel die Aktivität im Testansatz verringerte (s. Tab. 17), wurden die zugehörigen Aktivitäten um den Betrag der Lösungsmittel-Kontrolle ohne Hemmstoff korrigiert.

Gegenüber ionischen (SDS) und nichtionische Detergentien (Tween20, Tween80, TritonX100) zeigte sich die nPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZ7 selbst bei hohen Detergenz-Konzentrationen inert (Tab. 16). Insbesondere mit Blick auf die inhibitorische Wirkung von Suspensionsstabilisatoren auf die Esteraseaktivität (s. 3.7.6.2.) war die mit Tween20 oder SDS erzielte Aktivierung um bis zu 30 % bzw. 102 % bemerkenswert. Auch die Zugabe von Natriumcholat bis 150 mM führte zu keiner signifikanten Änderung der nPHB-Hydrolyserate von PhaZ7. Im Gegensatz dazu verringerte sich die dPHB-Hydrolyse durch Depolymerase A (PhaZ5) bereits in Gegenwart von 0,02 % (v/v) Tween 80 oder TritonX100 um >90 % und lag in Gegenwart von 0,2 % (w/v) SDS um 55 % niedriger.

Um einen Einfluß der Detergenzkonzentration auf die Trübung der PHA-Suspension als Ursache einer nur scheinbaren Aktivierung ausschließen zu können, wurden Test auf Basis der Erfassung freiwerdender Säuregruppen im Titristaten durchgeführt. Das Ausmaß der Aktivierung in Gegenwart von SDS konnte anhand der Hydrolyse nativer PHB-Granula aus rekombinanten *E. coli* HMS174 (*phaABCP<sub>Re</sub>*, DENNIS et al., 1995; Gewinnung s. 2.4.2.) bestätigt werden. Entscheidenden Einfluß hatte die Reihenfolge der Zugabe der Testkomponenten (Abb. 42). So wurde die maximale Steigerung der Hydrolyserate um 100 % in Gegenwart von 2 % (w/v) SDS nur erreicht, wenn nPHB und Detergenz vor Enzymzugabe vorinkubiert wurden. Bei zeitgleicher Zugabe von SDS und Depolymerase lag die Erhöhung nur bei maximal 20 %.

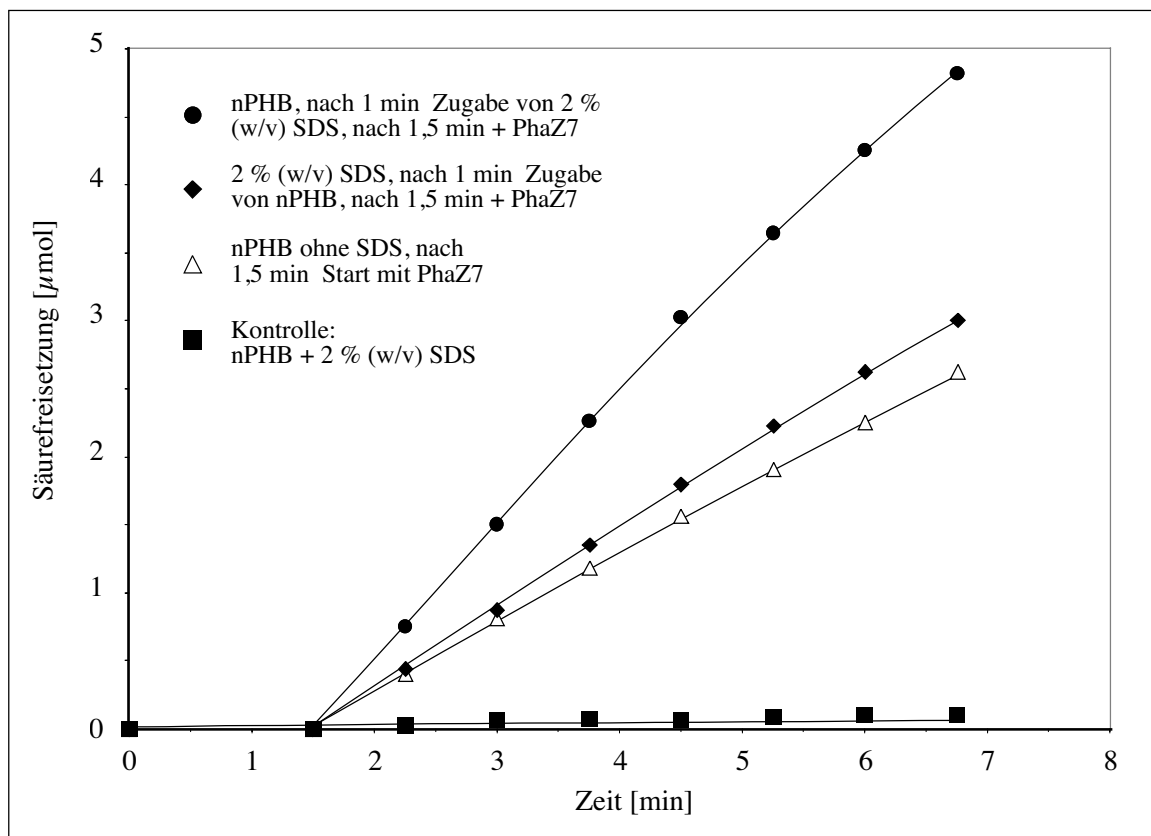
**Tab. 16:** Einfluß von Detergentien auf die nPHB Depolymeraseaktivität von PhaZ7 und die dPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZ5.

	Aktivität PhaZ7		Aktivität PhaZ5	
	[10 <sup>4</sup> x U/mg]	[%]	[10 <sup>4</sup> x U/mg]	[%]
<u>Tween20</u> (v/v)				
20 %	17,1	113	-	-
10 %	18,8	124	0,09	5
2 %	16,8	111	0,2	11
0,2 %	19,8	130	0,2	10
0,02 %	17,5	115	0,2	10
<u>Tween80</u> (v/v)				
20 %	18,0	119	-	-
10 %	15,8	104	0,09	6
2 %	14,9	100	0,2	8
0,2 %	19,2	127	0,1	8
0,02 %	17,8	118	0,1	10
<u>TritonX100</u> (v/v)				
20 %	16,0	105	-	-
10 %	15,1	100	0,06	4
2 %	13,8	91	0,1	6
0,2 %	14,4	95	0,1	7
0,02 %	16,2	107	0,1	6
<u>SDS</u> (w/v)				
2 <sup>a)</sup>	1,59 <sup>a)</sup>	202 <sup>a)</sup>	0,2	15
0,2	23,3	154	0,6	45
0,02	19,5	128	1,0	71

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Werte im turbidimetrischen Test nach 2.10.1.2. bestimmt (1 U = 1 µg PHB min<sup>-1</sup>). Zu jeder Meßreihe wurden eine separate Detergenz-freie Ansätze als Kontrolle (100 %) mitgeführt.

<sup>a)</sup> Titrationsexperiment nach 2.10.1.5. (100 % = 0,79 µmol Säure/min x mg).

Im Gegensatz zu den in Abbauversuchen mit Polymersuspensionen erhaltenen Ergebnissen verursachte die Gegenwart von SDS im Esterasetest mit *p*-NP-Octanoat bereits ab 0,02 % (w/v) eine nahezu vollständige Inhibition der PhaZ7-Aktivität (98 % Hemmung). Wurde einer laufenden Ester-Hydrolysereaktion 0,001 % (w/v) SDS zugesetzt, so kam diese unmittelbar zum Erliegen. Die Esteraseaktivität der im Versuch als Positivkontrolle eingesetzten Lipase aus *P. aeruginosa* verringerte sich unter diesen Bedingungen um 30 %. Offenbar ermöglichte die Gegenwart von Detergentien im Falle der Hydrolyse nativer PHB-Granula eine Verbesserung der Substratverfügbarkeit, durch Veränderungen der Oberflächenstruktur bzw. Störung der Beschaffenheit der Granulahülle (s. Modell der Granula unter 1.3., Abb. 1), während es im Falle der *p*-Nitrophenylester durch die Anlagerung von Detergentien in Sinne eines Lösungsvermittlers zur starken Erhöhung der Esterlöslichkeit und damit verbunden offenbar zu einer schlechteren Affinität zum Enzym kam.



**Abb. 42:** Aktivierende Wirkung von Detergentien auf die nPHB-Hydrolyseaktivität von PhaZ7 am Beispiel von SDS (Endkonzentration 2 %, w/v). Im Test (5 mg nPHB) wurden 63 ng Enzym eingesetzt. Die Titration freier Säuregruppen erfolgte nach 2.10.1.5.

Zur Detektion weiterer für die katalytische Funktion möglicherweise essentieller Gruppen, wurden die Enzyme mit weiteren Agentien versetzt, bis zu 10 min bei 21°C inkubiert und anschließend die nPHB-Hydrolyseaktivität nach 2.10.1.2. getestet (Tab. 17). Um eine Beteiligung von Cysteinresten an einer möglichen Stabilisierung des Enzyms über Disulfidbrücken zu prüfen, wurde PhaZ7 mit bis zu 400 mM DTT (50 mM Endkonzentration im Trübungstest) oder 67 mM 2-Mercaptoethanol (Endkonzentration 10 mM) als Reduktionsmittel inkubiert. Die Enzymaktivität blieb jedoch unter diesen Bedingungen nahezu unverändert. Im Gegensatz dazu wurde PhaZ5 bereits in Gegenwart von 1 mM DTT signifikant gehemmt. Ellman-Reagenz (Dithiodinitrobenzoat, DTNB), welches zur Derivatisierung und damit zur Titration von -SH Gruppen verwendet werden kann, führte bei einer Endkonzentration von 10 mM nur in Ansätzen ohne pH-Kontrolle zu einer über 75 %-igen Verringerung der Aktivität von PhaZ7. Da der pH-Wert in diesen Ansätzen unterhalb 4,0 lag und das Enzym somit, wie unter 3.7.4. gezeigt, nur noch geringe Stabilität besaß, lag möglicherweise ein irreversible pH-abhängige Inaktivierung vor. Diese Vermutung wurde durch das Ausbleiben einer Reaktivierung nach Zugabe von DTT sowie einem nahezu vollständigen Verlust der Hemmwirkung bei Einsatz von auf pH 6,5 vortitriertem DTNB bestätigt. Eine Alkylierung von Cysteinseitenketten durch Jodacetamid schien offenbar ebenfalls die hydrolytische Aktivität nicht zu beeinflussen. Selbst 10 mM Jodacetamid führten nur zu 14 % Hemmung. Diese geringen Effekte sind bemerkenswert, da auch Histidinreste in Gegenwart des Alkylierungsreagenz modifiziert werden können. Kaliumcyanid

und Natriumazid ließen in Konzentrationen bis 10 mM ebenfalls keine Hemmwirkung auf die nPHB-Depolymeraseaktivität erkennen, so daß eine unmittelbare Beteiligung von Metallionen an der Katalyse offenbar auszuschließen war. *p*-Hydroxy-Mercuribenzoat als potentieller Inhibitor funktioneller –SH Gruppen zeigte bis zu einer Konzentration von 10 mM ebenfalls keine über 8 % Inhibierung hinausreichenden Hemmeffekte.

Die Gegenwart von Alkoholen (Ethanol, *n*-Propanol, 2-Propanol) im Testansatz führte zur signifikanten Hemmung der nPHB-Hydrolyse. Alkoholkonzentrationen oberhalb 20 % (v/v) führten in Abwesenheit des Enzyms bereits zu einer Trübungsabnahme der PHB-Suspension. Ein vollständiger Verlust der enzymatischen Aktivität von PhaZ7 durch 2-Propanol trat erst bei Konzentrationen oberhalb 50 % (v/v) ein.

Die gefundenen Stabilitäts-/Reaktivitätsmuster ergaben keine Hinweise auf eine Beteiligung funktioneller Sulfhydrylgruppen und Metallionen an der unmittelbaren Katalyse der Esterspaltung durch PhaZ7. Das Enzym wurde aufgrund der deutlichen irreversiblen Hemmung durch DFP der Klasse der Serin-Hydrolasen zugeordnet, deren Vertreter sich durch das Vorhandensein eines hochreaktiven Serin-Restes im katalytischen Zentrum auszeichnen.

**Tab. 17:** Stabilität und nPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZ7 sowie dPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZ5 in Gegenwart reduzierender bzw. oxydierender Agenzien, Enzymgifte und Alkohole.

Hemmstoff [mM]	Aktivität PhaZ7		Aktivität PhaZ5	
	[10 <sup>4</sup> x U/mg]	[%]*	[10 <sup>4</sup> x U/mg]	[%]*
<u>p-Hydroxymercurybenzoat</u>				
10	12,1	95	n.b.	n.b.
1	11,8	93	1,4	97
<u>Kaliumcyanid</u>				
10	12,5	99	1,2	88
1	11,8	93	1,4	97
<u>Natriumazid</u>				
10	13,1	100	n.b.	n.b.
1	13,0	100	n.b.	n.b.
<u>Jodacetamid</u>				
10	10,9	86	1,5	79
1	11,4	91	1,8	95
<u>2-Mercaptoethanol</u>				
10	11,8	93	n.b.	n.b.
1	12,3	97	n.b.	n.b.
<u>DTT</u>				
25	11,4	90	n.b.	n.b.
10	11,9	94	0,2	16
1	12,1	95	0,8	54
<u>Dithiodinitrobenzoat</u>				
10	11,9	94	1,4	98
1	12,4	98	1,5	100
<u>Ethanol [% , v/v] <sup>a)</sup></u>				
10	15,7	58	0,9	46
5	19,7	96	1,4	71
<u>n-Propanol [% , v/v] <sup>a)</sup></u>				
10	10,1	50	0,1	5
1	12,9	64	0,3	14
0,1	16,4	82	1,23	64
<u>2-Propanol [% , v/v] <sup>a)</sup></u>				
10	13,6	67	0,5	26
1	14,1	70	1,0	51

Je 10 µl PhaZ7 (5 ng) wurden mit 20 µl erforderlichenfalls titrierter 10-fach konzentrierter Hemmstofflösung verdünnt und 10 min bei RT vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der verbliebenen Aktivität in 250 mM Tris-HCl, pH 9 und 1mM CaCl<sub>2</sub> im Test nach 2.10.1.2.

\* Die Angaben wurden auf %-Aktivität normalisiert, um die Vergleichbarkeit der mit unterschiedlichen nPHB-Präparationen gewonnenen Daten zu gewährleisten. Alle Werte wurden auf die im entsprechenden Einzelexperiment mitgeführte Kontrolle ohne Hemmstoff (100 %) bezogen, wobei die Enzyme analog den Hemmstoffansätzen, jedoch ausschließlich in Tris/HCl, 250 mM (pH 9,0) verdünnt, für 5 min bei 21°C vorinkubiert wurden. Um Effekte der Hemmstoffe auf die PHB-Granula-Suspensionen zu erfassen, wurden entsprechende Ansätze ohne Enzym mitgeführt.

<sup>a)</sup> Versuche mit Alkoholen wurden ohne Vorinkubation ausgeführt, um den unmittelbaren Einfluß auf die Polymerhydrolyse zu testen.

### 3.8. Klonierung des nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasegenes, *phaZ7*, aus *P. lemoignei*

Die Mehrzahl der bekannten extrazellulären dPHA-Depolymerasen konnte bisher durch klassische Genbank-Klonierung in *E. coli* und Detektion von auf dPHA<sub>SCL</sub>- (oder dPHA<sub>MCL</sub>-Latex)-Overlay-Komplex- oder Mineralmedienagarplatten (s. 2.2.5.) Aufklarungszonen-bildenden Transformanten nachgewiesen werden. Mit dieser Strategie ließen sich, neben einer Reihe von dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen, wie dPHB-Depolymerase aus *Alcaligenes faecalis* T1 (SAITO et al., 1989), dPHB-Depolymerase aus *Comamonas* sp. (JENDROSSEK et al., 1995b), dPHB-Depolymerase aus *Streptomyces exfoliatus* K10 (KLINGBEIL et al., 1996) und PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerase aus *P. fluorescens* GK13 (SCHIRMER und JENDROSSEK, 1994; SCHIRMER et al., 1995), auch die zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannten Gene *phaZ1* (JENDROSSEK et al., 1993b), *phaZ2*, *phaZ3* (BRIESE et al., 1994b), *phaZ4*, *phaZ5* (JENDROSSEK et al., 1995b; MÜLLER, 1992) sowie *phaZ6* (SCHÖBER et al., 2000) aus *P. lemoignei* klonieren. Eine begrenzte Stabilität des amorphen 3-HB-Polymers in Form der nativen PHB-Granula stand jedoch der Etablierung einer dem beschriebenen Screeningverfahren auf dPHA-Depolymeraseaktivität analogen Methode entgegen. Mit zunehmendem Kristallisationsgrad des Polymers in wässrigem Milieu wäre ein Nachweis von nPHB-Depolymeraseaktivität nicht mehr möglich. Stattdessen müßte mit einer zunehmenden Zahl falsch positiver Klone gerechnet werden, welche die Gene der mindestens sechs bisher identifizierten dPHA-Depolymerasen exprimierten und gute Aktivitäten mit parakristallinem Polymer zeigten. In entsprechenden Vorversuchen mit verfügbaren dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* konnte außerdem für PhaZ1, PhaZ2 (s 3.7.6., Tab. 14), PhaZ4 sowie dPHB-Depolymerase aus *S. exfoliatus* K10 (rekombinante Enzyme) [im Gegensatz zu PhaZ5 und einer dPHB-Depolymerase aus *Comamonas* sp.] sowohl im Trübungstest nach 2.10.1.5. als auch durch anschließende Produktbestimmung mittels 3-HB-Dehydrogenaseassay (2.11.1.) eine geringe jedoch offenbar signifikante nPHB-Hydrolyse nachgewiesen werden. Bereits bei der Klonierung der dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ6 aus *P. lemoignei* wurde bei 6500 Transformanten (2-10 kbp-Inserts in *MboI*-Genbank) 3 x *phaZ1*, 2 x *phaZ2*, 1 x *phaZ5* und nur 1 x *phaZ6* kloniert, was das Problem möglicher falsch positiver Klone verdeutlicht (SCHÖBER, 1997). Desweiteren wäre eine Expression der Aktivitäten in den favorisierten pBluescript-/pUC-Vektoren an die richtige Orientierung des inserierten Genes zum *lac*-Promotor gekoppelt. Eine heterologe Expression und der Nachweis von Enzymaktivität erschien also für ein Screening *phaZ7*-positiver Klone weniger geeignet.



### 3.8.1. Gewinnung spezifischer Oligonukleotidsonden

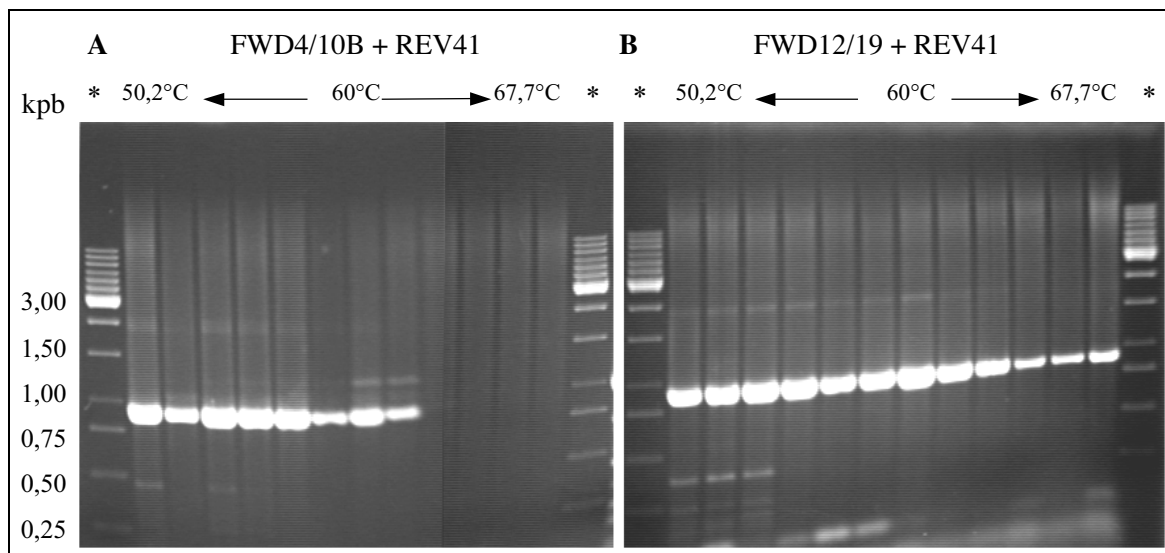
Eine Identifizierung potentieller *phaZ7*-Klone aus vorangereicherten partiellen Genbanken in *E. coli* XL1-Blue und *E. coli* DH5 $\alpha$  durch Koloniehybridisierung mittels Oligonukleotidsonde wurde präferiert, da das Protein aus *P. lemoignei* in ausreichender Menge und Reinheit für eine Spaltungsanalyse zur Generierung interner Peptide (3.6.) zur Sequenzbestimmung im Edman-Abbau isoliert werden konnte. Aus den erhaltenen Proteinsequenzen (Tab. 13) wurden degenerierte Primer für eine PCR-Amplifikation interner Genabschnitte des Strukturgenes der reifen nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase abgeleitet (Tab. 18; Primerentwurf s. 2.17.16.).

**Tab. 18:** Aus den Aminosäuresequenzen ausgewählter Peptide abgeleitete degenerierte PCR-Primer.

<b>N-Terminus des reifen Proteins (Pos. 4 bis 10)</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>V</b>	
Primer FWD 4/10A	5' - GGN	ACN	AA Y	TCN	GGI	TTY	GT -3'	
Primer FWD 4/10B	5' - GGN	ACN	AA Y	AGY	GGI	TTY	GT -3'	
<b>N-Terminus des reifen Proteins (Pos. 12 bis 19)</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>Q</b>	<b>T</b>	<b>Q</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>
Primer FWD 12/19	5' - AAR	GGN	ACN	CAR	ACI	CAR	TAY	GC -3'
<b>tryptisches Peptid F41</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>Q</b>	
Primer REV41	3' - TTR	TGI	CCN	CGN	TAD	TAD	GT Y -5'	

*Legende:* D: A+T+G; I: Deoxyinosin; R: A+G; N: A+C+T+G; Y: C+T

Bereits in der „touch down“-PCR mit nach 2.17.2. isolierter genomischer DNA aus *P. lemoignei* konnten Primerpaare identifiziert werden, welche offenbar zu einer begrenzten Zahl spezifischer Produkte führten. Die PCR-Reaktionen mit den Primerkombinationen FWD4/10A+REV41, FWD4/10B+REV41 sowie FWD12/19+REV41 wurden in Form einer Temperaturgradienten-PCR (2.17.15.) bei Annealingtemperaturen von 50,2 bis 67,7°C wiederholt. Die Kombination FWD4/10A+REV41 ergab zwei Fragmente ähnlicher Intensität (0,95 bzw. 1,2 kbp) jedoch sank die bereits bei Temperaturen unter 58°C geringe Produktausbeute ab 60°C drastisch. Auch mit FWD4/10B+REV41 war bei Temperaturen oberhalb 62°C kein Produkt mehr nachweisbar. Mit FWD12/19+REV41 hingegen trat ein dominantes DNA-Fragment von 921 bp in einer Konzentration >100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  auf (Abb. 43). Ausbeute und Reinheit erschienen für die Kombination FWD12/19+REV41 bei 60°C Annealingtemperatur optimal. Das Produkt diente nach Elektroelution aus dem Agarosegel (2.17.6.2.) der Herstellung DIG-Oxygenin-11-dUTP markierte Sonden mit Hilfe des Klenow-Fragmentes (2.17.9.).



**Abb. 43:** Temperaturgradienten-PCR mit aus den Sequenzen interner Peptide von *PhaZ7* abgeleiteten degenerierten Primern (A: FWD4/10B + REV41; B: FWD12/19 + REV41).

Die Ansätze enthielten 1 µg Template, 100 pmol Primer, 1,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl PCR-Puffer (10x), 2 µl je 2,5 mM dNTP, 35,5 µl H<sub>2</sub>O und 6 U *Taq*-Polymerase. Nach dem initialen Denaturieren der DNA (3 min 95°C) erfolgte das Anlagern der Primer in einem Temperaturgradienten (1 min bei 50,2; 50,6; 51,9; 53,8; 55,9; 57,9; 60; 62,1; 64,2; 66,1; 67,3 und 67,7°C von links nach rechts) und die Amplifikation für 1 min 20 s bei 72°C. Anschließend wurde erneut 30 s bei 95°C denaturiert und der Zyklus insgesamt 30 mal wiederholt bevor die Reaktion durch abschließende Elongation bei 72°C und Abkühlen auf 4°C beendet wurde.

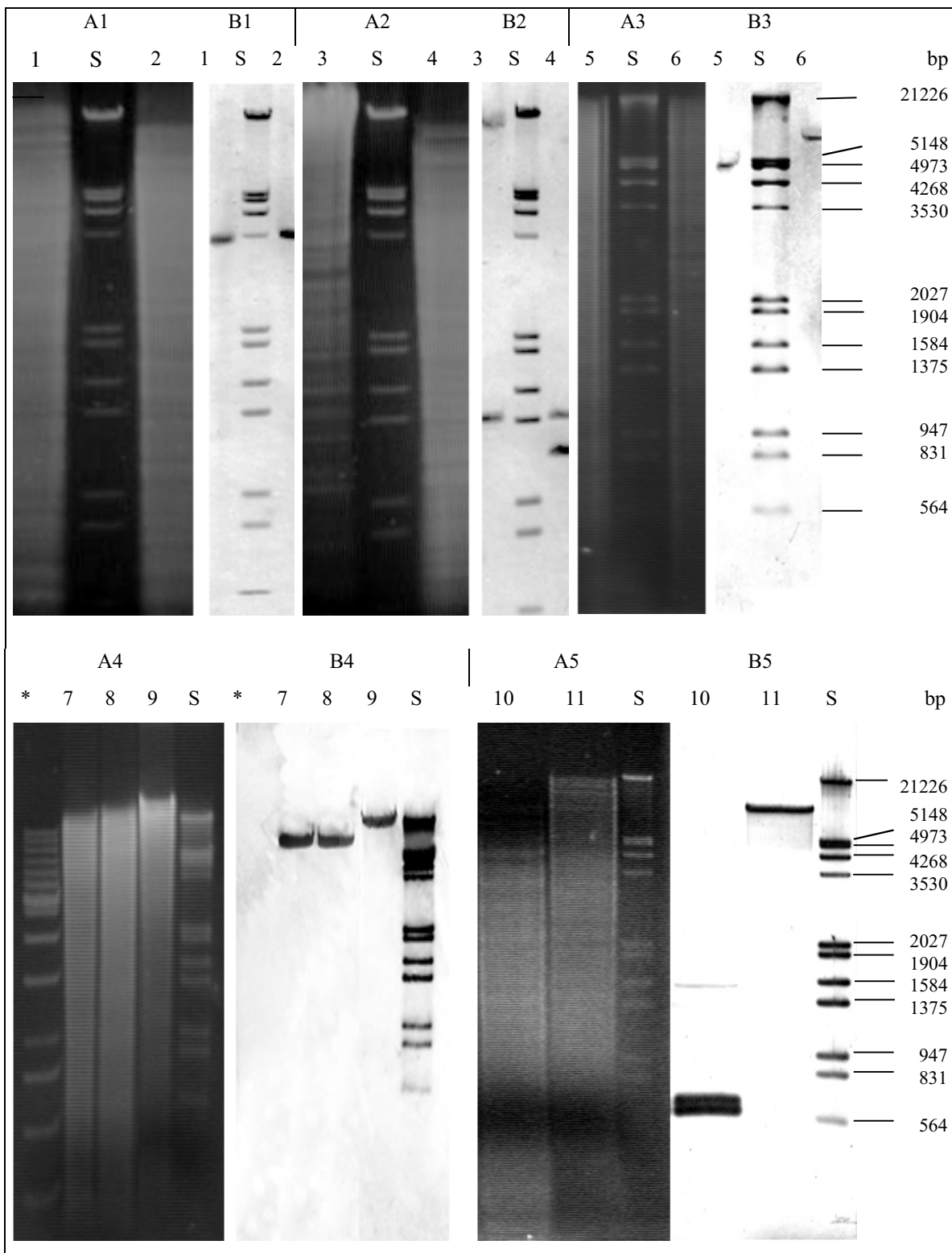
### 3.8.2. Versuch der Klonierung von *phaZ7* in *E. coli* DH5α

Zur Gewinnung genomischer Klone wurden Southern-Blots von mit ausgewählten Restriktionsendonukleasen vollständig verdauter Gesamt-DNA aus *P. lemoignei* mit der nach 3.8.1. gewonnenen 921 bp Oligonukleotidsonde unter stringenten Bedingungen bei 63°C hybridisiert (2.17.13.). Für das potentielle Strukturgen wurde ausgehend von der unter 3.7.1.3. bestimmten Molekülmasse des reifen Proteins je nach Länge des zu erwartenden Präprotein-kodierenden Bereiches eine Größe zwischen 1,0 und 1,1 kbp angenommen. Um das Risiko zu minimieren, daß zur Klonierung eingesetzte Restriktionsenzyme innerhalb des Strukturgenes *phaZ7* schneiden, wurde das PCR-Fragment FWD12/19+REV41 mit den ausgewählten Restriktionsendonukleasen überprüft.

Die 921 bp Sonde reagierte spezifisch mit einem 23 kbp *Sma*I-, 22 kbp *Bam*HI-, 19 kbp und 1,4 kbp *Sac*I-, 14 kbp *Hind*III-, 11 kbp *Eco*RI-, 7,3 kbp *Pvu*II-, 4,9 kbp *Sal*I-, 3,4 kbp *Pvu*I-, 0,6 bzw 0,68 kbp (Doppelbande) *Bgl*I-, und 3,5 kbp *Pst*I-Fragment (Abb. 44). Ein Doppelverdau mit *Sac*I/*Pst*I ergab ein dominierendes 1,2 kbp sowie ein 1,4 kbp Signal (schwächere Bande). Das *Pst*I-Fragment erschien aufgrund seiner Größe für eine Klonierung des gesamten Genes geeignet. Das Vorhandensein der gewünschten DNA-Fragmente in dem mittels Elektroelution aus Agarosegelen (2.17.6.2.) isolierten DNA-Fragmentgemisch (Größenbereich: 3,4 bis 3,7 kbp) wurde durch Southern-Blot oder Dot-Blot bestätigt. Anschließend wurden die *Pst*I-Fragmente mit entsprechend verdautem und dephosphoryliertem pBlueskript KS' Vektor ligiert. Das Einbringen der Plasmide in nach 2.17.8.2. präparierte *E. coli* DH5α erfolgte durch Elektrottransformation (2.17.8.5.). Die Transformationseffizienz lag zwischen 64 bis 80 % im Vergleich zu ungeschnittenem Vektor. Es

wurde eine partielle *PstI*-Genbank von etwa 3000 Klonen angelegt. Durch Koloniehybridisierung mit der 921 bp Sonde konnten 3 potentielle Klone detektiert werden. Nach einem Vereinzlungsschritt auf LB/Ampicillin-Agar wurden die Plasmide isoliert und mittels *EcoRI*-Verdau überprüft. Keiner der drei Klone schien jedoch das ursprünglich klonierte 3,5 kbp *PstI*-Fragment zu enthalten. Da die Qualität der isolierten *PstI*-Fragmente durch Hybridisierung mit der verwendeten Sonde gesichert war, und das gleiche Phänomen auch bei Wiederholung des Experimentes trotz Kontrolle der Insertqualität aufzutreten schien, war eine mögliche toxische Wirkung des Genproduktes (oder dessen Überproduktion infolge der Klonierung von in *E. coli* erkannten Promotorbereichen aus *P. lemoignei*) von *phaZ7* oder dem Strukturgen auf den zu klonierenden Fragmenten benachbarte Genen nicht auszuschließen. Mittels PCR konnte, basierend auf einer Kombination der vektorspezifischen T3/T7-Primer und Fragment-internen Primern, die erfolgreiche Integration des gesuchten 3,5 kbp Fragmentes in pBlueskript KS<sup>-</sup> nachgewiesen und somit eine fehlerhafte Ligation als Ursache des Klonierproblems ausgeschlossen werden (s. 3.8.3.). Ein ähnliches Phänomen wurde von GRZESZIK (1996) für die Klonierung eines Hydrogenase-Genklusters aus *Rhodococcus opacus* nach *E. coli* XL1blue mittels pBlueskript SK<sup>+</sup> beobachtet. Die erhaltenen Klone waren trotz Ampicillinzusatz instabil und in Plasmidisolierungen wurden stets Plasmide mit signifikant verkürzter Insert-DNA erhalten. Die Autorin beschrieb einen Zusammenhang zwischen Genexpression und Insertgröße und zeigte durch Subklonierung, daß es sich bei den exzidierten Fragmentabschnitten offenbar um Promotorbereiche in Kombination mit potentiell toxischen Strukturgenen handelte.

Die Vermutung einer genetischen Instabilität des *PstI*-Cointegrates in *E. coli* DH5 $\alpha$  schien durch die nachfolgende problemlose Klonierung eines *BglI*-Fragmentes aus *P. lemoignei* mittels Restriktionsligation (2.17.5.10.) bestätigt zu werden. Dieses Fragment beinhaltete nur 550 bp des 5'-Endes des Gens.



**Abb. 44:** Southern-Hybridisierung restriktionsverdauter Gesamt-DNA aus *P. lemoignei*. (A) Trennung der Restriktionsfragmente im 1 %-igen Agarosegel und Ethidiumbromidfärbung (2.17.5.6.). (B) Hybridisierung der DNA-Blots nach 2.17.13.: mit der unter 3.8.1. gewonnenen 921 bp Sonde (FWD12/19+REV41).

- |   |   |
|---|---|
| 1. <i>PvuI</i> -gespaltene Gesamt-DNA                 | 7. <i>EcoRI</i> -gespaltene Gesamt-DNA      |
| 2. <i>PstI</i> -gespaltene Gesamt-DNA                 | 8. <i>PvuII</i> -gespaltene Gesamt-DNA      |
| 3. <i>SacI</i> -gespaltene Gesamt-DNA                 | 9. <i>SmaI</i> -gespaltene Gesamt-DNA       |
| 4. <i>SacI/PstI</i> -gespaltene Gesamt-DNA            | 10. <i>BglI</i> -gespaltene Gesamt-DNA      |
| 5. <i>SalI</i> -gespaltene Gesamt-DNA                 | 11. <i>EcoRV</i> -gespaltene Gesamt-DNA     |
| 6. <i>EcoRI</i> -gespaltene Gesamt-DNA                |   |
| S DIG III DNA-Längenstandard (Roche Diagnostics GmbH) | * 1 kbp-Ladder DNA Standard (MBI-Fermentas) |

### 3.8.3. Bestimmung der Nukleotidsequenz von *phaZ7* durch „PCR-Walking“ und partielle PCR-Klonierung

Aufgrund der unter 3.8.2. beschriebenen Probleme bei der direkten Klonierung des *phaZ7* Strukturgenes aus *P. lemoignei* mit den flankierenden Regionen wurde ein unkonventioneller Ansatz zur Bestimmung der Gensequenz von *phaZ7* gewählt. Die Methode basierte auf einer PCR-Amplifikation von Teilen der in pBlueskript ligierten genomischen DNA-Fragmente mit Hilfe von jeweils *phaZ7*- und *pBlueskript*-spezifischen Primerpaaren (Abb. 45). Durch ein „PCR-Walking“ war es möglich, ausgehend von den ermittelten Sequenzen der PCR-Produkte (direkte Sequenzierung nach 2.17.19.1., oder Subklonierung in pBlueskriptKS<sup>-</sup> mit anschließender T3/T7-Sequenzierung) neue Primer zu entwerfen, um weiter entfernte Bereiche zu amplifizieren und ebenfalls einer Sequenzierung zugänglich zu machen.

Um die für eine solche Vorgehensweise notwendigen ersten Strukturgen-bezogenen Sequenzdaten zu erhalten, wurde das als Ausgangsmaterial für die DNA-Sondenherstellung gewonnene interne 921 bp PCR-Fragment FWD12/19+REV41 nach einer Behandlung mit Vent®-Polymerase mittels Restriktionsligation (in Gegenwart des Restriktionsenzymes; s. 2.17.5.10.) in *EcoRV* geschnittenen pBlueskript KS<sup>-</sup> ligiert und durch Elektrotransformation nach *E. coli* DH5 $\alpha$  (2.17.8.5.) kloniert. In der Koloniehybridisierung mit der homologen Sonde (s. 2.17.12.; 2.17.13.) wurden 64 von 110 Klonen positiv identifiziert und nach der Bestätigung des PCR-Insert-Einbaus durch RENC-Verdau die Nukleotidsequenz des Klones pKSPCR41-2 nach 2.17.19.1. bestimmt. Durch die eindeutige Zuordnung der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu internen Peptidfragmenten aus der Aminosäuresequenzierung (s. 3.6.2.; Tab. 13) konnte die Klonierung des partiellen Genes der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase *PhaZ7* aus *P. lemoignei* bestätigt werden. Die aus der Sequenz abgeleiteten vermeintlich korrekten Primer für eine erneute Amplifikation des Produktes (Wobble-Positionen ersetzt) erwiesen sich jedoch als ungeeignet für die PCR. Wie aus später erhaltenen Sequenzdaten von mit dem 921 bp PCR-Fragment überlappenden Fragmenten ersichtlich wurde, kam es offenbar infolge der beschriebenen PCR mit degenerierten Primern und der Generierung von Blunt-End-Insert-DNA mittels Vent®-Polymerase für die Klonierung durch Restriktionsligation im Bereich der Primer zum Basenaustausch. Der FWD12/19 entsprechende Bereich wies auf 23 Basen drei Fehler auf, die REV41 entsprechende Region zeigte sogar 4 Substitutionen auf 21 Basen. Da der Austausch offenbar strikt auf die jeweils degenerierten Positionen beschränkt schien, lag der Fehlerursprung wahrscheinlich bereits in der PCR zur Insertamplifikation aus genomischer DNA.

Es wurden neue Fragment-interne Oligonukleotide für eine Amplifikation von über die Enden der bekannten 921 bp Sequenz hinausreichenden flankierenden Regionen abgeleitet (OUT368; OUT344; OUT70, s. 3.8.6.2., Abb. 52), welche jeweils in Kombination mit Vektor-homologen T3- oder T7-Primern eingesetzt wurden. Als Template für die PCR dienten in pBlueskript ligierte *PstI* (3,5 $\pm$ 0,5 kbp)-, *PvuI* (3,4 bis 3,6 kbp)- und *EcoRI* (10-12 kbp)-Fragmentgemische. Die Produkte wurden mittels Southern-Blot bei 64°C mit der 921 bp Sonde hybridisiert und Fragmente hoher Stringenz direkt oder nach Subklonierung in pBlueskript sequenziert. Ausgehend von erhaltenen Sequenzdaten,

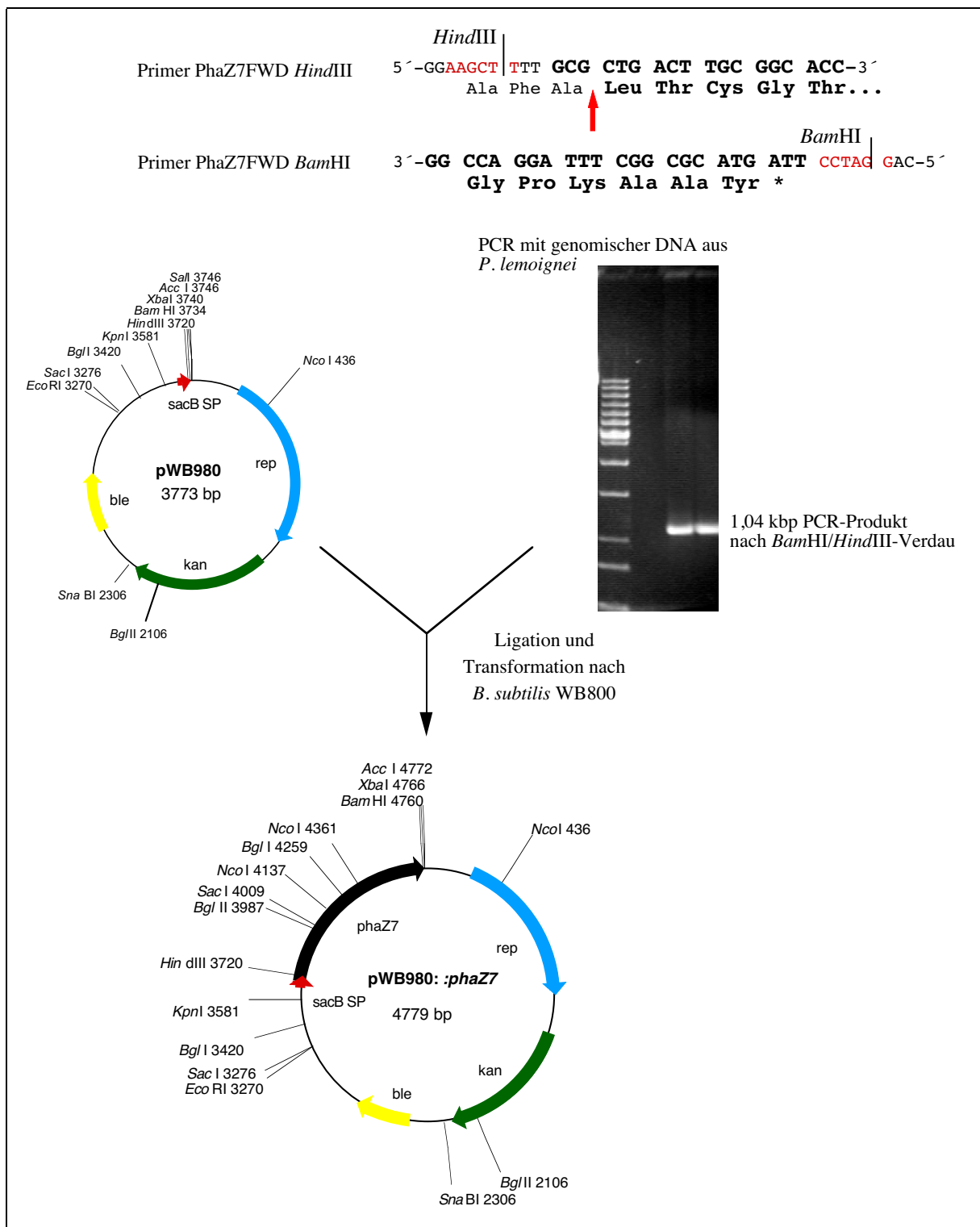
wurden weitere (außerhalb der bekannten 921 bp liegende) Primer (OUTPCR368; FWD-123; REV1168) abgeleitet und zur Amplifikation eingesetzt.

Durch Kombination der Sequenzdaten aller PCR-Fragmente und der Sequenz eines genomischen 569 bp *Bgl*I-Klones („pBBgl*phaZ7K5*“) gelang es, das gesamte Strukturgen inklusive Präproteinkodierender Sequenz und weiterer flankierender Regionen über einen Gesamtbereich von 3377 bp zu identifizieren. Eine Übersicht über die Lage der einzelnen Fragmente und das ermittelte Restriktionsmuster gibt Abb. 52 unter 3.8.6.2.

Der Versuch einer PCR-Klonierung des gesamten 3377 bp Fragmentes sowie des 2,4 kbp Fragmentes (stromaufwärts des gesuchten Genes) in *E. coli* mißlang und bestätigte die mit genomischer DNA beobachteten Phänomene.

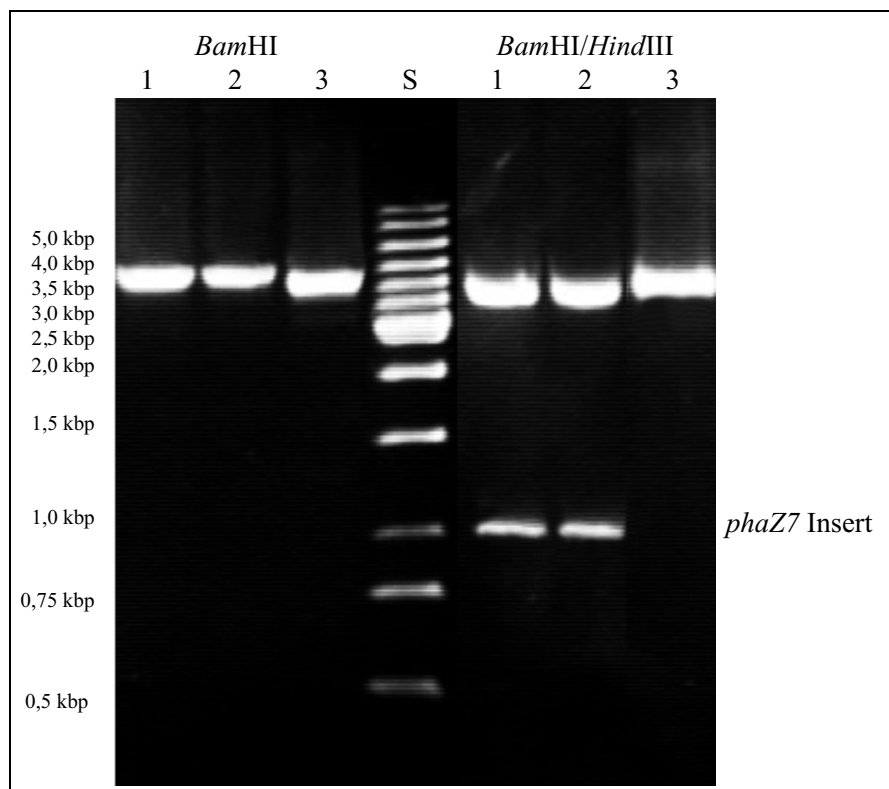
#### **3.8.4. Klonierung des *phaZ7*-Genes in *B. subtilis* WB800**

Aufgrund der während des Versuches einer Klonierung der genomischen Fragmente nach *E. coli* DH5 $\alpha$  aufgetretenen Probleme wurde ein alternatives System mit *B. subtilis* für die Klonierung von *phaZ7* gewählt. *B. subtilis* wurde bereits erfolgreich zur heterologen Expression einer Reihe von Proteinen und Überproduktion von Metaboliten verwendet, so z.B. für die Produktion von Streptokinase, Antikörperfragmenten und Riboflavin (WONG 1995; WONG et al., 1994; STAHMANN et al., 2000). Bei dem verwendeten Stamm *B. subtilis* WB800 handelte es sich um eine achtfach Protease-negative Mutante. Mit Hilfe des speziell für die Expression extrazellulärer Proteine optimierten Vektors pWB980 (WU und WONG, 1999; MURASHIMA et al., 2002), der bereits das Signalpeptid der Laevansucrase (*sacB* SP) unmittelbar vor der „Multiplecloningsite“ trug, war es möglich, Fusionsproteine herzustellen, die aus der Zelle ausgeschleust wurden. Zur Klonierung wurde der Bereich des reifen Proteins (s. 3.8.7.) inklusive der Schnittstelle der Signalpeptidase unter Verwendung von Primern, die am 5'-Ende des Fragmentes eine *Hind*III-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle trugen, mit einem Gemisch aus *Taq*- und *Pfx*®-Polymerase, welche sich durch exzellente Proofreadingqualität auszeichnete, aus genomischer DNA von *P. lemoignei* amplifiziert.



**Abb. 45:** PCR-Klonierung von *phaZ7* mit Hilfe des Expressionsvektors pWB980 nach *B. subtilis* WB800. Die Schnittstelle der Leaderpeptidase wurde durch einen Pfeil markiert. Fettdruck in der Primersequenz kennzeichnet *phaZ7* zugehörige Regionen.

Es war möglich, die Schnittstelle für die Signalpeptidase aus *P. lemoignei* (Ala38-Leu39) direkt zu übernehmen und an die Sequenz (Ala-Phe-) aus *B. subtilis* im richtigen Leserahmen zu fusionieren, ohne daß die Sekretion signifikant beeinträchtigt wurde. Das mittels PCR erhaltene 1,04 kbp Insert wurde in *B. subtilis* kloniert (2.17.8.6.). Die Transformanten wurden in LB-Flüssigkulturen (2 ml, 96-Well-Mikrotiterplatten) angezogen, nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C bei 4500 rpm abzentrifugiert und die Zellpellets mittels alkalischer Lyse einer Plasmidpräparation unterzogen (s. 2.17.3.4.). Die isolierten Plasmide wurden mittels Dot-Blot nach 2.17.11. und anschließender Hybridisierung mit der 921 bp Sonde (s. 3.8.1.) sowie Kontrollverdau (Abb. 46) auf den Einbau der richtigen Inserts überprüft. Parallel hierzu wurden die Überstände der Kulturen mittels Trübungstest auf nPHB-Depolymeraseaktivität geprüft. Von sechs in der Hybridisierung positiv getesteten Klonen zeigten vier zugleich die gesuchte Aktivität im zellfreien Kulturüberstand. H4K1pWB980::*phaZ7* und D6KpWB980::*phaZ7* wurden ausgewählt und einer Kontrollsequenzierung unterzogen, welche den korrekten Einbau des gewünschten Inserts und zugleich die Funktionalität des klonierten Genes bestätigte (zur Expression in *B. subtilis* siehe Abschnitt 3.9.).

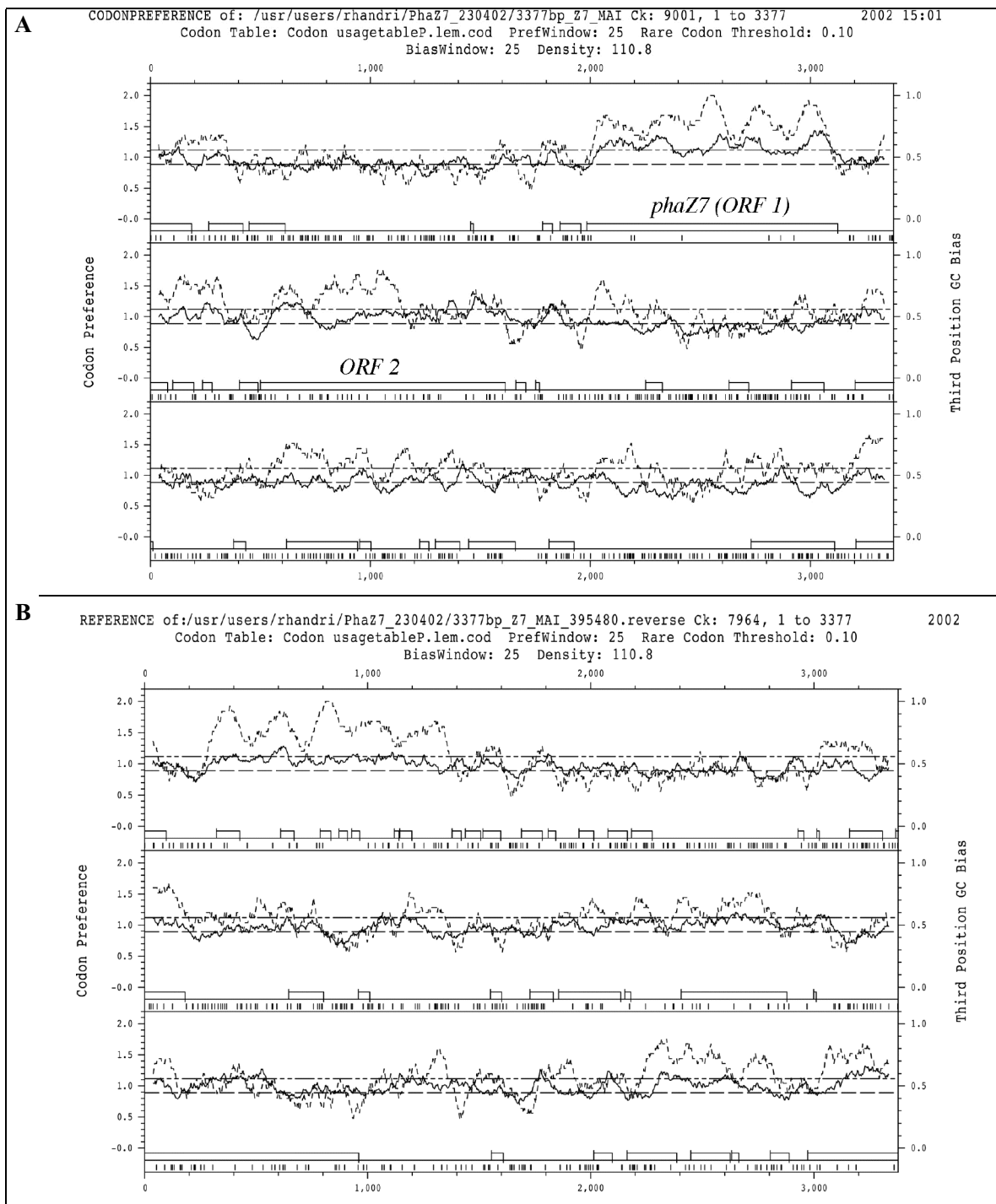


**Abb. 46:** Restriktionsverdau der Plasmid-DNA ausgewählter *B. subtilis* Klone. Alle drei Klone gaben in der Koloniehybridisierung ein positives Hybridisierungssignal mit der 921 bp Sonde (FWD12/19+REV41). Nur H4K1pWB980::*phaZ7* (1) und D6KpWB980::*phaZ7* (2) besaßen das PCR-Insert der korrekten Größe. Während Kulturüberstände von H4K1pWB980::*phaZ7* und D6KpWB980::*phaZ7* nPHB-Depolymerase-Aktivität aufwiesen, war B6pWB980::*phaZ7* (3) inaktiv. S: 1 kbp DNA Ladder (MBI Fermentas).



### 3.8.5. Analyse der Sequenzdaten aus *P. lemoignei*

Die durch Doppelstrangsequenzierung nach 2.17.19. bestimmten DNA-Sequenzen überlappender PCR-Klone und der genomischen *Bgl*I-Klone ergaben ein zusammenhängendes Gesamtfragment von 3377 Nukleotiden Länge. Mit Hilfe des Programmes TestCode 1.0 (FICKETT, 1982; GCG®-Wisconsin Package 10.1) wurde eine erste Vorhersage zum Auftreten von offenen Leserahmen („Open Reading Frames“ = ORFs) getroffen. Codierende Sequenzbereiche wurden hierbei unabhängig vom ORF anhand des erhöhten Auftretens von Basen in gleichen Codonpositionen bei einer Periodizität von drei gemittelt über alle Basen der Sequenz identifiziert. Zwei potentielle codierende Regionen im ersten und zweiten Leserahmen wurden vorgeschlagen. Um genauere Vorhersagen treffen zu können und Frameshiftfehler als Folge von möglichen Sequenzierfehlern zu erkennen, wurden die uni- und die reverse -Nukleotidsequenzen mit dem Programm CodonPreference (GRIBSKOV et al., 1984; GCG®-Wisconsin Package 10.1) unter Zuhilfenahme einer zuvor erstellten Codon-Häufigkeitstabelle analysiert (Abb. 47) und mit dem statistischen G+C-Gehalt an der jeweils dritten Codonposition verglichen (BIBB et al., 1984). Die Verwendungsfrequenz verschiedener Codons variiert zwar in verschiedene Bakterien in Abhängigkeit vom G+C-Gehalt der DNA, sie ist jedoch für die einzelne Art innerhalb gewisser Schwankungsgrenzen, die möglicherweise mit der Expressionsrate der Gene in Verbindung stehen, charakteristisch (GRANTHAM et al., 1980; IKEMURA, 1985; RODOLPHE und MATHE, 2000). Eine Korrelation des G+C-Gehaltes einzelner Codonpositionen ermöglichte neben der Erkennung von offenen Leserahmen aufgrund asymmetrischer Verteilung auch die Bestimmung der relativen Orientierung. Der Bestimmung der Codon-Häufigkeit aus den verfügbaren DNA-Sequenzen bekannter extrazellulärer dPHA-Depolymerasen aus *P. lemoignei* (Depolymerase-Gen/Accession-Numer in GenBank: *phaZ1*/Z22595; *phaZ2*/U68039; *phaZ3*/U68170; *phaZ4*/U12976; *phaZ5*/U12977; *phaZ6*/AF222999) diente das Programm CodonFrequency (GCG®-Wisconsin Package 10.1). Abbildung 47 A verdeutlicht, daß es sich bei ORF 1 im ersten Leseraster von Position 1984 bis 3126 um einen signifikant codierenden Bereich handelte, welcher durch den Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den durch Edman-Sequenzierung des N-Terminus sowie interner Peptidfragmente erhaltenen Sequenzen (s. Tab. 13) eindeutig als *phaZ7*-Strukturgen identifiziert werden konnte. Der ORF zeigte gute Übereinstimmung mit der für *P. lemoignei* typischen Codonverwendung. Die Präferenz für Guanin und Cytosin in der dritten Codonposition, welche im Mittel für alle derzeit verfügbaren ORF-Sequenzen aus *P. lemoignei* bei 62,3 % lag (NAKAMURA et al., 2000; <http://www.kazusa.or.jp/codon/>), wurde im Bereich des offenen Leserahmens für *phaZ7* mit signifikant über 60 % GC-Gehalt für die letzte Tripletbase bestätigt. Stromauf- und stromabwärts des potentiellen Strukturgens lag dieser Wert unter 50 %. Die Anwesenheit eines möglichen weiteren ORF 2 im zweiten Leseraster stromaufwärts von *phaZ7* wie von Testcode vorhergesagt in gleicher Orientierung, wurde durch Ergebnisse aus CodonPreference und parallel durchgeführter Analysen mit GLIMMER 2.0 (DELCHER et al., 1999) sowie das Vorhandensein einer potentieller Ribosomenbindestelle bestätigt.



**Abb. 47:** Identifizierung potentieller offener Leserahmen in der ermittelten DNA-Gesamtsequenz der genomischen und der PCR-Klone von *P. lemoignei* mit dem Programm CodonPreference (GRIBSKOV et al., 1984) unter Verwendung der Codonauswahl aus *P. lemoignei*.

(A) zeigt die Ergebnisse der Sinnstranganalyse (bezüglich *phaZ7*),

(B) die des Gegenstranges der ermittelten Nukleotidsequenz. Die Abszisse gibt die Position der Basen, die Ordinate die Codon-Präferenz (schwarz) bzw. den GC-Gehalt der dritten Codonposition (grau) basierend auf der Methode nach BIBB et al. (1984) wieder. Die Signifikanzlimits sind durch unterbrochene Linien dargestellt.

### 3.8.6. Charakterisierung des *phaZ7*-Genes

#### 3.8.6.1. Transkriptions- und Translationssignale (Promotor-/Terminationssequenzen)

Das Strukturgen der extrazellulären nPHB-Depolymerase, *phaZ7*, erstreckte sich über 1143 Basen, beginnend mit einem ATG-Startcodon in Position 1984 bis zum Stopcodon TGA in Position 3123. Während eine korrekte Transkription von der Existenz bestimmter Promotor- und Terminationsstrukturen abhängt, erfordert die Initiation der Proteinbiosynthese eine geeignete stromaufwärts des Startcodons gelegene purinreiche Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno-[S/D]-Sequenz) (BROSIOUS et al., 1978; GOLD et al., 1981; SHINE und DALGARNO, 1974; 1975). Der Abstand zum Startcodon kann 3 bis 13 Nukleotide betragen, wobei ein Abstand von 9 Nukleotiden am häufigsten verwirklicht scheint, und hat entscheidenden Einfluß auf die Translationseffizienz (CURRY und TOMICH, 1988; ITOH et al., 1984; WHITEHORN et al., 1985). Dem ORF für *phaZ7* ging im Abstand von 8 Nukleotiden eine typische Ribosomenbindestelle (SHINE und DALGARNO, 1994) der purinreichen Sequenz GGAGA (Position 990 - 994) voran, die über einen Bereich von 4 Nukleotiden identisch zum komplementären Strang der 16sRNA aus *E. coli* war (Abb. 48). Nahezu alle von SCHERER et al. (1980) und STORMO et al. (1982) aufgestellten Kriterien im Bereich von -20 bis +15 bp wurden erfüllt. So entsprach die Sequenz der Primärstruktur der von den Autoren postulierten Sequenz GGAG-[7-9 Nukleotide]-ATG. Die geforderte Limitierung auf maximal zwei Guanin im Bereich -1 bis -7 erfüllte die Primärsequenz mit einem G an Position -2 ebenso wie das Auftreten erwarteter Adenine in Position -3, +5, +6, +10. Mit Hilfe des als PerlScript verfügbaren Programmes RBS-Finder (SUZEK et al., 2001) konnte basierend auf dem Ergebnis der GLIMMER-Analyse als „Input“ der Sequenzabschnitt ebenfalls als potentielle Ribosomenbindestelle bestätigt werden. Für alle PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase-Strukturgene aus *P. lemoignei* war offenbar die Nukleotidfolge GGAGA im Bereich -2 bis -13 bp hochkonserviert.

Der stromaufwärts vom ermittelten *phaZ7*-Strukturgen liegende DNA-Bereich zeichnete sich durch einen deutlich höheren A + T-Gehalt (54 % bis -400 bp) gegenüber der codierenden Region aus. Um Hinweise auf mögliche Promotorregionen zu erhalten, wurde stromaufwärts des Strukturgenes nach Konsensussequenzen für Promotorstrukturen gesucht. In einem Abstand von -18 bis -44 bzw. -152 bis -178 konnten zwei Nukleotidsequenzen identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zur Konsensussequenz  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren aus Enterobakterien aufwiesen.  $\sigma^{70}$ -abhängige Promotoren besitzen typischerweise einen A+T-reichen „-43“-Bereich (BUJARD, 1980) sowie zwei konservierte Sequenzabschnitte, die als „-10“ und „-35“-Region bezeichnet werden (ROSENBERG und COURT, 1979; HAWLEY und McCLURE, 1983). Die -10 Region wird nach PRIBNOW (1975) und SCHNALLER et al. (1975) auch als Pribnow-Schnaller-Box definiert. In der Regel sind die -10 und -32 Region durch 17 beliebige Nukleotide voneinander getrennt. Es wurden jedoch auch Abweichungen mit einem Abstand von 15 bis 21 Nukleotiden beschrieben.

Gen	stromaufwärts liegende Nukleotidsequenz (-18 bis +3)	Referenz
<i>phaZ1</i>	ATATT----- <b>GGAGAGAGACCT</b> -ATG	JENDROSSEK et al., 1993b
<i>phaZ2</i>	ATATTC----- <b>AGGAGA</b> CATTT---ATG	BRIESE et al., 1994b
<i>phaZ3</i>	CGCCCAT-- <b>GGGAGGAGA</b> C-----ATG	BRIESE et al., 1994b
<i>phaZ4</i>	ACAAA----- <b>GGAGA</b> CGAATCG-ATG	JENDROSSEK et al., 1995b
<i>phaZ5</i>	TACC----- <b>GGAGA</b> CAAGAATTATG	JENDROSSEK et al., 1995b
<i>phaZ6</i>	TGAAT----- <b>GGAGA</b> CGACAAC-ATG	SCHÖBER et al., 2000
<i>phaZ7</i>	TATTC----- <b>GGAGA</b> CAAAAAGA-ATG	diese Arbeit
<i>ORF 2</i>	GCGCACTAGTCA <b>AAGG</b> -----TCA---ATG	diese Arbeit
komplementärer Strang der 16 S rRNA aus <i>E. coli</i>	---TAAG <b>AGG</b> GTGA---	BROSIUS et al., 1978

**Abb. 48:** Vergleich der S/D-Sequenzen der PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei*. Zum komplementären Strang der 16 S rRNA aus *E. coli* homologe Bereiche wurden unterstrichen, die potentielle Shine-Dalgarno-Sequenz (purinreiche Region) wurde grau hinterlegt. Startcodons und in allen Depolymerasegenen aus *P. lemoignei* identische Bereiche sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Im Falle der am weitesten stromabwärts gelegenen potentiellen Promotorstruktur vor *phaZ7* war die -35 Region bis auf ein Cytosin anstelle des Adenin in Position vier eindeutig konserviert. In dem geforderten Abstand von 15 Nukleotiden folgte eine stärker degenerierte -10 Region. Für den zweiten möglichen Promotor war die -10 Region deutlicher konserviert (Abb. 49). Ein möglicher -43-Bereich war in der vom Strukturgen weiter entfernten Sequenz (P1) nicht ausgeprägt, fand sich jedoch stromaufwärts der unmittelbar vor *phaZ7* gelegenen potentiellen Promotorsequenz (P2).

	“-43“	“-35“	“-10“
P1 vor <i>phaZ7</i>	808-TCCG <b>TTTCGACCTT</b> CTGTTGCCA-N15-TAAAAATCGCGC <b>CAAAGCGGTT</b> -863		
P2 vor <i>phaZ7</i>	943- <b>ATAAAA</b> GC <b>GTTC</b> CCATTTTCAA-N14-TATTATTATTCGG <b>G</b> GACAAAAGAA-998		
$\sigma^{70}$ -Konsensus		TTGACa-N17-TA <b>tAaT</b>	

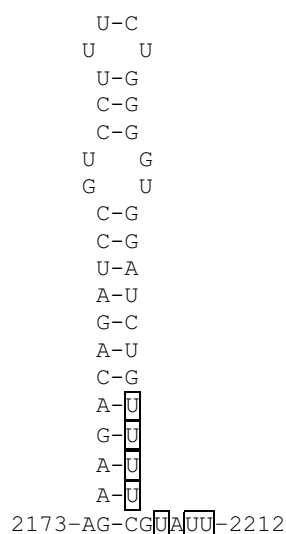
**Abb. 49:** Vergleich der stromaufwärts von *phaZ7* gelegenen potentiellen Promotorsequenzen mit der Konsensussequenz  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren aus *E. coli*. Unterstrichene Nukleotide stehen in Übereinstimmung mit der Konsensussequenz aus *E. coli*. Großgeschriebene Nukleotide kommen in dieser Position in über 50 % und klein geschriebene in 40-50 % aller untersuchten *E.-coli*-Promotoren vor (HAWLEY und McCLURE, 1983). Die mittels PromoterPredict vorhergesagten potentiellen Transkriptionsstartpunkte wurden in vergrößerter Schrift hervorgehoben.

Im Sequenzbereich von der potentiellen ersten Promotorstruktur über den postulierten zweiten Promotor bis hin zum Strukturgen von *phaZ7* wich der GC-Gehalt mit 41,9 mol% deutlich von dem der codierenden Region ab und lag über einen Bereich von 184 bp um 13,7 % unter dem durchschnittlichen G+C-Gehalt der Gesamtsequenz in Abb. 51. Eindeutige Hinweise auf das Vorhandensein anderer Promotorstrukturen, z. B.  $\sigma^s$ - (Konsensus: TATACT; beteiligt an der Regulation spätstationärer Proteine, LANGE und HENGGE-ARONIS, 1991),  $\sigma^{32}$ - (Konsensus: CCAATNT; CROSS et al., 1996) oder  $\sigma^{54}$ -abhängige Promotoren (-24/-12 – Konsensus: CTGGYAR-N4-TTGCA, R = Purin, Y = Pyrimidin; AUSUBEL, 1984) für deren Aktivierung spezifische

transkriptionale Proteine erforderlich sind, welche die RNA-Polymerase durch Bindung an 100-200 bp stromaufwärts der Promotorsequenz befindliche Erkennungssequenzen oder durch direkte Bindung an das Enzym aktivieren (THÖNY und HENNECKE, 1989; MERRICK, 1993), ergaben sich nach Analyse der ermittelten Sequenz aus *P. lemoignei* nicht. Nukleotidsequenzen, die nur die minimale  $\sigma^{54}$ -Konsensussequenz (GG-N10-GC) besaßen, wurde keine physiologische Bedeutung beigemessen, da sie aufgrund des durchschnittlichen G+C-Gehaltes der Gesamt-DNA aus *P. lemoignei* statistisch häufiger auftraten. Daß es sich bei den in Abbildung 49 postulierten  $\sigma^{70}$ -Promotorregionen tatsächlich um Promotoren von *phaZ7* handeln könnte, wurden durch die Ergebnisse gestützt, nach denen ein antiparallel zum *lacZ*-Promotor des pBluescript-KS<sup>-</sup>-Vektors orientiertes PCR Produkt von Position -123 bis +2144 der unter Abb. 51 dargestellten Gesamtsequenz in den entsprechenden transgenen *E. coli* zur Genexpression und der Bildung von nPHB-Depolymeraseaktivität führte.

Im nicht codierenden Bereich, beginnend 2 und 29 bp stromabwärts, wurden inverse Sequenzwiederholungen („inverted repeats“) identifiziert, die auf der Ebene des Transkriptionsproduktes zur Ausbildung von Haarnadelschleifen mit freien Bildungsenthalpien von  $\Delta G = -27$  bzw.  $-107,7$  kJ/mol (37°C; 1M NaCl) führen könnten (MFOLD 3.0-Analyse nach ZUKER und STIEGLER, 1981; JAEGER et al., 1989; SANTALUCIA, 1998). Der zweiten sich über 47 bp erstreckenden Sekundärstruktur (Position 1173 bis 2207) folgten, beginnend noch innerhalb der Haarnadel, sieben Uracilreste, von denen vier gepaart vorliegen könnten (Abb. 50). Eine Abfolge von Palindrom und Poly-U ist typisch für Rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren (PLATT, 1986; CHENG et al., 1991). Das Poly-U-Motiv fehlte der weiter stromaufwärts gelegenen Nukleotidsequenz und die freie Energie der zugehörigen Sekundärstruktur lag signifikant höher, was die Annahme, daß es sich bei der weiter stromab gelegenen und ausgeprägter erscheinenden Struktur möglicherweise um das Transkriptionsterminatorsignal der *phaZ7*-mRNA handelte, bestätigt.

Somit verfügte *phaZ7* offenbar alle für die Funktionalität essentiellen regulatorischen DNA-Elemente, welche eine Einordnung als Strukturgen stützten.



**Abb. 50:** Sekundärstruktur des potentiellen Transkriptionsterminations-signales stromabwärts von *phaZ7*. Die Zahlenangaben entsprechen den Positionen der Nukleotide des sequenzierten Bereiches unter 3.8.6.2., Abb. 51.

### 3.8.6.2. Basenverteilung und Codonauswahl

Für die in Abb. 51 dargestellte Gesamtsequenz von 3377 bp lag der G+C-Gehalt bei 55,6 mol%. Die Codonauswahl innerhalb des offenen Leserahmens für *phaZ7* verdeutlichte die Bevorzugung G+C-reicher Codons, mit deutlicher Präferenz für Cytosin (53,2 mol%) in Codonposition 3 (Tab. 19). Ein Vergleich der Codonauswahltable für *phaZ7* mit der Codonauswahl für dPHB-Depolymerasen, in welche alle bekannten dPHB-Depolymerasegene aus *P. lemoignei* (*phaZ1* bis *phaZ6*) einbezogen wurden (CodonFrequency, GCG®-Wisconsin Package 10.1), offenbarte geringfügige Unterschiede. So wurde im offenen Leserahmen von *phaZ7* von den sechs möglichen Codons für Arginin ausschließlich CGC verwendet. Für Histidin wurde ebenfalls das Codon mit C in der dritten Position präferiert (100 mol%) wohingegen in *phaZ6* (100 mol%) und *phaZ1* (89 mol%) nahezu ausschließlich CAT Verwendung fand. Während Glutamat in dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasegenen aus *P. lemoignei* zu 72 mol% durch das Codon GAA beschrieben wurde, codierte in *phaZ7* wiederum das Triplet mit Guanin an Position drei für diese Aminosäure. Der Gesamt G+C-Gehalt innerhalb des Strukturgenes lag bei 59,6 mol% und stand somit in Übereinstimmung zu *phaZ1* bis *phaZ5* aus *P. lemoignei*. Mit 54,6 mol% lag nur der G+C-Gehalt im Bereich von *phaZ6* unterhalb dieses Bereiches. Die gefundene Codonauswahl bestätigte den codierenden Charakter von *phaZ7*.

Bei einem Vergleich des G+C-Gehaltes aller PHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasegene aus *P. lemoignei* fiel auf, daß nur *phaZ4* der von BIBB et al. (1984) formulierten Regel für G+C-reiche DNA mit einem G+C-Gehalt von Position 3. > 1. > 2. folgte. Alle verbleibenden dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasegene sowie *phaZ7* wiesen in Position 2 einen um 4 bis 8 mol% höheren G+C-Anteil auf als in Position 1 der Codons (Tab. 19).

**Tab. 19:** (G+C)-Gehalt der ersten, zweiten und dritten Codonposition der PHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerase-Strukturgene aus *P. lemoignei*.

Pos.	G + C [mol%]																				
	<i>phaZ1</i>			<i>phaZ2</i>			<i>phaZ3</i>			<i>phaZ4</i>			<i>phaZ5</i>			<i>phaZ6</i>			<i>phaZ7</i>		
	C	G	C+G	C	G	C+G	C	G	C+G	C	G	C+G	C	G	C+G	C	G	C+G	C	G	C+G
1.	15,7	32,6	<b>48,3</b>	15,7	32,8	<b>48,5</b>	13,4	34,6	<b>48,0</b>	19,4	36,5	<b>55,9</b>	15,7	33,5	<b>49,2</b>	14,9	34,5	<b>49,4</b>	12,6	34,8	<b>47,4</b>
2.	33,3	19,1	<b>52,4</b>	34,4	18,7	<b>53,1</b>	34,4	19,3	<b>53,7</b>	32,1	19,8	<b>51,9</b>	34,9	22,2	<b>57,1</b>	33,1	20,4	<b>53,5</b>	29,5	24,0	<b>53,5</b>
3.	44,2	29,0	<b>73,2</b>	44,1	28,6	<b>72,7</b>	47,3	32,5	<b>79,8</b>	44,1	28,2	<b>72,3</b>	48,3	26,1	<b>74,4</b>	35,0	25,7	<b>60,7</b>	53,2	25,1	<b>78,3</b>
ges. Anteil	31,1	26,9	<b>58,0</b>	31,4	26,7	<b>58,1</b>	31,7	28,8	<b>60,5</b>	31,9	28,2	<b>60,1</b>	32,9	27,3	<b>60,2</b>	27,7	26,9	<b>54,6</b>	31,6	28,0	<b>59,6</b>

dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerase-Gen und Accession-Nummer in GenBank: *phaZ1*/Z22595; *phaZ2*/U68039; *phaZ3*/U68170; *phaZ4*/U12976; *phaZ5*/U12977; *phaZ6*/AF222999, *phaZ7*/AY026355.

Die sich aus den Sequenzierungen der PCR-Fragmente und der Klone in *B. subtilis* WB800 (3.8.4.) sowie später hergestellten Klonen in *E. coli* DH5 $\alpha$  ergebende Gesamtsequenz wurde in Abbildung 51 zusammengefaßt.

```
CGGGCGTTTCATTGAACCTGGCGACCCGGCATGCGCAGGCTGTCCAGGAATCTGGCAAATCGTCGTTTCTACGGCATAGG
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 80
TACTGCCAGTGAGGGCATCGATGGTCGACAAGCCTTCATTGCCGACCGTGCCAACTCGATCGCCGCGCCATCCTCCATG
81 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 160
ATCGCCAGCACGGAATGGCTGCCGATAGCGGGAAATAGACATACGGGATTCGCCATCCCGCTCGAACAGCACCATGCG
161 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
CAGCGGCGTTGGAAAAGAAATTCGAGATGGGGCTGATGGCCTGAAACTCGTTGTCAGGCAGCAAGGCAAGCAGGTGGTTTCG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 320
CACAGGCCTTGGCGGTCCGCGGTACGGCTGTCATTTGCTCTCCATTAACAATAGGGCATGGTCTGTACAATTTTGTACAG
321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 400
ACCATGCCGATTTGGCTGGCTAAACTGCGCCTAAAAATCTGGAGCCATGCCGGACACCAGGATTC AACCTACAACAAAC
401 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 480
AGCGCACTAGTCAAGGTC AATGAGGCTGTCCATATTTATTCGAGAAAACATGGAGCCTATCTGCAAGGATGGGAAGATT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 560
FR+2 M R L S I F I R E N M E P I L Q G W E D F -
TTGCCCGGAGCATCCAGCCGTCCCATCGCTTGATGGATACGATCGAGCTGCGTGACCATGCCAGGAAATCTTGAAGAA
561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 640
FR+2 A R S I Q P S H R L M D T I E L R D H A R E I L E E -
GTCGCAGCCGAGCTGGCCTTGCCGAACCAGAGCCGCACACGCGATGCACAGGGCAATACGGCAGCCGAAATTCATGCGGA
641 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 720
FR+2 V A A E L A L P N Q S R T R D A Q G N T A A E I H A D -
TACGCGGTTGAATCCGGATTCAGCATCGATCAGGTCGTTGCCGAATACCGGGCGTTGCGAGCCAGCGTACTCAATCTTT
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 800
FR+2 T R V E S G F S I D Q V V A E Y R A L R A S V L N L W -
GGGGCGCGGGAAAAGACGGCGACGTGGTTCGAGGTTGACGATATGTCCAGGTTCAACGATGCCCTGGCAGGGCACTG
801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 880
FR+2 G R R E K T A T W F E V D D M S R F N D A L D R A L -
GCTGAATCCGTGCGCAGGTTATCCACGACGGCCCGCAATCGCAGGACATATTCTGGGCGTGATCGGGCATGACTTGGC
881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
FR+2 A E S V A R Y S T T A R Q S Q D I F L G V I G H D L R -
CGCGCCGCTGCATGCGCTCAGCTTGGGAGCTCAATATCTCATGAGATCCGAGGACGCAGACAGCAAGTTGATCCAGCTTG
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1040
FR+2 A P L H A L S L G A Q Y L M R S E D A D S K L I Q L G -
GCTCGCGCATGTTCAACAGCACGGTCAGGATGCAAGCGATTCTGGACAACCTGCTCGATTTACCCCGTAGCCGGACTGGC
1041 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1120
FR+2 S R M F N S T V R M Q A I L D N L L D F T R S R T G -
ATCGGTATCCCATCCGGATCGAGGAAGTGGATCTTGGCGTGCTTTCAGAACAGATTGCTGAAGAGTTTCGCGCATTAATA
1121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
FR+2 I G I P I R I E E V D L A V L S E Q I A E E F R A L N -
CCCCGGCAAATCATAAAAACCCATGCCGAGGGTAATGTGTCAGGGTGGCTGGATGCCGGCAGGATAGGGCAAATCTATC
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1280
FR+2 P G K I I K T H A E G N V S G W L D A G R I G Q I Y Q -
AAAATCTGATCGGCAATGCATTGCAATATGGGATGGCGGGAACCCGGTTCCATTCTTACCCGTGAAGATGGCGAGGAA
1281 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1360
FR+2 N L I G N A L Q Y G M A G T P V S I L T R E D G E E -
ATCATCTGTCGGTACATAACGATGGTCCGCCGATTCGCCAGAAGTGAAGAAAAATATTTTTGACCCATTGCGGCGGTT
1361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
FR+2 I I L S V H N D G P P I P P E V K K N I F D P L R R F -
TGCCGATGGCGAGAAATGTACCGCCGATAGGAAGAATCTGGGCTGGGCTGTATATCGTGCGCGAAATCGTCTGGCTC
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1520
FR+2 A D G E K C T A D R K N L G L G L Y I V R E I V L A H -
ATCAAGGCACAATCAACGTCTCTCAACTCAGGATATGGGCACGACATTTACGGTGCGCTGCCGAAATCGATCAAGCCG
1521 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1600
FR+2 Q G T I N V S S T Q D M G T T F T V R L P K S I K P -
ACAATTGCCGCATAAGCGCTGCCACGCCTTTTCTTTCCAATCCTCCACATTATTAATTAATGTC AATTCCTCACCTTTC
1601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
FR+2 T I A A *
CTCTCCATTGATTGCTGACTGGCAATAGAATATAGTGGTCCAGTAAGTGACCTGTTCTGAAATTTTCAATGCCGTTTC
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1760
AAAGGGACTAACGGTCAGTTACATGATGCATCCGTTTCGACCTTCTGTTGCCATGCGTCCGGCATCCATAAAAAATCGCGCC
1761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1840
AAAGCGGTTCCGTGCCGAGCATGCCAAATCAGCAGAGGGGAAGAGACAAAGGGAAAAGGAGCCGATCGCCCTACCGGAAA
1841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1920
```

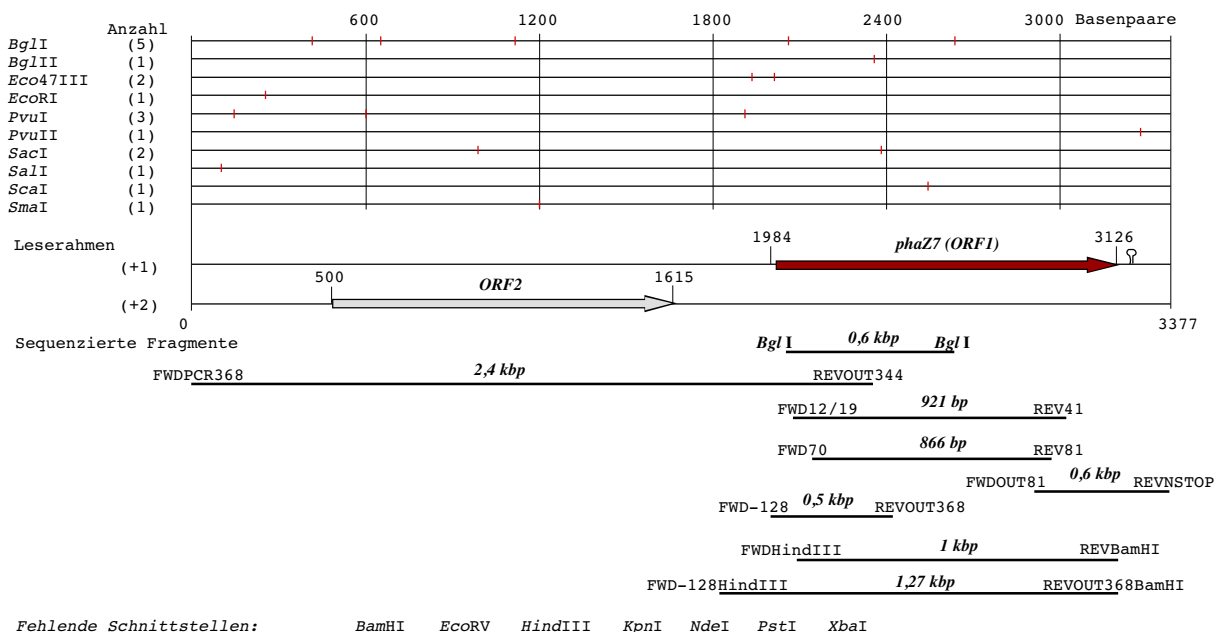
>>>>> <<<<<<







**Abb. 51:** (vorangehende Seiten) Konsensus-Nukleotidsequenz der PCR- und genomischen Klone aus *P. lemoignei*. Gezeigt ist der Sinnstrang bezüglich *phaZ7*. Die abgeleiteten Aminosäuren befinden sich jeweils unterhalb der ersten Base eines Codons. Ausdehnung und Orientierung palindromischer Sequenzen sind durch offene Pfeile gekennzeichnet. Im Edman-Abbau bestätigte Aminosäuren wurden einfach unterstrichen. Die jeweils in der untersten Zeile angegebenen Zahlen (0-9) geben die mit steigendem Wert zunehmende Wahrscheinlichkeit einer Zugehörigkeit zum jeweiligen Sekundärstrukturbereich wieder. Potentielle Transkriptionsstartpunkte sind durch Fettdruck hervorgehoben. Der vertikale Pfeil kennzeichnet die Signalpeptidaschnittstelle. (Zu Details der Vorhersage potentieller Strukturelemente siehe Text). Die Nukleotidsequenz des Strukturgens *phaZ7* ist unter der „Accession“-Nummer AY026355 verfügbar.



**Abb. 52:** Restriktionskarte der sequenzierten Region, Lage und Orientierung identifizierter offener Leserahmen sowie Strategie des „PCR-Walking“ und Lage der einzelnen sequenzierten PCR-Fragmente aus 3.8.3.

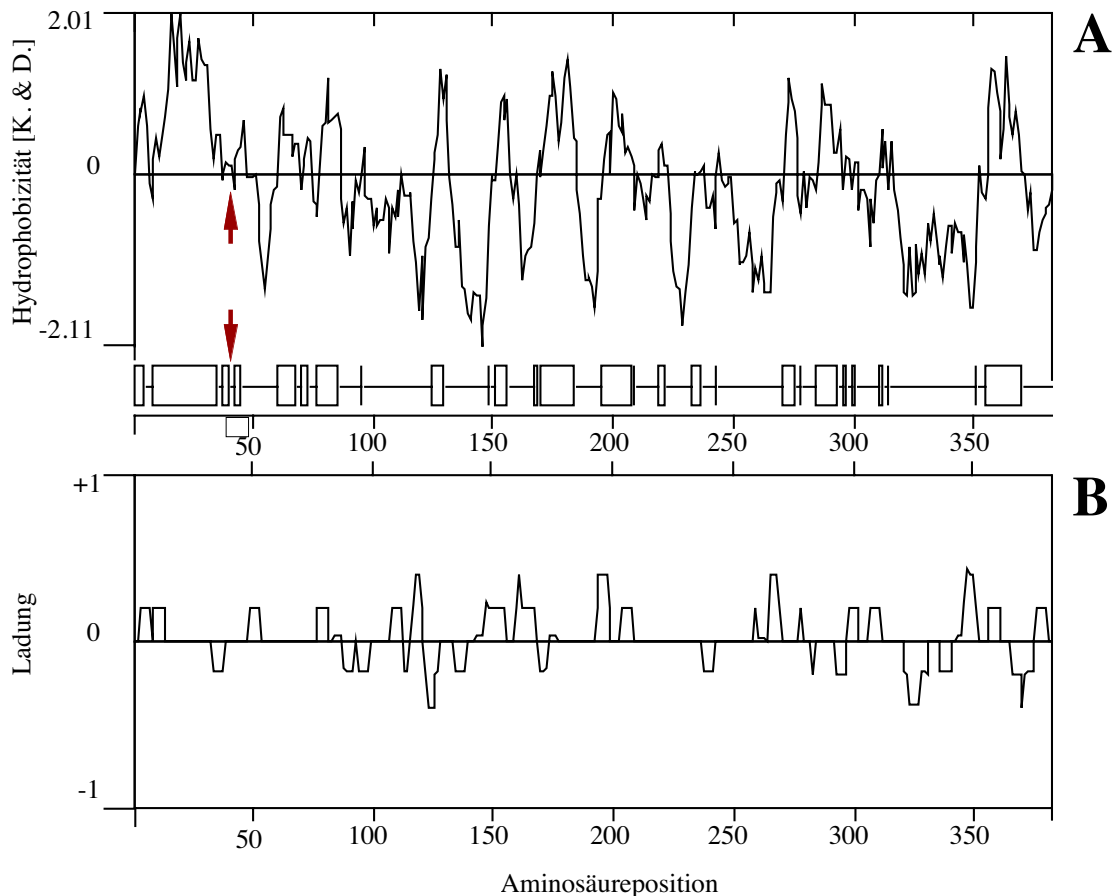
### 3.8.7. Charakterisierung der Aminosäuresequenz von PhaZ7

Die von *phaZ7* abgeleitete Aminosäuresequenz war von (i) Leu<sub>39</sub> bis Ser<sub>73</sub>, (ii) Pro<sub>97</sub> bis Ser<sub>110</sub>, Ser<sub>180</sub> bis Asn<sub>189</sub>, (iii) Phe<sub>299</sub> bis Lys<sub>307</sub> sowie Thr<sub>347</sub> bis Arg<sub>357</sub> identisch mit (i) 35 identifizierten Aminosäuren des N-Terminus der gereinigten nPHB-Depolymerase, (ii) 14 bzw. 10 Aminosäuren interner Peptide nach Bromcyan-spaltung (Fragmente F5 und F3 Nebensequenz), und (iii) 9 und 11 Aminosäuren der tryptischen Peptide (F31, F43) [s. 3.6.2., Tab. 13 und 3.8.6.2., Abb. 51]. In den Positionen 41 und 49 wurden die vermuteten Cystein-Reste bestätigt. In Position 71 und 72 handelte es sich offenbar um Glycin. Getroffene Vorhersagen zu Haupt- und Nebensequenzen in der Aminosäuresequenzierung erwiesen sich als zutreffend. Die Existenz der postulierten Methioninreste vor den erhaltenen Bromcyanfragmenten konnte bestätigt werden. Aufgrund der guten

Übereinstimmung aller durch Edman-Abbau erhaltenen Sequenzdaten und der sicheren Zuordnung aller Peptidfragmente (= 23 % des reifen Proteins) über den gesamten Bereich der abgeleiteten Sequenz handelte es sich bei dem beschriebenen ORF eindeutig um das Strukturgen von PhaZ7.

Die abgeleitete Sequenz umfaßte ein 380 Aminosäuren großes Präprotein ( $M_r = 40.019$  Da). Wie viele andere Exoenzyme und alle bekannten extrazellulären dPHA-Depolymerasen (SAITO et al., 1989, BRIESE et al., 1994b, SCHÖBER et al., 2000, JENDROSSEK, 2001c) besaß auch PhaZ7 ein N-terminales Signalpeptid, welches typischerweise von den meisten sekretorischen Proteinen für einen Transport über die Cytoplasmamembran benötigt wird. Während der Translokation wird das Leaderpeptid schließlich durch eine Leaderpeptidase vom funktionalen Protein abgespalten und das prozessierte reife Protein verläßt die Zelle. Mit Hilfe des Programmes SignalP (NIELSEN et al., 1997) wurde unter Verwendung einer Trainingsmatrix für Gram negative Eubakterien die Schnittstelle zwischen Position Ala<sub>38</sub> und Leu<sub>39</sub> vorhergesagt. Die verfügbare N-terminale Aminosäuresequenz des reifen gereinigten Proteins (beginnend mit Leu<sub>39</sub>) bestätigte diese postulierte Schnittstelle. Die Sequenz des aus 38 Aminosäuren bestehenden Signalpeptids entsprach den von PUGSLEY (1993) und VON HEINJE (1993) definierten Kriterien. Einer kurzen positiv geladenen N-terminalen Region (basische Aminosäuren: Lys<sub>4</sub>, Arg<sub>10</sub>; polare Aminosäuren Ser<sub>3</sub>; Gln<sub>9</sub>) folgte ein ausgedehnter hydrophober Bereich (7 x Ala; Phe; Trp; je 4 x Leu und Val) und der C-terminale Bereich der Signalsequenz mit der Erkennungsstelle für die Leaderpeptidase (Abb. 51). Die postulierte Signalsequenz stellte mit 38 Aminosäuren die bisher längste der für *P. lemoignei* beobachteten Leaderpeptidsequenzen dar (25 Aminosäuren: PhaZ4 und PhaZ6; 26 Aminosäuren: PhaZ3 und PhaZ5; 37 Aminosäuren: PhaZ1 und PhaZ3).

Für das Molekulargewicht des reifen Proteins ergab sich ein theoretischer Wert von 36209,26 Da, welcher in guter Übereinstimmung sowohl mit dem apparenten  $M_r$  von  $36 \pm 2$  Da unter reduzierenden Bedingungen als auch mit den in der MALDI-Massenspektrometrie (s. 3.7.1.3.) ermittelten Werten ( $36199 \pm 45$  Da) stand. Der theoretische pI von 8,3 lag unter dem experimentell ermittelten Wert (pH  $9 \pm 0,7$ ; s. 3.7.2.) und bestätigte, daß es sich um ein basisches Protein handelte. Für pH = 7,0 ergab sich eine theoretische Ladung von +5,3. Von 342 Aminosäuren waren 7,9 mol% positiv (K, R, H) und 5,3 mol% negativ geladen (D, E). 29,5 mol% der Reste waren hydrophob (A, V, L, I, W, F). Den Hauptbestandteil bildeten mit 40,6 mol% polar ungeladene Aminosäuren (S, T, C, M, N, Q). Wie in den dPHAS<sub>CL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* stellten neben Glycin, Alanin und Threonin die häufigsten Aminosäuren dar (je >10 mol%). Auch PhaZ7 wies, wie dPHAS<sub>CL</sub>-Depolymerasen, eine Reihe hydrophober Bereiche auf, deren Ausdehnung jedoch stets auf weniger als 25 Aminosäuren beschränkt schien. Wie aus einem Hydrophatiediagramm (KYTE und DOOLITTLE, 1982; Abb. 53) erkennbar, dominierten abgesehen von der signifikant hydrophoben N-terminalen Signalsequenz offenbar eher polare Bereiche. Hinsichtlich der Ladungsverteilung fielen zwei sich über etwa 85 Aminosäuren erstreckende Regionen mit nahezu inverser Ladungsverteilung auf (Positionen: 75 – 160 sowie 285-370; Abb. 53 B).



**Abb. 53:** Hydrophobizitätsdiagramm der abgeleiteten Aminosäuresequenz von PhaZ7 nach KYTE und DOOLITTLE (1982) (A; positive Werte entsprechen hydrophoben und negative Werte hydrophilen Aminosäuren) und theoretische Ladungsverteilung bei pH 7,0 (B; „+“ positiv und „-“ negativ geladener Bereich). Die Pfeile kennzeichnen die postulierte Schnittstelle der Signalpeptidase.

Möglicherweise handelte es sich um Abschnitte, die eine Rolle bei der Ausbildung der Tertiärstruktur spielen könnten. Das reife Protein besaß 10 Cysteinreste. Mit dem Programm CYPRED (FARISELLI und CASADIO, 2000) wurde unter Berücksichtigung von Konservierungsgrad, Entropie, Hydrophobizität und Ladung für neun über das Protein verteilte Cys-Reste das Vorliegen in einer reduzierten Form vorhergesagt ( $p=0,75$  bis  $0,93$ ). Für Cys<sub>3</sub> wies die Vorhersage mit einem Erwartungswert von 0,8 eine mögliche Beteiligung an der Ausbildung von Disulfid-Brücken aus. Um die Funktion und den Redoxzustand der Sulfhydrylgruppen dieser Aminosäurereste aufzuklären, wurde die enzymatische Aktivität nach Behandlung des Proteins mit Reduktionsmittel (DTT, Mercaptoethanol) bzw. Oxidationsmitteln (DTNB) näher untersucht. Aus den unter 3.7.10. beschriebenen experimentellen Befunden ergaben sich jedoch keine Hinweise auf Disulfidbrücken oder das Vorhandensein essentieller Cysteine.

### 3.8.8. Homologie von PhaZ7 zu bekannten Sequenzen

Auf DNA-Ebene waren weder für das Strukturgen noch für den in Abb. 51 dargestellten Gesamtsequenzbereich signifikante Homologien zu anderen DNA-Sequenzen nachweisbar.

Vergleiche der abgeleiteten primären Aminosäuresequenz von *phaZ7* mit Proteinsequenzen bzw. von Nukleotidsequenzen abgeleiteten Proteinsequenzen der Datenbanken Swiss-Prot, PIR, EMBL und GenBank (Stand 31. März 2001) mit Hilfe der Programme BLAST/PSI-BLAST, FASTA (s. 2.17.19.3.) sowie direkte Sequenzvergleiche mittels Pileup, GAP (NEEDLEMAN und WUNSCH, 1970; GCG®-Wisconsin Package 10.1) und ClustalW zeigten erstaunlicherweise, daß offenbar auch keine ausgeprägten Homologien zu bereits bekannten extra oder intrazellulären PHA-Depolymerasen bestanden. Das Ergebnis war bemerkenswert, da andere PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen und insbesondere die Depolymerase-Isoenzyme aus *P. lemoignei* (JENDROSSEK et al., 1993b, 1995b; BRIESE et al., 1994b) Homologien mit 19,5 bis 70,7 % Identität (ClustalX; Matrix: PAM250) bei 25,1 bis 75,7 % Ähnlichkeit besaßen (s. 4., Abb. 105). PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus verschiedenen Mikroorganismen wie *A. faecalis* T1 (SAITO et al., 1989), *Ralstonia pickettii* (KURUSO et al., 1994) und *Pseudomonas stutzeri* (OHURA et al., 1999) [PHA<sub>SCL</sub> Depolymerasen Typ 1; siehe 1., Abb. 2] sowie *Comamonas* sp. (JENDROSSEK et al., 1995a), *Streptomyces exfoliatus* K10 (KLINGBEIL et al., 1996), *Delftia acidovorans* (KASUYA et al., 1997), *Lepthotrix* sp. (TAKEDA et al., 2000; synonym: *Caldimonas manganoxidans*; TAKEDA et al., 2002) und die unter 3.2. beschriebene intrazelluläre nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* wiesen untereinander ausgedehnte homologe Bereiche auf [PHA<sub>SCL</sub> Depolymerasen Typ 2; siehe 1., Abb. 2]. Auch ein Vergleich mit intrazellulären nPHA-Depolymerasen zeigte keine stärkeren Homologien. Hingegen wurden begrenzte jedoch signifikante Homologien von PhaZ7 mit bisher nicht biochemisch charakterisierten hypothetischen Proteinen aus dem zu den Eukaryota gehörenden Nematoden *Caenorhabditis elegans* (welcher offenbar auch Sequenzen mit Homologie zu dPHB-Depolymerase aus *A. faecalis* besaß) und einer Reihe bakterieller Lipasen nachgewiesen. Die Homologien waren hierbei überwiegend auf offenbar stark konservierte Bereiche beschränkt (Abb. 54).

```

PhaZ7Ple      :-----MISKLMGAQRFLPAVAATVTSLV: 23
HypothF31F6.7Cel:-----MKARFILFCVLF: 13
HypothC04B4.3Cel:-----MKPEIYVFI LSSYLRC: 17
HypothF45E6.4Cel:-----MLNNILILAALSCTAAM: 17
HypothF10F2.3Cel:-----: -
HypothT12A7.4Cel:MLTGRSLSYCTYFEYYYYFVHTNTHIKALKKFEVFIVFLFYRMLLLVPSILLISTVLSQD: 60
HypothT01C3.4Cel:-----MLRREFVLLGLVCLSIVN--AASD: 21
HypothK12B6.3Cel:-----MRCDPKISKADAVLFNHSIMLFSLFAFLVISQQAASG: 37
Lip alkal    :-----MSVYVKTFKLLLIIVITLGL: 20
LipBBsu     :-----: -
LipABsu     :-----: -
Lip1Bli     :-----: -
Konsensus   :
PhaZ7Ple     :WGLAGTLVAPGEAQALTCG-TNSGFVCKGTQTOYAGGFAPGVGYGGFSGGGSCTATKT PVI: 82
HypothF31F6.7Cel:KTTFAEFNKHFADFTIEDDYGKTFNLTLQRSDLGDGGSFSGGKSTSND-----EILND PVI: 67
HypothC04B4.3Cel:FAIVGPI TEFVQYLKEVEHTNSGLLRHVKSFDHTGSFSGGKSFPQE-----KVKHSPIV: 71
HypothF45E6.4Cel:ADIFGPLSDHFI SHLNKRPKRNDALLRQISAFGETGSFSGGKVFSEE-----KLGNTPIV: 71
HypothF10F2.3Cel:-----MSSHFVDWLI AHGYEQDAFDR--PDVGPAGSFSGGKTRSGD-----PVEKE PVI: 46
HypothT12A7.4Cel: IPEYGPISANFDAWLDRNGYGYDYAR--LDLGTAGSFSGGMSSDMEY----FDTSKD PVI: 114
HypothT01C3.4Cel:V--AGPLTDDFQSWLIANGYSSYDFVR--ADYGTQGSYGGKTANAP-----KAVNTPV: 71
HypothK12B6.3Cel:V--NGPLTTDFQNWLIKINGYDSYDFVR--SDYGVKGSYGGFKTKIT-----KASKT PVI: 87
Lip alkal    :FNYCNKQNEGNI EKAKELAIASELVQMNVPNSENAQKSAADLI IAESR--LTGSQGE PVI: 78
LipBBsu     :-----MKKVLMAFIICLSLILSVLAAPPAGAK----AESVHNPV: 36
LipABsu     :-----MKFVKRRIIALVTILMLSVTSLFALQPSAK----A-AEHN PVI: 38
Lip1Bli     :-----AEHN PVI: 7
Konsensus   :
P66

```

```

PhaZ7Ple      : FTHGNGDNAISFDMPGGVNSGYGTPARSVYAEKARGYNDCEIIGVTVLSSS---EQGSA:139
HypothF31F6.7Cel: FVHGVSDIAGGKMQ-----ALSATYKKHGYGSGELYATYDSSGS-KNNPIAW:113
HypothC04B4.3Cel: FTHGNSDSALKYGNDO-----YQSGWDTVVQYFMDRQYTLAELLYGTSYGDNRN---MTQS:122
HypothF45E6.4Cel: FTHGNSDSALKKFGDGP-----FQSGWDEILKYFMSKDYTLAELLYGITVYGDNRN---ISNS:122
HypothF10F2.3Cel: FTHGSGDTALFTQQP-----LATGFSRSIQYFLEQNYTEAELYATYDSSGS-DTWGSGSMLDT:100
HypothT12A7.4Cel: FEHGNDAALTANN-----FSTGWTTTVQYFLNQGYTLGHLVYGTSWGNTN---TTAA:163
HypothT01C3.4Cel: FTHGNSDAALHVSS-----AATGWSNSIEYFLEHGYTVAELVYATSWQDTN---ALHA:120
HypothK12B6.3Cel: FTHGNSDSALKTSS-----MATGWNTISYFSTQGETSAELVYATSWQDTN---SLKA:136
Lip_alkal     : MVHGNAGYPSNWDN-----TVNYFLQNGWVLSDMIIRPNWGSKT-----CP:118
LipBBsu      : LVHGISGASYNFFA-----TKNYLISQGWQSNKLYAIDFYDKT-----:74
LipABsu      : MVHGIGGASFNFA-----TKSYLVSQGWSRDKLYAVDFWDKT-----:76
Lip1Bli      : MVHGIGGASYNFA-----TKSYLVGQGWDRNQLFAIDFYDKT-----:45
Konsensus    :      HG                               y       g5       6       5

PhaZ7Ple      : QYNYHSSTKYAIKTFIDKVKAYTGKSOVDIVAHSMGVSMSLATLQYNNWTSVRKFINL:199
HypothF31F6.7Cel: ADYSLKCEHVKQIRTEFLAVKYYT-QRNVDDVVAISLGVPIARKALGG--ECVDTREDLG:170
HypothC04B4.3Cel: VFRVFNCDLHRLQLLSVIVYTGARHIDIIAHSMGVSIAARAIQGGKFTSEKESCDLG:182
HypothF45E6.4Cel: YIRHFNCQVQLHRRFLEFVHYTKARQINIVAHSMGVSIAARAIQGGKFTSEKESCDLG:182
HypothF10F2.3Cel: YSTIHTCGNLIYLRRLFAVIGYTGAKKVDIIAHSGVPLMRKVYKGGTLIGTDGNCNLG:160
HypothT12A7.4Cel: VERDHDCVTVFRLRKFVEAVMDYTGAKQINIIHSMGVTLARKVILGGYINADDDGSCNIG:223
HypothT01C3.4Cel: ASRTHNCKDLVRLRKFLEAVIAYTAAPKTSVVTSMGVTLARKVILGGKSVSASDGCSDLG:180
HypothK12B6.3Cel: ETRTHDCKDLTRLRKFLEAVIAYTGAKKVDIIHSMGVTLGRKVYQGGIVNGTDGNCNLG:196
Lip_alkal     : ACNDHYGSELDTVKQALQALSKSRTGMDVMGHSMGATLAAKALD-----:165
LipBBsu      : ---GNLNLNGPQLASVYDVKETGAKKVDIVAHSMGANTLYYTKY-----:118
LipABsu      : ---GTNYNNGPVLRSFVKVLDKTAGAKKVDIVAHSMGANTLYYTKN-----:120
Lip1Bli      : ---GNNRNNGPRLRSFVKVLDKTAGAKKVDIVAHSMGANTLYYTKN-----:89
Konsensus    :      v       3       6 66 hS6G       6

PhaZ7Ple      : AGGIRGLYSCYYTGYANAAAPTCGSQNYNSYTFGFFPEGWYYGVVWSN--PWTGSGSTN:257
HypothF31F6.7Cel: QPLTQYVDTFVGVACPNHGTSLQVAG---VSIIPGVIGAIPIPLPICSRVIGLSGLCPT:227
HypothC04B4.3Cel: SDFSSLIGTFIATSSANYGMSCEAG---TAFPACDKEV---IRKINPLENQLSESK:233
HypothF45E6.4Cel: PNLISHRIGTFIATASANYGMSCEAG---TAFPACDKEV---IRKINPLENQLSESK:233
HypothF10F2.3Cel: PPLGAKVDTFIAGIAGPNFGLCVCQLA---QTVPAWCNALDGLYPGYTCQD---QLWCYTS:215
HypothT12A7.4Cel: KPLGNKVRVILGIAGANFGLCACVHGLVGTWPTCNDNDGLWPGETCYPNPMNGQCAAS:283
HypothT01C3.4Cel: LPLNKKVEVMIGISGANYGICNCEGG-SATLEKTCNRVNLWPGDSCG--LNYLDGGLTP:237
HypothK12B6.3Cel: VSIISKVDVFGIAGANYGLCGCAGT-VGLFAPTCKKNGFWPGDSCG--YTSSFCGYSS:254
Lip_alkal     : LGIANKVRFVGIAGAFRCACVGVYPNVPTTTCGRYGLSINSPLVN-----:213
LipBBsu      : LGGGNKIQNVVTLGGANGLVSSSTALP-----:144
LipABsu      : LDGGNKVANVTLGGANRLTGTGKALP-----:146
Lip1Bli      : LDGGDKIENVVTLGGANGLVSSRALP-----:115
Konsensus    :      6       an

PhaZ7Ple      : SMRDMPAKRTAVSFYTLASAGFKDQVGCATASFWAGCDSAAKFASTSNVKAQINVGAGSN:317
HypothF31F6.7Cel: S-----DFLTDINEKNHYEGKYVFTLYTETDEWIG--YKTCDKITARIPEGEDGH:274
HypothC04B4.3Cel: S----FLQTKYSKFLTKLNKVHKKEAEFLASVWSKDEVFLKGNLVWGKQTSVLPVGSNIW:289
HypothF45E6.4Cel: T----CGEVPYSNYLMNLLNNSGKKDASFWASLWSDDEIILGKGNMVGWRQTSVLPVHSDMR:295
HypothF10F2.3Cel: G--SCKQEN-YSNLLQKTNDDPNREGDHYAMWSDVDEVLNLRGMVWGKPTARIPGMNGR:272
HypothT12A7.4Cel: LPSPCNGLT-YSKFLMDLNSRFKPAQHLEFSMWSMGDDLIGDGNMVGWRPTSEIIFSDSN:342
HypothT01C3.4Cel: LPWPCSGVN-YSSFLMQLNADKNKEGDYVFSMWSLSDLEIYGTQVWRSTCFIPTSDGK:296
HypothK12B6.3Cel: T--PCNGISKYSNLLNDMNSNKKEASYLFSVTSKADDLIGNSDIWVGRPTSLIPLSDGK:312
Lip_alkal     : -----SLANKRFNGKYQYATYSWVDEIVCNCAGYNAVCCYVYGVHSS:255
LipBBsu      : -----GTDPNQKILYTSIYSLNDQIVINSLSRLQGARNIQLYGIGH:185
LipABsu      : -----GTDPNQKILYTSIYSSADLVVNSLSRLDGARNVQIHGVGH:187
Lip1Bli      : -----GTDPNQKILYTSVYSSADLVVNSLSRLIGARNVLIHGVGH:156
Konsensus    :      5       D

PhaZ7Ple      : ATQADYDWDAGMPYNAGGDDTNGVGHFRKTNTGAI IQRMILLTCTGLDCAAEYTTGPK:377
HypothF31F6.7Cel: RIYKKYSHDEIILRTCDTQEMMQSHTSPSDVSEEPQSQIKRALPKSRQTRKRNIEDYDY:334
HypothC04B4.3Cel: KEYPQLTHMETKTETAADQFKIITSRSAPSAQTAKSYAKRKNWNFY-----:335
HypothF45E6.4Cel: KIYSDLKHNDVKLLTAEDQYNI IHMN----DQKFSLHETHEY-----:333
HypothF10F2.3Cel: WISDRNGHVAMKDLTELROFEAIVHHSI----DQKFSLHETHEY-----:300
HypothT12A7.4Cel: KIYKNYTHMETKLNAAADQFHIITQLTIP-----:371
HypothT01C3.4Cel: VVYHVYTHMETKELTYVDQYQMVKYKTIPTPTA-----:329
HypothK12B6.3Cel: I IYEKLTTHMQSKENTAI DQYKMTSKKV-----:340
Lip_alkal     : KPQILDGETSYSTVYPYGHFVLYTYTTTQRTYCARQ-----:291
LipBBsu      : IGLLSNSQVNGYIKEGLNGGLNTN-----:210
LipABsu      : IGLLYSSQVNSLIKEGLNGGQNTN-----:212
Lip1Bli      : IGLLTSSQVNGYIKEGLNGGQNTN-----:181
Konsensus    :

PhaZ7Ple      : AAY-----:380
HypothF31F6.7Cel: LSELSSSNFETAPQELQGSKMSQTVIPTTVRSYETVTRSYESSYLPPRIVKSDIDMNA:394
Konsensus    :

```

**Abb. 54:** (vorangehende Seite) Primärstrukturalignment der extrazellulären nPHASCL-Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei* mit aus genomischen DNA-Sequenzen von *Caenorhabditis elegans* abgeleiteten hypothetischen Proteinen (HypothF31F6.7Cel/ HypothC04B4.3Cel/ HypothF45E6.4Cel/ HypothF10F2.3Cel/ HypothT12A7.4Cel/ HypothT01C3.4Cel/ HypothK12B6.3Cel) und bakteriellen Lipasen mit ClustalX 1.8 (THOMPSON et al., 1997). Als Matrix diente die „Gonnet Serie“. Homologe Aminosäuren wurden mit steigendem Grad der Homologie dunkler schattiert. LipBBsu: *Bacillus subtilis* Lipase B, LipABsu: *Bacillus subtilis* Lipase A, Lip1Bli: *Bacillus licheniformis* Lipase; Lip\_alkal: putative alkalische Lipase eines unkultivierten Organismus. In der PhaZ7-Sequenz wurden in Mutagenese-Experimenten (R. BRAAZ, persönliche Mitteilung) bestätigte katalytisch aktive Reste (S, D, A, HG-Motiv) durch Fettdruck markiert.

Allen bisher untersuchten extrazellulären PHA<sub>SCL</sub>- und PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen war eine charakteristische Lipase-Consensus-Sequenz gemeinsam. Das Pentapeptidmotiv G-x<sub>1</sub>-S-x<sub>2</sub>-G ist hoch konserviert, wobei x<sub>1</sub> in Falle der dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen offenbar in Form eines Leucin ebenfalls konserviert vorlag. In Lipasen und anderen in der Gruppe der Serinhydrolasen zusammengefaßten hydrolytischen Enzymen bildet das zentrale Serin dieses als Lipasebox bezeichneten konservierten Sequenzmotives gemeinsam mit einer sauren Aminosäure (Aspartat, wie in allen bekannten dPHA-Depolymerasen oder Glutamat) und einem ebenfalls konservierten Histidin in der Tertiärstruktur das aktive Zentrum dieser Hydrolasen. Die funktionelle Einheit aus Serin, Histidin und Aspartat wird als katalytische Triade bezeichnet (PERSSON et al., 1989; OLLIS et al., 1992; JAEGER et al., 1994; JAEGER, 1999). Auch für dPHA-Depolymerasen wurde gezeigt, daß das aktive Zentrum einer solchen katalytischen Triade entspricht (HUISMAN, 1991; JENDROSSEK et al., 1995a, 1995b, 1997; SCHIRMER et al., 1995; SHINOHE et al., 1996). Das in PhaZ7 gefundene Motiv AHS<sub>136</sub>MG wich vom Konsensus der PHA-Depolymerasen ab und zeigte Homologie zu Lipasen und Esterasen der Lipasefamilien 1.4 und 1.5 aus *Bacillus* (ARPIGNY und JAEGER, 1999; von Position 130 bis 138 identisch mit LipA und LipB aus *B. subtilis*) sowie zu den aus genomischen Sequenzen abgeleiteten (Lipase-ähnlichen) Proteinen aus *Caenorhabditis elegans*.

Eine weitere Region etwas geringerer Homologie befand sich im Bereich von D<sub>242</sub>. Der Bereich entsprach der Konsensussequenz GxxD um das an der katalytischen Triade beteiligte Aspartat extrazellulärer dPHA<sub>SCL</sub>- und PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen. In intrazellulären PHA<sub>MCL</sub> Depolymerasen kann Valin durch eine andere hydrophobe Aminosäure, z. B. Leucin (*P. oleovorans*, *P. aeruginosa* substituiert sein.

Histidin 306 als potentielle dritte Komponente der katalytischen Triade entsprach mit seiner Umgebung der minimalen Konsensussequenz der PHA-Depolymerasen GxxH.

Die Ähnlichkeiten der Umgebung des Histidin 47 („HG-Motiv“) mit einer konservierten Region aus *Caenorhabditis elegans* (8 identische Aminosäuren) und der Oxyaniontasche von LipA und LipB (Lipase-Konsensus: \*\*\*HG\* ; \*hydrophobe/ungeladene Aminosäure) unterstrich die Zugehörigkeit von PhaZ7 zur Familie der Serinhydrolasen. Alle gefundenen Homologien schienen auf maximal 65 % der N-terminalen PhaZ7 Sequenz beschränkt. Der Abstand zwischen der postulierten Oxyaniontasche und dem katalytisch aktiven Serin sowie dem katalytischen Serin und dem potentiellen Aspartat der katalytischen Triade war in der Primärstruktur der putativen Enzyme aus *Caenorhabditis elegans* und PhaZ7 bis 25 bzw. 51 Aminosäuren größer als in den Lipasen.

Mit Hilfe der „CD (conserved domain)-Search“-Programmes (s. 2.17.19.3.) erfolgte basierend auf strukturellen Vergleichen eine Zuordnung der nPHB-Depolymerase zur Gruppe der von OLLIS et al. (1992) definierten  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen [pfam00561], welche sich durch eine charakteristische Abfolge von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern auszeichnet. Aufgrund der Homologien im Bereich der 78. bis 226. Aminosäure wurde PhaZ7 der Gruppe der Lipasen Typ 2 [pfam01674] zugeordnet, deren Vertreter neben den erwähnten hypothetischen Proteinen aus *C. elegans* verschiedene Lipasen wie LipA, LipB aus *Bacillus subtilis* sowie Triacylglycerol-Lipasen (*Propionibacterium acnes*) sind.

Die Ermittlung der potentiellen Sekundärstruktur (Abb. 55) und ein Abgleich gegen die SCOP [structural classification of proteins]-Datenbank erfolgten zusätzlich mit dem 3D-PSSM-Programm (KELLEY et al., 2000), welches Sekundär- und Tertiärstrukturinformationen der Datenbank nutzt, um eine positionsspezifische Wertungsmatrix für ein Sekundärstruktur-Alignment zu erstellen und Strukturvorhersagen zu treffen (FISCHER et al., 1999; KELLEY et al., 1999). Die Zugehörigkeit zur Superfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen wurde bestätigt. Wie bereits im Primärstrukturalignment (Abb. 54) erkennbar, handelte es sich bei den am nächsten stehenden bekannten Enzymen offenbar um Lipasen und Lipase-ähnliche Proteine. Signifikante Homologien (E-Wert < 1) bestanden zu Lipasen aus *Chromobacterium viscosum*; *P. aeruginosa* sowie LipA aus *B. subtilis*. Die in Tab. 20 zusammengefaßten Ergebnisse der Analyse zeigten, daß ein höherer Grad an Identität auf Aminosäureebene nicht zwangsläufig mit einer signifikanteren Zuordnung zu einer bestimmten Proteingruppe einherging (vergleiche d1cvl und cli6wa). Aufgrund der begrenzten Homologien war ein Tertiärstruktur-Homologiemodeling mit den in SCOP, PDB und SwissProt vorhandenen 3D-Strukturen bekannter Lipasen wenig aussagekräftig. Die Charakterisierung wurde deshalb auf die eingehende Sekundärstrukturanalyse beschränkt.

Tab. 20: Verwandtschaftsanalyse von Phaz7 mit Proteinen bekannter Tertiärstruktur mit Hilfe des Programmes 3D-PSSM (KELLEY et al., 2000).

Domänen- bezeichnung	Länge [AS]	Identität [%]	E-Wert [3D-PSSM]	Klasse	Superfamilie	Familie	Protein / Organismus	Referenz
dlcvl	316	17	0,0444	$\alpha/\beta$ -Proteine	$\alpha/\beta$ -Hydrolasen	bakterielle Lipasen	Lipase/ <i>Chromobacterium viscosum</i>	LANG et al., 1996
clcx9a	285	17	0,0605	$\alpha/\beta$ -Proteine	$\alpha/\beta$ -Hydrolasen	Lipase-homologe	Lipase/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NARDINI et al., 2000
clio6a	179	20	0,13	$\alpha/\beta$ -Proteine	Hydrolasen (PDB)	bakterielle Lipasen der Homologiefamilie 1.4	LipA / <i>B. subtilis</i>	VAN POUDEROYEN et al., 2001
dlc19a	279	11	1,36	$\alpha/\beta$ -Proteine	$\alpha/\beta$ -Hydrolasen	Thioesterasen	Palmitoyl-Protein Thioesterase 1 / <i>Bos taurus</i>	BELLIZZI et al., 2000
dlbs9	207	16	12,2	$\alpha/\beta$ -Proteine	Flavodoxinartige	Cutinase-ähnliche	Acetylxyilan-Esterase / <i>Penicillium purpurogenum</i>	GHOSH et al., 1999
dlq14a	256	13	12,5	$\alpha/\beta$ -Proteine	$\alpha/\beta$ -Hydrolasen	Hydroxynitril-Lyase	Hydroxynitril-Lyase / <i>Hevea brasiliensis</i>	GRUBER et al., 1999
dlk1a2	319	13	14,9	$\alpha/\beta$ -Proteine	$\alpha/\beta$ -Hydrolasen	Epoxid-Hydrolase	Epoxid-Hydrolase / <i>Mus musculus</i>	ARGIRIADI et al., 2000
dlas8	273	16	16,3	$\alpha/\beta$ -Proteine	$\alpha/\beta$ -Hydrolasen	Haloperoxidase	Chloroperoxidase F / <i>P. fluorescens</i>	HOFMAN et al., 1998
dltea	317	16	16,3	$\alpha/\beta$ -Proteine	$\alpha/\beta$ -Hydrolasen	Pilz-Lipasen	Triacylglycerol-Hydrolase LipB (E.C.3.1.1.3) / <i>Candida antarctica</i>	UPPENBERG et al., 1994
cl1jfa	255	13	16,3	$\alpha/\beta$ -Proteine	Hydrolasen (PDB)	n.b.	Ferulylesterasedomäne der Xylanase Z / <i>Clostridium thermoecellum</i>	SCHUBOT et al., 2001

Die Domänenbezeichnung entspricht den Angaben der SCOPE-Datenbank. Signifikante Erwartungswerte sind grau hinterlegt. n.b. = nicht beschrieben.



Die in Abb. 55 gezeigten Sekundärstrukturalignments verdeutlichen die Konservierung der Abfolge von  $\alpha$ -Helix/ $\beta$ -Faltblatt. Stärkere Abweichungen fanden sich vor allem im C-terminalen Bereich, wohingegen die N-terminale Region von PhaZ7 mit Oxyaniontasche und der Lipasebox den Lipase-Sekundärstrukturen nahe kam. Mit Lipase aus *C. viscosum* sank ab Position 169 die Ähnlichkeit mit zunehmender Entfernung von der Lipasebox, so daß ein zuverlässiges Alignment der katalytisch aktiven Aspartat- (d1cvl: D263/PhaZ7: D242) und Histidinreste (d1cvl: H285/PhaZ7: H306) im Gesamtstrukturalignment nicht mehr möglich war.

```

1                               50
phaZ7___Seq  LTCGTNSGFV CKGTQTQYAG GFAPGVGYGG FGGGSCTATK TPVIFIHGNG
d1cvl___Seq  ..... ..ADTYAATR YPVILVHGLA
-----
                               +----AT+ +PVI++HG++

51                               100
phaZ7___Seq  DNAISFDMPP GNVSGYGTPA RSVYAEKAR GYNDCEIFGV TYLSSSEQGS
d1cvl___Seq  GT.DKFANVV D.....YW YGIQSDLQSH G...AKVY.. ....VANLSG
-----
++ ++F++++ +      ++ +++++L+++ G  +++++ +++++

101                              150
phaZ7___Seq  AQYNYHSSTK YAIKTFIDK VKAYTGKSQV DIVAHSMGVS MSLATLQYYN
d1cvl___Seq  FQSDDGPNGR GEQLLAYVKQ VLAATGATKV NLIGHSQGGL TSRYVA..AV
-----
+Q++++++++ ++++++++ V+A+TG+++V +++++HS+G++ +S++++ ++

151                              200
phaZ7___Seq  NWTSVRKFIN LAGGIRGLYS C..... YYTGYAN... .....AAAP
d1cvl___Seq  APQLVASVTT IGTPHRGSEF ADFVQDVLKT DPTGLSSTVI AAFVNVFGTL
-----
+++V+++++ +++++RG+- +      ++TG+++ +---

201                              250
phaZ7___Seq  TCGSQNYNS YTFGF..FPE GWYYGVWVSN PWTGSGSTNS MRDMPAKRT.
d1cvl___Seq  VSSSHNTDQD ALAALRTLTT AQTATYRNRF PSAGLGAPGS CQTGAA TETV
-----
++S-N---+ +++++ --- +++++--- P--G-G---S +----A--T

251                              300
phaZ7___Seq  .....AVSF YTLSAGFKDQ VGCATASFWA GCD..... SAA
d1cvl___Seq  GGSQHLLYSW GGTAIQPTST VTGATDTSTG TLDVANVTD P STLALLATGA
-----
--S+ ---+----- V--AT----- --D      ++A

301                              350
phaZ7___Seq  KFASTTSNVK AQINVGAGS. ....NATQ ADYDW..ADG MPYNAG..GG
d1cvl___Seq  VMINRASG.. ..QNDGLVSR CSSLFGQVIS TSYHWNHLDE INQLLGVRGA
-----
-+-+--+S+      -N-G--S      ++++ ++Y-W  -D- +----G  G+

351                              394
phaZ7___Seq  DTTNGVGHFR TKTNTGAIIQ RMLLTCTGL DCAAEYTTGP KAAY
d1cvl___Seq  NAEDPVAVIR T.....HVN RLKQGV... .....
-----
++++-V+-+R T      +-+ R+-L---

```

**Abb. 55 (A):** Sekundärstrukturalignment der nPHB-Depolymerase PhaZ7 (reifes Protein) mit Lipase aus *Chromobacterium viscosum* (d1cvl). Potentielle Helices sind blau, an Faltblattstrukturen beteiligte Bereiche gelb hinterlegt. In der untersten Alignmentzeile ist jeweils die Konsensussequenz dargestellt. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sowie der Oxyaniontasche sind durch Fettdruck hervorgehoben. Hinsichtlich Ladung und/oder Hydrophobizität sowie Größe ähnliche Aminosäuren sind in der Konsensussequenz mit „+“ gekennzeichnet.

```

1                                     50
phaZ7__Seq  LTCGTNSGFV CKGTQTQYAG GFAPGVGYGG FGGGSCTATK TPVIFIHGNG
cli6wa__Seq  .....H NPVVMVHGIG
-----
+ +PV+++HG+G

51                                     100
phaZ7__Seq  DNAISFDMPP GNVSGYGTPA RSVYAELKAR GYNDCEIFGV TYLSSSEQGS
cli6wa__Seq  GASFNE..... AGIKSYLVSQ GWSRDKLYAV DEFWDKTGT..
-----
+++++F -+++++L-++ G++++++V +++++++

101                                     150
phaZ7__Seq  AQYNYHSSTK YAIIKTFIDK VKAYTGKSQV DIVAHSMGVS MSLATLQYYN
cli6wa__Seq  .....NYNN GPVLSRFVQK VLDETGAKKV DIVAHSMGGA NTLYYIKNLD
-----
+--+ ++-+-+F+K V+++TG+++V DIVAHSMG++ ++L++++++

151                                     200
phaZ7__Seq  NWTSVRKFIN LAGGIRGLYS CYYTGYANAA APTCGSQNY NSYTFGFFPE
cli6wa__Seq  GGNKVANVVT LGGANRLTTG KALPGTD... ..PNQKI... ..
-----
+++++V+++++ L+G++R-+++ -+++G++ +++++

201                                     250
phaZ7__Seq  GWYYGVWVSN PWTGSGSTS MRDMPAKRTA VSFYTLSAGF KDQVGCATS
cli6wa__Seq  ..... L YTSIYSS... ADMIVMNYLS
-----
+ +--+--S D+++--+S

251                                     300
phaZ7__Seq  FWAGCDSAAK FASTTSNVKA QINVGAGSNA TQADYDWADG MPYNAGGGDT
cli6wa__Seq  ..... ..RLDGARNV QIH.....
-----
---+---+ QI

301                                     342
phaZ7__Seq  TNGVGHFRTK TNTGAIIQRM LLTTCTGLDC AAEYTTGPKA AY
cli6wa__Seq  ..GVGHIGLL YSSQVNSLIK EGLNGGGQNT N.....
-----
..GVGH+--- +---+----- -+++

```

**Abb. 55 (B):** Sekundärstrukturalignment der nPHB-Depolymerase PhaZ7 (reifes Protein) mit Lipase A aus *B. subtilis*. Im Bereich 250 bis 331 erfolgte eine partielle Nachbearbeitung mit BestFit. (Formatierungen analog Abb. 55a).

Alle katalytisch aktiven Reste von PhaZ7 lagen topologisch wie von OLLIS et al. (1992) gefordert in potentiellen Loop-Regionen. Im Bereich des katalytisch aktiven Serins besaß PhaZ7 offenbar eine ausgeprägtere Coil-Struktur (4 Aminosäuren inklusive S<sub>136</sub>) als die im Alignment (Abb. 54; 55) gezeigten Lipasen, deren funktionelles Serin den direkten Loop zwischen vorangehendem  $\beta$ -Faltblatt und unmittelbar nachfolgender Helixstruktur bildete. Eine weitere Besonderheit stellte die Anordnung eines sowohl in LipA als auch in PhaZ7 vorhandenen Sequenzmotives GGGxxTN dar. Dieser einer Coiled-Struktur zugeordnete Sequenzabschnitt befand sich bei LipA in der Primärstruktur hinter dem konservierten Histidin der katalytischen Triade und bildete den C-Terminus des Enzyms. Das gleiche Motiv konnte in PhaZ7 unmittelbar vor dem potentiell am Hydrolysemechanismus von nPHAS<sub>CL</sub> beteiligten Histidin<sub>306</sub> nachgewiesen werden. Derartige Sequenzrearrangements sind möglicherweise typisch für einander evolutiv nahestehende Enzyme.

Die Richtigkeit der getroffenen Vorhersagen für katalytisch aktive Aminosäuren der nPHB<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 wurde durch einen Austausch der Aminosäuren S<sub>136</sub>, D<sub>242</sub> und H<sub>306</sub> gegen Alanin mittels gerichteter Mutagenese nach KUNKEL et al. (1987; 1991) bestätigt. Die beobachteten Restaktivitäten nach einer Substitution lagen jeweils unter 4 % (S<sub>136</sub> versus A; D<sub>242</sub> versus A; H<sub>306</sub> versus A) (BRAAZ, persönliche Mitteilung). Ein Austausch des D<sub>256</sub> gegen Alanin hingegen führte zu keiner Verringerung der Aktivität, so daß eine Beteiligung dieser Aminosäure an der nPHAS<sub>CL</sub>-Hydrolyse nicht zu erwarten sein sollte.

Weder die von anderen Autoren für extrazelluläre dPHA-Depolymerasen postulierte Substratbindedomäne (FUKUI et al., 1988; BEHREND'S et al., 1996; NOJIRI und SAITO, 1997;

OHURA et al., 1999) noch entsprechende Linker-Regionen, die charakteristischerweise zwischen katalytischer- und Substratbindedomäne von dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen vorkommen [Threonin-reiche Regionen im Falle von PhaZ1, PhaZ2, PhaZ3, PhaZ5 und PhaZ6 oder die für PhaZ4 aus *P. lemoignei*, die dPHB-Depolymerase aus *Alcaligenes faecalis* und Chitinase aus *Bacillus circulans* (WATANABE et al., 1992) beschriebene Fibronectin Typ III (Fn3) Domäne bzw. ein Cadherin-ähnlicher Linker, wie bei PhaZ aus *P. stutzeri* (OHURA, 1999)] waren über die Homologiesuche nachweisbar. Das Fehlen dieser für dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen charakteristischer Merkmale (JENDROSSEK, 2001b) unterstrich die bereits aufgrund der biochemischen Daten bestätigte Abgrenzung der extrazellulären nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei* von allen anderen bekannten PHA-Depolymerasen. Die gefundenen Homologien zu Lipasen und Lipase-ähnlichen Enzymen sowie die Sekundärstrukturvergleiche bestätigten, daß die Hydrolyseaktivität der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 wie im Falle anderer Serin-Hydrolasen auf einer katalytischen Triade beruhen könnte. An der Polymerhydrolyse wären aufgrund der dargestellten Sequenz- und Strukturvergleiche Serin 136, Aspartat 242 und Histidin 306 als Bestandteile der katalytischen Triade und eine Oxyaniontasche in Bereich des Histidin 47 als zentraler Aminosäure beteiligt.

Die Reihenfolge Oxyaniontasche, katalytisch aktives Serin, Aspartat, Histidin (vom N zum C-Terminus) in der Primärstruktur der potentiellen katalytischen Domäne entsprach der Anordnung in Typ 1 PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* (PhaZ1 bis 6), *A. faecalis* T1, *A. faecalis* AE122, *Ralstonia pickettii* A1, *Ralstonia pickettii* K1, *Streptomyces hygroscopicus*, *Pseudomonas stutzeri* sowie aus *Pseudomonas* sp. GM101 (s. 1., Abb. 2).

Obwohl PhaZ7 infolge der Homologievergleiche in Bezug zu Lipasen zu stehen schien, wurde aufgrund der unter 3.7. beschriebenen biochemischen Eigenschaften, insbesondere dem Fehlen jeglicher lipolytischer Aktivität mit Triolein oder Tributyrin und anderen Lipiden bei hoher Spezifität für nPHA<sub>SCL</sub>, und dem dargestellten geringen Grad der Homologie eine Zuordnung des Enzyms zu einer neuartigen Serinesterasefamilie (Familie 9, extrazelluläre PHA-Depolymerasen, Unterfamilie 9.1, extrazelluläre nPHA-Depolymerasen) vorgeschlagen (HANDRICK et al. 2001; JENDROSSEK und HANDRICK 2001; JENDROSSEK und HANDRICK, 2002).

### 3.8.9. Charakterisierung des potentiellen ORF 2

Der nach Analyse der DNA-Sequenzdaten vorhergesagte zweite offene Leserahmen (3.8.5., Abb. 47) von 1116 Nukleotiden Länge lag mit einem durchschnittlichen G+C-Gehalt von 60,3 % signifikant über dem G+C-Gehalt des sequenzierten Bereiches. Codonauswahl und Basenverteilung (Codonposition 1: 58,8%; Position 2: 41,9 %, Position 3: 63,5 %) entsprachen qualitativ, wie im Falle von *phaZ4* den Regeln nach BIBB et al. (1984) und wichen damit von dem für die Strukturgene der anderen Depolymerasen aus *P. lemoignei* ermittelten Muster ab (Tab. 19).

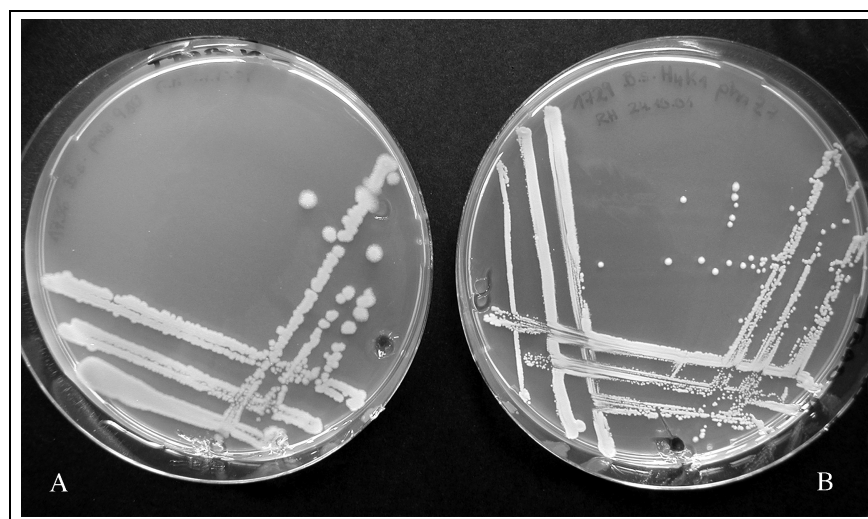
ORF2P1	:121	-----DALDRA <b>LAE</b> SVARYSTTARQSQ-	: 142
1AsgDMx	:481	RSLLCVPLRTQGRVVGTLVSGRMGPGRSFTQEDQELVEELAAKAALS <b>IENARLFAEQ</b> RS	: 540
2SdeKMx	:253	-----LF <b>AICR</b> DVTARRRQELERE <b>EEAR</b> -	: 275
3BphPa	:445	TIGPSGPRLTPRGSFEAWEEVVRGHSTPWSETDLAIAEKLR <b>LDLMLCLNHAAE</b> VDRMR-	: 504
4StPa	: 1	-----MELCLNHAAE <b>VDRMR</b> -	: 15
5ShkBh	: 9	-----QASKN <b>LQQA</b> TARGDFSESSK--	: 128
6AfsQ2	:166	-----SAAEN <b>LEKRV</b> ADMAGRE <b>QASR</b> -	: 286
ORF2P1	:	-----DIF <b>LGV</b> LGHDL <b>RAP</b> THALS- <b>LGAQY</b> LMRSEDA----- <b>DSKLIQ</b> L	: 180
1AsgDMx	:	QEELRRRAEF <b>EQQLV</b> GI <b>VSHDL</b> RNPAAIS- <b>MSAGL</b> LEKKGAL-----TE <b>PQKR</b> M	: 589
2SdeKMx	:	-----FQ <b>ERF</b> L <b>GV</b> LGHDLGN <b>PIA</b> AVR- <b>LSSAA</b> LARDTL-----P <b>PEV</b> RRV	: 315
3BphPa	:	-----Q <b>RL</b> LAVLGHDL <b>RNP</b> Q <b>SIS</b> - <b>MAAAL</b> LSSS-----D <b>TRT</b> TEL	: 539
4StPa	:	-----Q <b>RL</b> LAVLGHDL <b>RNP</b> Q <b>SIS</b> - <b>MAAAL</b> LSSS-----D <b>TRT</b> TEL	: 50
5ShkBh	:	-----D <b>Q</b> L <b>VN</b> L <b>AHDL</b> R <b>TPT</b> TS <b>VIGY</b> LDL <b>LK</b> EKDLT-----E <b>EQV</b> RHF	: 167
6AfsQ2	:	-----R <b>FV</b> AD <b>MS</b> HE <b>LRT</b> P <b>TAL</b> TAV <b>TEV</b> LEEE <b>EY</b> AGEGEGEGGS <b>FDP</b> M <b>VEPA</b>	: 334
ORF2P1	:	GSR <b>M</b> F <b>N</b> S <b>T</b> V <b>R</b> M <b>Q</b> A <b>L</b> D <b>N</b> L <b>D</b> F <b>T</b> R <b>S</b> R <b>T</b> G <b>I</b> G <b>P</b> R <b>I</b> E <b>E</b> V <b>D</b> L <b>A</b> V <b>S</b> E <b>O</b> T <b>A</b> E <b>F</b> R <b>A</b> L <b>N</b> P <b>G</b> -- <b>KI</b>	: 238
1AsgDMx	:	V <b>WR</b> I <b>G</b> O <b>A</b> E <b>R</b> A <b>R</b> M <b>I</b> R <b>D</b> L <b>D</b> F <b>T</b> K <b>A</b> R <b>L</b> G <b>G</b> I <b>A</b> L <b>H</b> R <b>O</b> T <b>T</b> D <b>L</b> R <b>E</b> V <b>H</b> O <b>V</b> D <b>E</b> L <b>L</b> V <b>A</b> N <b>P</b> G-- <b>RR</b>	: 647
2SdeKMx	:	V <b>A</b> R <b>I</b> D <b>G</b> S <b>A</b> E <b>R</b> M <b>A</b> R <b>L</b> V <b>K</b> O <b>L</b> L <b>D</b> F <b>T</b> R <b>A</b> R <b>M</b> A <b>G</b> G <b>I</b> P <b>L</b> R <b>P</b> E <b>V</b> C <b>M</b> E <b>D</b> V <b>C</b> R <b>R</b> I <b>I</b> S <b>E</b> L <b>E</b> P <b>A</b> H <b>P</b> E-- <b>CC</b>	: 373
3BphPa	:	R <b>Q</b> H <b>I</b> S <b>A</b> S <b>S</b> R <b>M</b> E <b>R</b> L <b>V</b> S <b>Q</b> I <b>L</b> D <b>M</b> S <b>R</b> L <b>Q</b> S <b>G</b> I <b>G</b> L <b>T</b> V <b>N</b> P <b>V</b> D <b>T</b> D <b>V</b> S <b>Q</b> L <b>V</b> R <b>O</b> I <b>V</b> C <b>E</b> T <b>D</b> V <b>A</b> Y <b>P</b> G-- <b>LV</b>	: 597
4StPa	:	R <b>Q</b> H <b>I</b> S <b>A</b> S <b>S</b> R <b>M</b> E <b>R</b> L <b>V</b> S <b>Q</b> I <b>L</b> D <b>M</b> S <b>R</b> L <b>Q</b> S <b>G</b> I <b>G</b> L <b>T</b> V <b>N</b> P <b>V</b> D <b>T</b> D <b>V</b> S <b>Q</b> L <b>V</b> Q <b>O</b> I <b>V</b> C <b>E</b> T <b>D</b> V <b>A</b> Y <b>P</b> G-- <b>LV</b>	: 108
5ShkBh	:	L <b>M</b> I <b>A</b> F <b>T</b> R <b>S</b> <b>Q</b> R <b>L</b> R <b>L</b> D <b>E</b> L <b>F</b> E <b>I</b> T <b>R</b> M <b>Y</b> C-- <b>M</b> I <b>P</b> V <b>N</b> K <b>K</b> N <b>I</b> D <b>L</b> S <b>D</b> L <b>L</b> O <b>L</b> K <b>E</b> E <b>L</b> Y <b>P</b> L <b>F</b> E <b>K</b> N <b>H</b> L <b>I</b>	: 226
6AfsQ2	:	V <b>R</b> L <b>V</b> S <b>E</b> T <b>R</b> I <b>N</b> D <b>L</b> V <b>E</b> N <b>L</b> M <b>E</b> V <b>T</b> R <b>F</b> D <b>A</b> G-- <b>T</b> A <b>R</b> L <b>V</b> L <b>D</b> D <b>V</b> D <b>V</b> A <b>D</b> O <b>T</b> A <b>C</b> I <b>D</b> A <b>R</b> A <b>W</b> L <b>D</b> A <b>V</b> ---	: 389
ORF2P1	:	I <b>K</b> T <b>H</b> A <b>E</b> G <b>N</b> V <b>S</b> G <b>W</b> L <b>D</b> A <b>G</b> R <b>I</b> G <b>O</b> I <b>Y</b> O <b>N</b> L <b>I</b> G <b>N</b> A <b>L</b> O <b>Y</b> G <b>M</b> A <b>C</b> T <b>P</b> V <b>S</b> L <b>T</b> R <b>E</b> D <b>G</b> - <b>E</b> E <b>I</b> L <b>S</b> V <b>H</b> N <b>D</b> G <b>P</b>	: 297
1AsgDMx	:	V <b>E</b> V <b>E</b> V <b>Q</b> E <b>V</b> R <b>G</b> E <b>W</b> S <b>D</b> R <b>I</b> A <b>Q</b> V <b>L</b> T <b>N</b> L <b>L</b> G <b>N</b> A <b>L</b> A <b>Y</b> S <b>P</b> A <b>D</b> A <b>P</b> V <b>R</b> V <b>D</b> T <b>R</b> L <b>E</b> G-- <b>E</b> A <b>A</b> L <b>S</b> V <b>E</b> N <b>G</b> G <b>A</b>	: 706
2SdeKMx	:	V <b>R</b> L <b>E</b> V <b>D</b> G <b>E</b> S <b>R</b> G <b>I</b> W <b>D</b> E <b>E</b> R <b>L</b> G <b>O</b> V <b>L</b> S <b>N</b> L <b>L</b> G <b>N</b> A <b>L</b> O <b>H</b> S <b>P</b> E <b>G</b> S <b>S</b> V <b>R</b> V <b>R</b> L <b>A</b> A <b>K</b> D <b>S</b> L <b>F</b> O <b>R</b> V <b>E</b> V <b>H</b> N <b>G</b> G <b>P</b>	: 433
3BphPa	:	I <b>E</b> I <b>A</b> I <b>D</b> P <b>O</b> V <b>R</b> A <b>V</b> D <b>P</b> D <b>Y</b> A <b>Q</b> V <b>A</b> A <b>N</b> L <b>L</b> S <b>N</b> A <b>R</b> H <b>H</b> G <b>L</b> P <b>C</b> R <b>P</b> V <b>L</b> V <b>T</b> L <b>T</b> R <b>O</b> G-- <b>D</b> E <b>V</b> C <b>L</b> S <b>V</b> L <b>N</b> E <b>T</b> S	: 656
4StPa	:	I <b>E</b> I <b>A</b> I <b>D</b> P <b>O</b> V <b>R</b> A <b>V</b> D <b>P</b> D <b>Y</b> A <b>Q</b> V <b>A</b> A <b>N</b> L <b>L</b> S <b>N</b> A <b>R</b> H <b>H</b> G <b>L</b> P <b>C</b> R <b>P</b> V <b>L</b> V <b>T</b> L <b>T</b> R <b>O</b> G-- <b>D</b> E <b>V</b> C <b>L</b> S <b>V</b> L <b>N</b> E <b>T</b> S	: 167
5ShkBh	:	A <b>R</b> T <b>N</b> M <b>K</b> T <b>P</b> I <b>P</b> I <b>L</b> G <b>D</b> G <b>E</b> L <b>L</b> A <b>R</b> V <b>F</b> E <b>N</b> L <b>L</b> T <b>N</b> A <b>N</b> R <b>Y</b> G <b>Y</b> D <b>C</b> K <b>F</b> I <b>D</b> I <b>N</b> G <b>F</b> I <b>D</b> S-- <b>E</b> E <b>V</b> V <b>I</b> O <b>I</b> V <b>N</b> Y <b>G</b> D	: 285
6AfsQ2	:	- <b>D</b> L <b>D</b> A <b>E</b> R <b>G</b> V <b>H</b> A <b>R</b> L <b>D</b> P <b>R</b> L <b>D</b> V <b>L</b> A <b>N</b> L <b>I</b> G <b>N</b> A <b>L</b> K <b>H</b> G-- <b>G</b> S <b>P</b> V <b>R</b> V <b>S</b> A <b>R</b> A <b>D</b> - <b>H</b> E <b>I</b> V <b>I</b> R <b>V</b> R <b>N</b> D <b>G</b> P	: 445
ORF2P1	:	P <b>I</b> P <b>P</b> E <b>V</b> K <b>K</b> N <b>I</b> F <b>D</b> P <b>L</b> R <b>R</b> F <b>A</b> D <b>G</b> E <b>K</b> - <b>T</b> A <b>D</b> R <b>K</b> N <b>L</b> G <b>L</b> G <b>L</b> N <b>I</b> V <b>R</b> E <b>I</b> V <b>L</b> A <b>H</b> <b>Q</b> G <b>T</b> I <b>N</b> V <b>S</b> T <b>Q</b> D <b>M</b> G <b>T</b> T	: 356
1AsgDMx	:	P <b>I</b> P <b>R</b> E <b>L</b> L <b>P</b> R <b>L</b> F <b>E</b> P <b>L</b> T <b>R</b> G <b>A</b> L <b>K</b> E--- <b>G</b> Q <b>S</b> T <b>R</b> S <b>I</b> G <b>L</b> G <b>L</b> Y <b>I</b> V <b>Q</b> D <b>I</b> V <b>R</b> G <b>H</b> G <b>G</b> G <b>V</b> E <b>V</b> S <b>S</b> E <b>Q</b> H <b>G</b> T <b>T</b>	: 763
2SdeKMx	:	P <b>I</b> P <b>E</b> S <b>L</b> R <b>E</b> R <b>L</b> F <b>S</b> P <b>F</b> H <b>G</b> V <b>P</b> E <b>P</b> G <b>P</b> K <b>P</b> K <b>H</b> O <b>G</b> L <b>G</b> L <b>G</b> L <b>Y</b> I <b>V</b> S <b>Q</b> I <b>V</b> T <b>A</b> H <b>G</b> G <b>W</b> L <b>D</b> V <b>A</b> S <b>S</b> A <b>D</b> T <b>G</b> T <b>C</b>	: 493
3BphPa	:	G <b>L</b> S <b>E</b> A <b>O</b> I <b>A</b> N <b>L</b> F <b>E</b> P <b>F</b> K <b>R</b> E <b>S</b> A <b>D</b> N--- <b>Q</b> R <b>N</b> R <b>N</b> G <b>L</b> G <b>I</b> G <b>L</b> Y <b>I</b> S <b>Q</b> A <b>I</b> A <b>O</b> A <b>H</b> <b>Q</b> G <b>R</b> I <b>D</b> V <b>C</b> R <b>D</b> D <b>V</b> - <b>I</b> T	: 712
4StPa	:	G <b>L</b> S <b>E</b> A <b>O</b> I <b>A</b> N <b>L</b> F <b>E</b> P <b>F</b> K <b>R</b> E <b>S</b> A <b>D</b> N--- <b>Q</b> R <b>N</b> R <b>N</b> G <b>L</b> G <b>I</b> G <b>L</b> Y <b>I</b> S <b>Q</b> A <b>I</b> A <b>O</b> A <b>H</b> <b>Q</b> G <b>R</b> I <b>D</b> V <b>C</b> R <b>D</b> D <b>V</b> - <b>I</b> T	: 223
5ShkBh	:	Q <b>I</b> P <b>P</b> D <b>E</b> L <b>P</b> H <b>V</b> F <b>D</b> M <b>F</b> Y <b>T</b> G <b>D</b> K <b>A</b> R--- <b>T</b> K <b>D</b> D <b>S</b> T <b>G</b> L <b>G</b> L <b>E</b> L <b>A</b> K <b>N</b> I <b>V</b> E <b>O</b> H <b>G</b> G <b>T</b> V <b>T</b> A <b>D</b> S <b>S</b> L <b>I</b> R-- <b>T</b> V	: 340
6AfsQ2	:	G <b>I</b> P <b>E</b> D <b>V</b> L <b>P</b> H <b>V</b> F <b>D</b> R <b>F</b> Y <b>K</b> A <b>S</b> A <b>S</b> R--- <b>P</b> R <b>S</b> E <b>G</b> S <b>G</b> L <b>G</b> L <b>S</b> H <b>A</b> L <b>E</b> N <b>A</b> H <b>I</b> H <b>G</b> E <b>I</b> T <b>A</b> E <b>N</b> A <b>P</b> E <b>G</b> G <b>A</b> V	: 501
ORF2P1	:	F <b>T</b> V <b>R</b> L <b>P</b> K <b>S</b> I <b>K</b> P <b>T</b> I <b>A</b> A-----	: 371
1AsgDMx	:	F <b>T</b> V <b>R</b> L <b>P</b> R <b>A</b> A <b>G</b> -----	: 773
2SdeKMx	:	F <b>S</b> V <b>T</b> L <b>P</b> R <b>V</b> T <b>R</b> P <b>L</b> G <b>G</b> P <b>P</b> G <b>K</b> T <b>A</b> -----	: 513
3BphPa	:	F <b>C</b> L <b>R</b> L <b>P</b> V <b>R</b> Q <b>A</b> E <b>T</b> G <b>S</b> S <b>S</b> -----	: 728
4StPa	:	F <b>C</b> L <b>R</b> L <b>P</b> V <b>R</b> Q <b>A</b> E <b>T</b> G <b>S</b> S <b>S</b> -----	: 239
5ShkBh	:	F <b>E</b> V <b>R</b> L <b>P</b> E <b>D</b> K <b>A</b> V-----	: 351
6AfsQ2	:	F <b>T</b> L <b>R</b> L <b>P</b> Q <b>D</b> P <b>S</b> P <b>P</b> A <b>E</b> D <b>E</b> D <b>G</b> G <b>P</b> D <b>E</b> E <b>T</b> D <b>R</b> G <b>K</b> D <b>A</b> K <b>G</b> Q <b>V</b>	: 535

**Abb. 56:** Partielles Primärstrukturalignment der aus dem potentiellen ORF 2 aus *P. lemoignei* abgeleiteten Aminosäuresequenz mit abgeleiteten Proteinsequenzen aus GenBank mittels ClustalX 1.8 (THOMPSON et al., 1997). Als Matrix diente die „Gonnet Serie“. Homologe Aminosäuren wurden mit steigendem Grad der Homologie dunkler schattiert. Verwendete Kurzbezeichnungen: ORF2P1, ORF2 aus *P. lemoignei*; 1AsgDMx, Histidin-Proteinkinase AsgD aus *Myxococcus xanthus*; 2SdeKMx, Histidinkinase homologes Protein aus *Myxococcus xanthus*; 3BphPa, homologes Protein zu Bacteriophytochrom aus *Pseudomonas aeruginosa*; 4StPa, potentieller Sensor/Transducer aus *P. aeruginosa*; 5ShkBh, potentielle Zweikomponenten Sensorhistidinkinase aus *Bacillus halodurans*; 6AfsQ2, Sensorprotein AfsQ2 aus *Streptomyces coelicolor* (ISHIZUKA et al., 1992).

Vier Nukleotide stromaufwärts des potentiellen Startcodons war mit „AAGG“ eine mögliche Shine-Dalgarno-Sequenz (SHINE und DALGARNO, 1994) lokalisiert (s. 3.8.6.2., Abb. 51). Die abgeleitete Aminosäuresequenz wies im Datenbankabgleich in GenBank, EMBL und SWISSProt zwischen Aminosäureposition 121 und 371 bis zu 40 % Identität bei 59 % Ähnlichkeit zur Gruppe der Sensor-Histidinkinasen der Zweikomponenten-Transkriptionsregulation auf. Für eine potentielle Sensorkinase aus *Nostoc sp.* lag ab der 43. Aminosäure signifikante Ähnlichkeit vor. Der höchste Grad der Homologie bestand zu Histidinkinase AsgD aus *Myxococcus xanthus* (CHO und ZUSMAN, 1999) und einem potentiellen Bacteriophytochrom aus *P. aeruginosa* (Abb. 56). Die gefundenen Homologien stützten die Annahme, daß es sich bei ORF 2 um ein Strukturgen mit regulatorischer Funktion handeln könnte. Homologe Bereiche der Targetproteine schienen nicht strikt auf N- oder C-Terminus beschränkt.

### 3.9. Heterologe Expression der rekombinanten nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 in *B. subtilis* WB800 und Charakterisierung der Klone

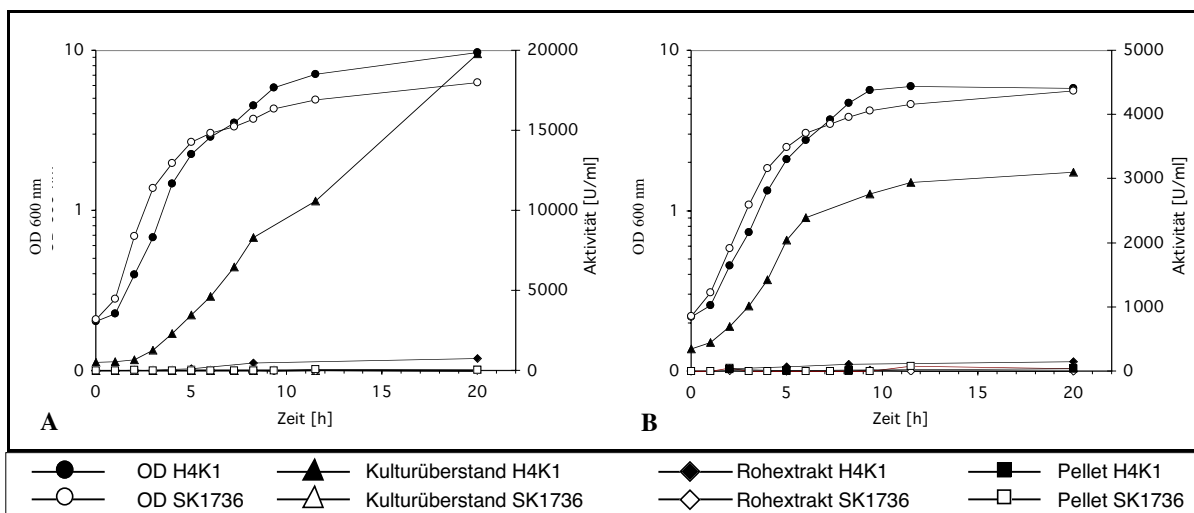
Bereits während des parallel zum beschriebenen Sondennachweis durchgeführten Aktivitätsscreenings nach positiven rekombinanten Klonen der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *P. lemoignei* und der Isolierung einzelner potentieller *B. subtilis* Klone auf TBAB-Kanamycin-Agar fiel die vom Rezipientenstamm abweichende Koloniemorphologie auf. In Abbildung 57 sind ein nur den Vektor pWB980 tragender und der Klon H4K1 (pWB980::*phaZ7*) nach 48 h Wachstum auf TBAB-Agar bei 30°C gegenübergestellt. Einzeln liegende Kolonien der Klone, welche die Depolymerase exprimierten, erschienen mit 2 mm Durchmesser im Durchschnitt drei bis vier mal kleiner als die Kontrolle (5-7 mm). Neben dem auffälligen Größenunterschied waren die Kolonien der PhaZ7-positiven Klone bei Betrachtung unter dem Binokular im Vergleich zur PhaZ7-negativen Kontrolle von kompakterer Beschaffenheit. Der Kolonierand war weitaus schärfer definiert, und die Kolonien wirkten zu diesem Zeitpunkt des Wachstums auch deutlich halbkugelförmig, wohingegen die Kontrollkolonien von Stämmen ohne *phaZ7*-Insert eher gespreitert erschienen.



**Abb. 57:** Koloniemorphologie von *B. subtilis* WB800 (pWB980) (A) und Klon H4K1 (pWB980::*phaZ7*) (B) nach 48 h Inkubation auf TBAB-Platten bei 30°C.

Zur genaueren Analyse von Wachstum und nPHA-Depolymeraseaktivität wurden Wachstumsversuche mit *B. subtilis* WB800 mit den Plasmiden pWB980::*phaZ7* (H4K1) bzw. pWB980 (SK 1736, Kontrolle) in definiertem Castenholz-Mineralmedium und komplexem Super-Rich-Medium (2.2.1.) durchgeführt. Je 100 ml Medium wurden mit der 8 h bei 30°C inkubierten LB-Kanamycin-Vorkultur auf eine OD<sub>600 nm</sub> 0,2 eingestellt und bei 37°C unter kräftiger Durchmischung (175 Upm) kultiviert. Nach einer etwa 60-minütigen lag-Phase, die für den Klon H4K1pWB980::*phaZ7* medienunabhängig stärker ausgeprägt erschien, wuchsen alle Kulturen etwa 3,5 Stunden mit maximaler exponentieller Rate. Die Generationszeiten in Castenholz-Mineralmedium lagen für beide Stämme höher als die mit Super-Rich-Medium ermittelten Werte (Abb. 58). Der Klon H4K1 wuchs in Castenholz-MM ( $t_d = 76$  min) etwas langsamer als die Kontrolle ( $t_d = 66$  min). In Super-Rich-Medium trat dieser Effekt

ebenfalls auf (H4K1  $t_d = 64$  min, Kontrolle  $t_d = 46$  min). Während der Übergang in die stationäre Wachstumsphase für die Kontrollkulturen beider Medien nach 300 min ( $OD_{600\text{ nm}} = 3$ ) klar erkennbar war, wuchs der Klon H4K1 mit sich nur allmählich verringernder Rate weiter. Mit dem Erreichen einer OD von 5,7 nach 9 Stunden wurde auch in Castenholz-MM keine weitere Trübungszunahme beobachtet. Die Trübung der H4K1-Zellsuspension in Super-Rich-Medium hingegen verdoppelte sich im Laufe von weiteren 10 Stunden auf 9,7. Die beobachteten Unterschiede im exponentiellen Wachstum und eine im Falle von Super-Rich-Medium sogar höher liegende optische Dichte schienen dem in Abb. 57 gezeigten Wachstumsverhalten des Klones H4K1 auf TBAB-Agar zu widersprechen. Beginnend in der exponentiellen Wachstumsphase wurde ein weiteres Phänomen beobachtet. War das Abzentrifugieren von *B. subtilis* WB800 (pWB980 ohne *phaZ7*-Strukturgenen) während des gesamten Versuches bei 6000 Upm für 2 min in der Eppendorfzentrifuge problemlos möglich, so pelletierten die Zellen des *PhaZ7*-Klones selbst bei 14000 Upm nur schlecht. Die erhaltenen Pellets waren wenig kompakt und ließen sich leicht resuspendieren. Der Effekt verminderte sich gegen Ende des Wachstums und war auf Castenholz-Medium generell geringer ausgeprägt. Die Bildung der nPHB Depolymerase *PhaZ7* durch H4K1 war bereits nach 4 Stunden anhand von im Wachstumsverlauf bis auf  $19 \cdot 10^4$  U/ml (Super-Rich-Medium, Abb. 58 A) bzw.  $3 \cdot 10^3$  U/ml (Castenholz-Medium, Abb. 58 B) ansteigenden Volumenaktivitäten der Kulturüberstände zu erkennen. Während sich in Castenholz-Mineralmedium die Zunahme der Aktivität nach 7 h bereits sichtlich verringerte, setzte sich der Aktivitätsanstieg auf Super-Rich-Medium nahezu unverändert fort.

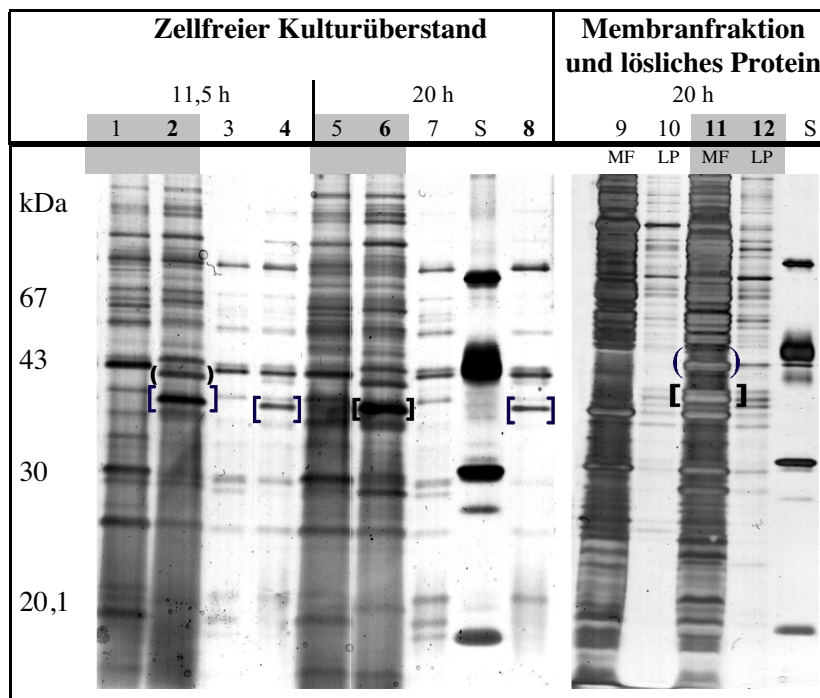


**Abb. 58:** Wachstum von *B. subtilis* WB800 mit den Plasmiden pWB980::*phaZ7* (H4K1) bzw. pWB980 (SK1736, Kontrolle) und nPHB-Depolymeraseaktivität auf Super-Rich (A) – und Castenholz (B) – Medium. Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Für die Gewinnung des löslichen Proteins wurden je 2 ml Probe abzentrifugiert, in 0,5 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 9,0; 15 % (w/v) Saccharose; 0,5 mg/ml Lysozym) resuspendiert und nach 15 min bei RT unter Kühlung durch Ultraschall (1 min) aufgeschlossen. Partikuläre Fraktion und lösliches Protein wurden bei 14000 Upm in der Eppendorfzentrifuge getrennt. Das Pellet wurde in 0,5 ml 50 mM Tris/HCl (pH 9,0) resuspendiert. Die Bestimmung der Depolymeraseaktivität erfolgte im turbidimetrischen Test (s. 2.10.1.2.). Erhaltene Aktivitätswerte wurden auf das im Test verwendete Kulturüberstandsvolumen normalisiert, um eine direkte Vergleichbarkeit zu ermöglichen.

Die für die lösliche Proteinfraction ermittelten Werte lagen um 23 bis 30 mal niedriger. In den Membranfraktionen fand sich keine signifikante Aktivität.

Die spezifischen Aktivitäten der Kulturüberstände auf Castenholz-MM erreichten nach 10 Stunden ein Maximum von  $14 \cdot 10^4$  U/mg. Für Super-Rich-Medium lag dieser Wert bei  $30 \cdot 10^4$  U/mg. Die tatsächlichen spezifischen Aktivitäten sollten insbesondere für Super-Rich-Medium niedriger ausfallen, da die Proteinkonzentrationen gegen frisches Medium als Leerwert bestimmt wurden.

In SDS-Polyacrylamidgelen trat in den Kulturüberständen insbesondere für die auf Super-Rich-Medium gewachsenen Kulturen von H4K1 neben der nach 20 h dominierenden Bande der reifen PhaZ7 bei 36,5 kDa eine weitere Bande bei 40 kDa auf, welche in den Kontrollen fehlte (Abb. 59). Es könnte sich dabei um nicht prozessiertes Vorläuferprotein von PhaZ7 mit Signalsequenz handeln. Das nahezu vollständige Fehlen der 36 kDa Proteinbande in löslichem Protein und Membranfraktion in Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase sowie mikroskopische Evidenz für das Fehlen von Inklusionbodies wiesen auf eine effektive Sekretion des Enzyms während des Wachstums hin. Mit fortschreitender stationärer Phase waren beide Proteinbanden auch in der löslichen und in geringer Menge in der Membranfraktion nachweisbar. Die Proteinmuster zeigten eine Reihe weiterer signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrolle und Klon H4K1 bei Wachstum auf identischem Medium - offenbar ein Indiz für gravierende, die Expression von PhaZ7 begleitende stoffwechselphysiologische Veränderungen.

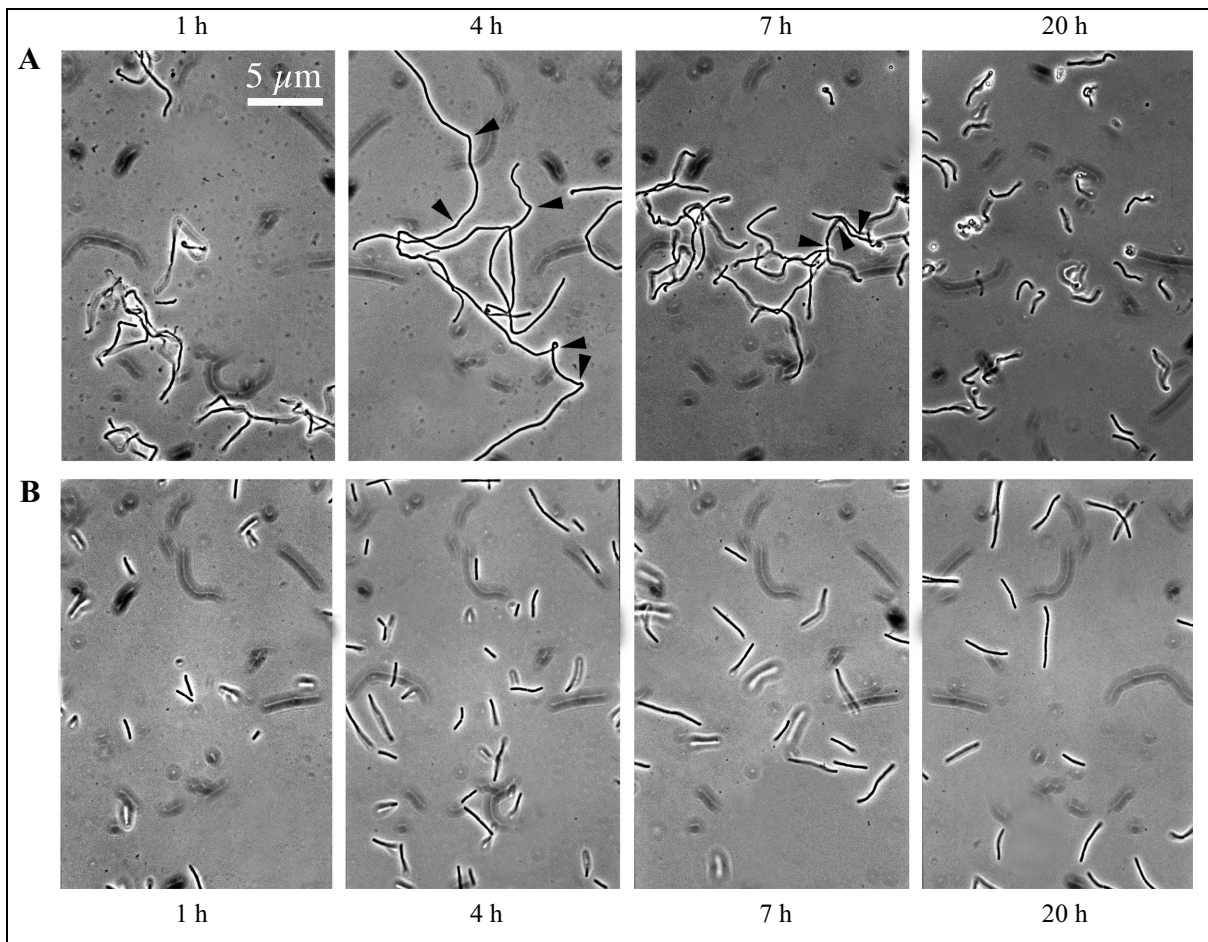


**Abb. 59:** Expressionsmuster von *B. subtilis* WB800 (pWB980) [Spuren: 1, 3, 5, 7, 9, 10] sowie *B. subtilis* H4K1 (pWB980::phaZ7) [Spuren: 2, 4, 6, 8, 11, 12]. Auf ein 12 % SDS-Gel wurden 4  $\mu$ l der Kulturüberstände, sowie lösliches Protein (LP) und Membranfraktionen (MF) von auf Super-Rich-Medium (grau hinterlegte Spuren) oder Castenholz-MM aufgetragen. PhaZ7 und das potentielle Vorläuferprotein wurden durch Klammersymbole [ ] bzw. ( ) markiert. S: LMW-Proteinstandard.

Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Wachstumsphänomene erbrachte die mikroskopische Untersuchung der Zellen. Der Kontrollstamm *B. subtilis* WB800 (pWB980) wies unabhängig vom Medium und der Wachstumsphase eine überwiegend gerade, für die Gattung *Bacillus* typische Stäbchenform auf, deren Länge zwischen 2 und 4  $\mu\text{m}$  variierte. Klon H4K1 jedoch zeigte ein vom Inkubationszeitpunkt abhängiges pleiomorphes Bild. Im Verlaufe des Wachstums entstanden lange Zellketten (60  $\mu\text{m}$ ) aus 4 bis 16 offenbar unvollständig geteilten Zellen ungewöhnlicher Form, die während der exponentiellen Wachstumsphase (4 h) charakteristisch langgestreckt erschienen. Innerhalb der Zellverbände traten unvollständig geteilte Zellen von 5 bis 20  $\mu\text{m}$  Länge auf, deren Durchmesser sich jedoch nicht von Kontrollzellen unterschied. Insbesondere an den Zellpolen einzelner Zelleinheiten waren Verwindungen, Krümmungen und Loops charakteristisch, deren Intensität und Häufigkeit sich beim Übergang in die stationäre Phase (7 h) erhöhte, begleitet von einer zunehmenden Verkleinerung der Zellketten. 10 Stunden nach Eintritt in die stationäre Phase traten in ihrer Länge der Kontrolle vergleichbare Einzelzellen und Zellketten von nur noch 2 bis 4 Zellen auf, welche sich jedoch durch starke Verkrümmungen deutlich von den Kontrollen unterschieden. Die beobachteten morphologischen Veränderungen konnten in geringerer Ausprägung auch in Castenholz-MM beobachtet werden.

Um festzustellen, ob das von H4K1 ins Medium sekretierte rekombinante Enzym für die morphologischen Veränderungen verantwortlich war, wurde ein weiterer Wachstumsversuch mit *Bacillus subtilis* WB800 auf Super-Rich-Medium im Mikrotiterplattenmaßstab (200  $\mu\text{l}$ ) durchgeführt. Einige Kulturen enthielten von Beginn an gereinigte PhaZ7 aus *P. lemoignei* in Konzentrationen zwischen 0,05 bis 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Protein, anderen Kulturen wurde bei Erreichen einer  $\text{OD}_{600\text{ nm}}$  von 0,25 beziehungsweise 0,5 analog Enzym zugesetzt. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Zugabe in einem Parallelansatz wiederholt. Die Beobachtung im Phasenkontrastmikroskop ließen keine Unterschiede zu den mitgeführten Kontrollen erkennen. Offenbar hatte die Gegenwart von PhaZ7 im Kulturmedium keinen Einfluß auf die Zellmorphologie. Die Ursachen der morphologischen Anomalie bei heterologer Expression von PhaZ7 könnten in stoffwechselphysiologischen Veränderungen oder Wirkungen des Enzymes auf die Zellstruktur vor und/oder während der Sekretion über die Cytoplasmamembran begründet sein. Zu Untersuchung möglicher hydrolytischer Aktivitäten von PhaZ7 mit Membranbestandteilen aus *B. subtilis* wurden Titrationsexperimente durchgeführt. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Hydrolyse von polaren oder apolaren Lipidfraktionen durch die nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase (s. 3.7.6.; Tab. 14).





**Abb. 60:** Vergleich der Zellmorphologie von *B. subtilis* WB800 H4K1(pWB980::phaZ7) (A) bzw. der Kontrolle *B. subtilis* WB800 (pWB980; SK1736) (B) auf Super-Rich-Medium in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im lichtmikroskopischen Bild. (Primärvergrößerung: 1000x). Die Enden der bei Fokussierung erkannte Einzelzellen im Zellverband wurden exemplarisch durch schwarze Pfeilspitzen markiert. Die Proben entstammten dem in Abb. 58 A dargestellten Experiment.

### 3.10. Reinigung und Charakterisierung der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum*

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren eine Reihe extrazellulärer PHA-Depolymerasen bekannt, welche sich durch eine hohe Spezifität für parakristalline dPHA auszeichneten (JENDROSSEK; 1998). MERRICK und DOUDOROFF (1961; 1964) beschrieben in ihren wegweisenden Untersuchungen zum PHA-Stoffwechsel erstmals ein potentielles intrazelluläres nPHA<sub>SCL</sub> abbauendes System aus phototrophen schwefelfreien Purpurbakterien. Die Autoren postulierten eine Interaktion dreier Komponenten bei der Mobilisierung intrazellulär akkumulierter PHA: (I) eine PHB-Depolymerase, (II) einen sogenannten Aktivator und (III) eine 3-HB-Dimer/Oligomerhydrolase. Es gelang jedoch zum damaligen Zeitpunkt nicht, die vermeintliche Depolymerase und den Aktivator zu identifizieren und zu isolieren. Aufbauend aus den mit nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *R. eutropha* H16 (HANDRICK et al., 2000) und *P. lemoignei* gewonnenen Kenntnissen wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit ein weiterer Schwerpunkt auf die Identifizierung und Charakterisierung der nPHA-Depolymerase aus *Rhodospirillum rubrum* gelegt.

#### 3.10.1. Auswahl der Kultivierungsbedingungen

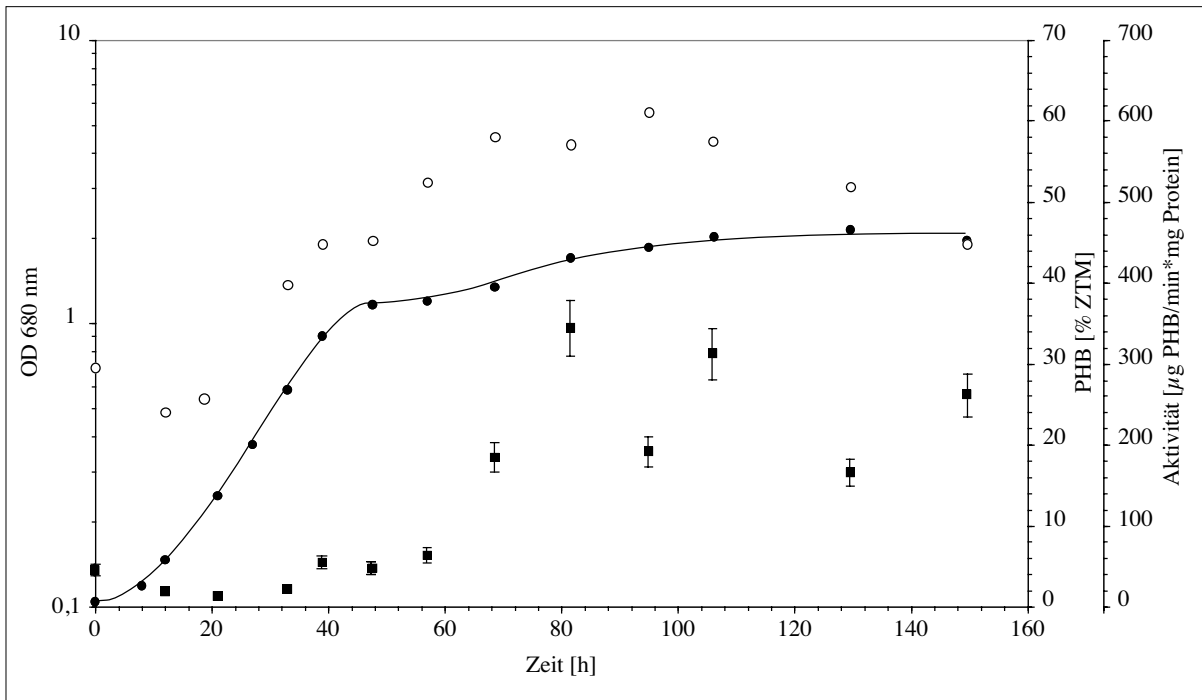
Vor Beginn der Experimente zur präparativen Aufreinigung wurde die Anzucht von *R. rubrum* Stämmen mit verschiedene Medien und Kultivierungsbedingungen getestet. Generell zeigte *R. rubrum* S1 unter aeroben Bedingungen auf komplexen Medien (LB; PYI) gutes Wachstum. Mit PYI (2.2.2.) wurden sowohl bei aerober als auch bei photoheterotropher Kultivierung optische Dichten (680 nm) von 8 bis 10 innerhalb von 30 h Inkubation erreicht ( $t_d$  4,2 h bis 5,9). In allen Fällen konnten jedoch nur sehr geringe nPHB-Depolymeraseaktivitäten im Zellextrakt beobachtet werden. Auch photoheterotrophe Anzuchten unter anaeroben Bedingungen für den Zeitraum der exponentiellen und frühen stationären Wachstumsphase mit anschließender aerober Inkubation in Dunkelheit während des spätstationären Wachstums führten nicht zur Steigerung der spezifischen nPHB-Depolymeraseaktivität. Die Anzucht von Hochdichtekulturen erschien für die Lösung der Problemstellung folglich als ungeeignet. Das auf maximale Zelldichte optimierte PYI-Komplexmedium wurde jedoch im weiteren Arbeitsverlauf zur raschen Anzucht von Vorkulturen und Zellen zur DNA-Isolierung eingesetzt.

Bei photoheterotropher Inkubation der Zellen in mineralischen Medien mit Na-Acetat oder -Succinat (0,16 bis 0,32 %) (2.2.1.) wurden Verdopplungszeiten von nur 8,5 bzw. 7,8 h erreicht. In allen Fällen konnte eine Alkalisierung des Mediums im Zuge des Substratverbrauches beobachtet werden. Die erzielten Zelldichten ( $OD_{680\text{ nm}}$ ) lagen jedoch bei maximal 1,9. Der PHB-Gehalt mit Na-Acetat in Abwesenheit von  $NH_4Cl$  erreichte 45 bis 62 % der Zelltrockenmasse und sank im Verlauf einer weiteren Inkubation auf unter 45 %. Die Bildung von PHB ging mit einem nachweisbaren Anstieg der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymeraseaktivität einher (3.10.2., Abb. 61). Die Aktivität auf Succinat lag jedoch um bis zu 35 % niedriger weshalb für die Kultivierungen zur Gewinnung der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus

*R. rubrum* S1 im weitem Verlauf die photoheterotrophe Anzucht in Mineralmedium mit 0,16 % (w/v) Acetat präferiert wurde.

### 3.10.2. Präparative Reinigung der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase (PhaZRr) aus *R. rubrum*

Für die präparative Enzymreinigung wurden 5 x 20 Liter Mineralmedium, pH 6,8 (2.2.1.), mit sukzessive in 5 x 10 ml PYI-Komplexmedium (36 h; Start mit 200 µl Glycerol-Stammkultur) und 26 Stunden in 5 x 1 Liter MM, 0,16 % (w/v) Natriumacetat, unter anaeroben Bedingungen photoheterotroph angezogenen Zellen bei einer Start OD<sub>680 nm</sub> von 0,1 beimpft. Als Kohlenstoffquelle der Hauptkultur dienten ebenfalls 0,16 % (w/v) Natriumacetat. Im 20 L-Glasfermenter zeigte *R. rubrum* eine strikte Temperaturabhängigkeit. Bereits eine Erwärmung durch Beleuchtung mit 3 x 1000 Lux/Kolben mittels 60 Watt-Glühlampen führte mit zunehmender Inkubationsdauer trotz kontinuierlicher Durchmischung der Kultur zum Auftreten von Zellaggregaten. Aus diesem Grunde wurden die Ansätze über ein Innenkühlsystem auf 29°C temperiert. Zum Ausschluß von Sauerstoff wurden unter Stickstoff inkubiert (s. 2.4.4.). Die Einhaltung mikroaerober Bedingungen konnte anhand einer unter diesen Bedingungen charakteristischen purpurfarbenen Pigmentierung der Zellen verfolgt werden. Optische Dichte und nPHB-Depolymeraseaktivität wurden exemplarisch anhand eines zusätzlichen Fermentationskolbens verfolgt (Abb. 61). Nach etwa 40 h exponentiellen Wachstums gingen die Zellen in die stationäre Wachstumsphase über. Der mittels Gaschromatographie (2.11.6.) bestimmte PHB-Gehalt erreichte nach anfänglicher Verringerung infolge des Wachstums im Verlaufe der stationären Phase nach weiteren 40 h ein Plateau bei 61 % PHB-Anteil an der Zellrockenmasse. Die im löslichen Rohextrakt nach Ultraschallaufschluß und Abtrennung der partikulären Bestandteile bestimmte spezifische nPHB-Depolymeraseaktivität blieb während des exponentiellen Wachstums nahezu unverändert. Ein signifikanter Anstieg trat erst mit Beginn der stationären Phase ein. Die Aktivität erreichte nach etwa 80 h mit 360 U/mg ein Maximum. Die Werte wiesen Schwankungen außerhalb des Meßfehlers von 10 % auf, was auf eine nicht kontinuierliche Aktivitätszunahme und damit auf ein möglicherweise auch in *R. rubrum* ständig neu eingestelltes Gleichgewicht von eventuell zeitgleich stattfindender PHA-Synthese und Depolymerisation schließen ließ. Während die Depolymeraseaktivität im Vergleich zur exponentiellen Wachstumsphase deutlich erhöht blieb, sank bei längerer Inkubation der PHB-Gehalt beginnend nach 105 h innerhalb weiterer 40 h um 26 %. Zur Gewinnung von nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase wurden die Kulturen bereits nach 77 h für eine Stunde belüftet und bei 4°C abzentrifugiert. Die erreichte OD<sub>680 nm</sub> in den Glasfermentationsbehältern zum Erntezeitpunkt lag bei 1,9 bis 2,3. Der pH-Wert des Kulturüberstandes war auf 7,7 bis 7,9 gestiegen.



**Abb. 61:** Wachstum und Bildung von nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase durch *R. rubrum* in 20 Liter Batchkultur mit Natriumacetat (0,16 % w/v) bei 30°C. Dargestellt sind die optische Dichte bei 680 nm (●), der mittels Gaschromatographie nach saurer Methanolyse bestimmte PHB-Anteil (○) an der Zelltrockenmasse (ZTM) sowie die spezifische nPHB-Depolymeraseaktivität (■) aus löslichen Rohextraktfraktionen nach Abtrennung partikulärer Bestandteile durch Ultrazentrifugation (45 min; 75000 x g, 4°C; Trübungstest s. 2.10.1.3.; Trypsin/Ovomucoid-Vorbehandlung der nPHB-Granula).

Aus 100 Litern Kultur wurden 126 g Zellen (Feuchtmasse) (in einem Endvolumen von 560 ml 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,0) für die nachfolgende Proteinreinigung durch Lysozymbehandlung, einmaliges Schockfrieren und Auftauen mit anschließender Ultraschallbehandlung nach 2.5.3. aufgeschlossen. Mit Hilfe eines ersten Ammoniumsulfatfällungsschrittes der im Vorversuch ermittelten optimalen Salzsättigungskonzentration von 50 % wurden Depolymerase-haltige Fraktionen bereits zum überwiegenden Teil von der Aktivatorkomponente abgetrennt. Das Depolymerase-haltige purpur gefärbte Pellet wurde in 240 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) resuspendiert und durch erneute Sättigung auf 15 % Ammoniumsulfat konnten weitere Fremdproteine abgetrennt werden. Der PHA-Depolymerase-haltige Überstand (255 ml) wurde durch Diafiltration an einer YM10-Cross flow-Membran gegen 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) diafiltriert und auf 155 ml konzentriert. (In vorangegangenen Reinigungsexperimenten wurde die Konzentrierung durch einen weiteren Fällungsschritt mit 65 % Sulfatsättigung erzielt, jedoch kam es hierbei und in der anschließenden Dialyse stets zu Aktivitätsverlusten).

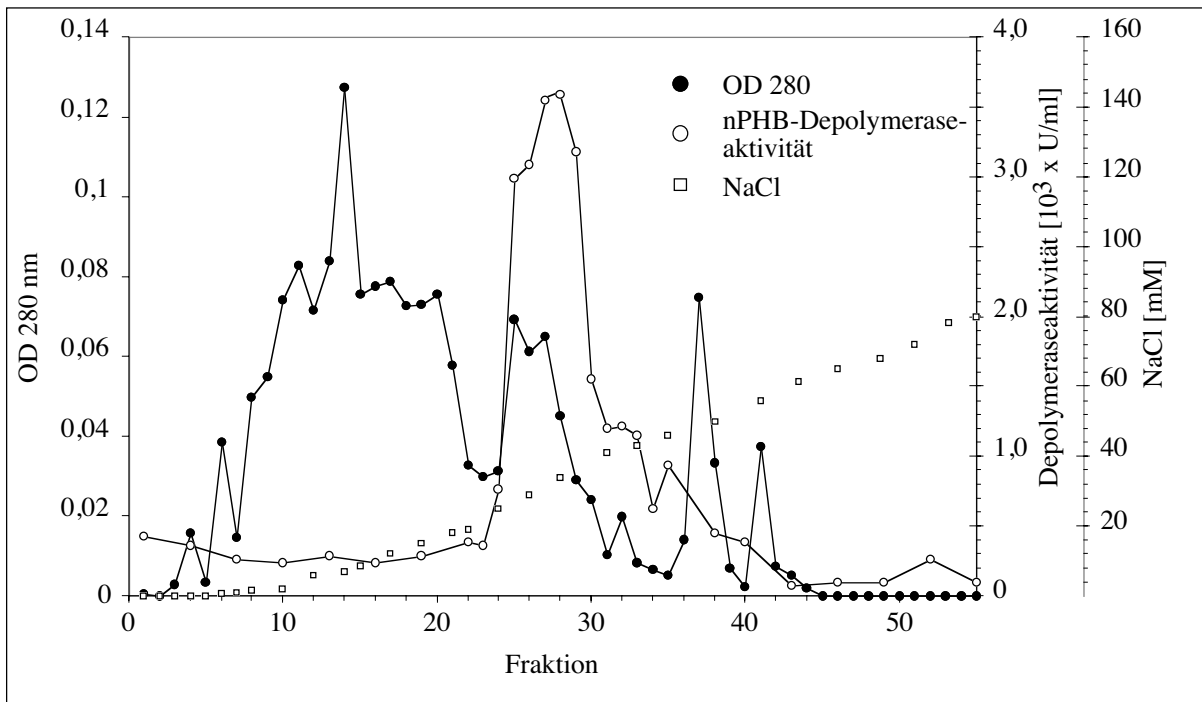
### 3.10.2.1. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel

Die Anionenaustauschchromatographie hatte sich bereits in vorangegangenen Untersuchungen zur indirekten Reinigung basischer Proteine als geeignete Methode erwiesen und wurde an die Erfordernisse des beschriebenen Reinigungsproblems adaptiert. Ausgehend von 155 ml gegen 20 mM Kaliumphosphat (pH 7,0) diafiltrierter Probe aus 3.10.2. wurde eine mit Auftragspuffer äquilibrierte DEAE-Sephacel-Säule (300 ml BV) bei einem Fluß von 1 ml/min mit Protein geladen. Die nPHB-Depolymeraseaktivität eluierte bereits im Waschschrift mit Auftragspuffer. Ein erheblicher Teil Fremdprotein konnte auf diese Weise entfernt werden. Mit Erreichen der UV-Absorptionsbasislinie war die Elution der Depolymerase abgeschlossen.

Im Verlaufe der Arbeit wurde versucht, durch den Einsatz der stärkeren Ionentauscher Q-Sepharose und Mono-Q die indirekte Reinigung weiter zu optimieren, jedoch kam es bei den getesteten pH-Werten von 6,5 bis 8,0 gemeinsam mit der PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase zur Elution von carotinoidhaltigen Pigmenten, welche die späteren Bestimmungen der Proteingehalte und insbesondere die Qualität der PHB-Depolymerasetests mittels Trübungsmessung beeinträchtigten. Der Reinigungseffekt erschien zudem nicht signifikant effektiver als mit dem schwachen Ionentauscher DEAE.

### 3.10.2.2. Ionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose CL-6B

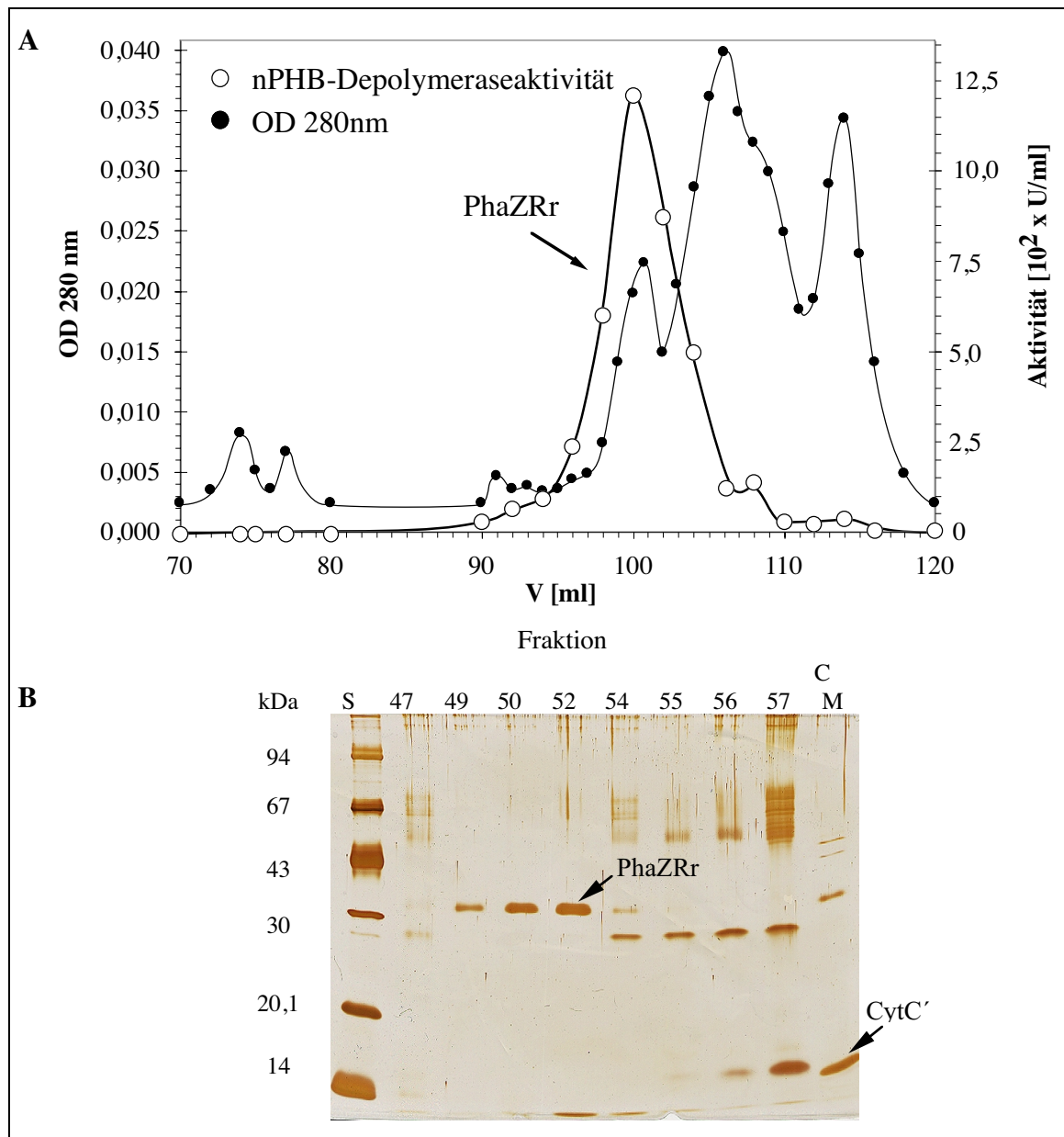
Die Kationenaustauschchromatographie diente wie im Falle von PhaZ7 einer direkten Reinigung der nPHB-Depolymeraseaktivität und ermöglichte zugleich eine Konzentrierung der im bisherigen Reinigungsverlauf stark verdünnten Probe. Ausgehend von 236 ml gegen 10 mM Malonsäure-NaOH-Puffer (pH 6,0) diafiltrierter Probe wurde eine mit Auftragspuffer äquilibrierte CM-Sepharose CL-6B Säule (50 ml BV) bei einem Fluß von 0,75 ml/min mit Protein geladen. Durch das anschließende Waschen mit 100 ml Auftragspuffer wurde ungebundenes Protein entfernt. Mit Erreichen der UV-Absorptionsbasislinie wurde die Elution der Depolymerasen mit Hilfe eines Gradienten von 0 bis 200 mM NaCl (400 ml) bei 0,75 ml/min gestartet. Die erhaltenen Chromatogramme wiesen in allen Fällen ein charakteristische Abfolge von Proteinpeaks bei 280 nm auf (Abb. 62). Die nPHB-Depolymeraseaktivität eluierte zwischen 25 und 45 mM NaCl. Um die Lagerzeiten des Enzyms in Malonsäurepuffer bei niedrigem pH-Wert gering zu halten, wurden in den verwendeten Probensammelröhrchen 250 µl Tris-HCl-Puffer (250 mM, pH 8,5) vorgelegt. Die Fraktionen mit Aktivität wurden in der SDS-PAGE auf Reinheit geprüft und Fraktionen mit hohem nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymeraseanteil (Fr. 28/29) vereinigt.



**Abb. 62:** Säulenchromatographische Reinigung der nPHB-Depolymerase PhaZRr durch Ionenaustauschchromatographie an CM-Sepharose CL-6B (BV 50 ml; Laufpuffer 10 mM Malonsäure/NaOH, pH 6,0, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; Fraktionsgröße 6 ml; Flußrate 0,75 ml/min). Die nPHB-Depolymeraseaktivitäten wurden durch Trübungstest nach 2.10.1.2. bestimmt.

### 3.10.2.3. Präparative Geliltration an Superdex 200

Aufgrund noch vorhandener Verunreinigungen war in einigen Versuchen ein weiterer Reinigungsschritt erforderlich. Nachdem eine Überprüfung der Trenneigenschaften hydrophober Säulenmaterialien (Butyl-Sepharose; Octyl-Sepharose) keine zufriedenstellenden Ergebnisse erbrachte, wurden die Fraktionen nach CM-Sepharose gepoolt und vor einer weiteren Reinigung mittels YM10-Membranen auf 6 ml eingengt. Der Einsatz von Superdex 200 (Bettvolumen 60 ml, Säulenvolumen 120 ml, Ausschlußvolumen mit Blue Dextran 47,19 ml) führte bei Verwendung von 1,3-Diaminopropanpuffer (25 mM, pH 10,0) als Laufpuffer zur Elution der Aktivität in der hochmolekularen Fraktion (Abb. 63). Während die Gelfiltration zur Molekulargewichtsbestimmung nur bedingt geeignet erschien (s. 3.11.1.2.), ermöglichte diese Methode im Zuge der präparativen Reinigung von PhaZRr eine Abtrennung niedrigmolekularer Proteine (< 30 kDa, z.B. Cytochrom C'), welche durch Ionenaustausch-Chromatographie an CM-Sepharose CL6B nicht in allen Fällen quantitativ separiert werden konnten. Der Reinigungserfolg war jedoch strikt von der Qualität der Voranreicherung an CM-Sepharose abhängig und führte wiederum zur Verdünnung der Probe.



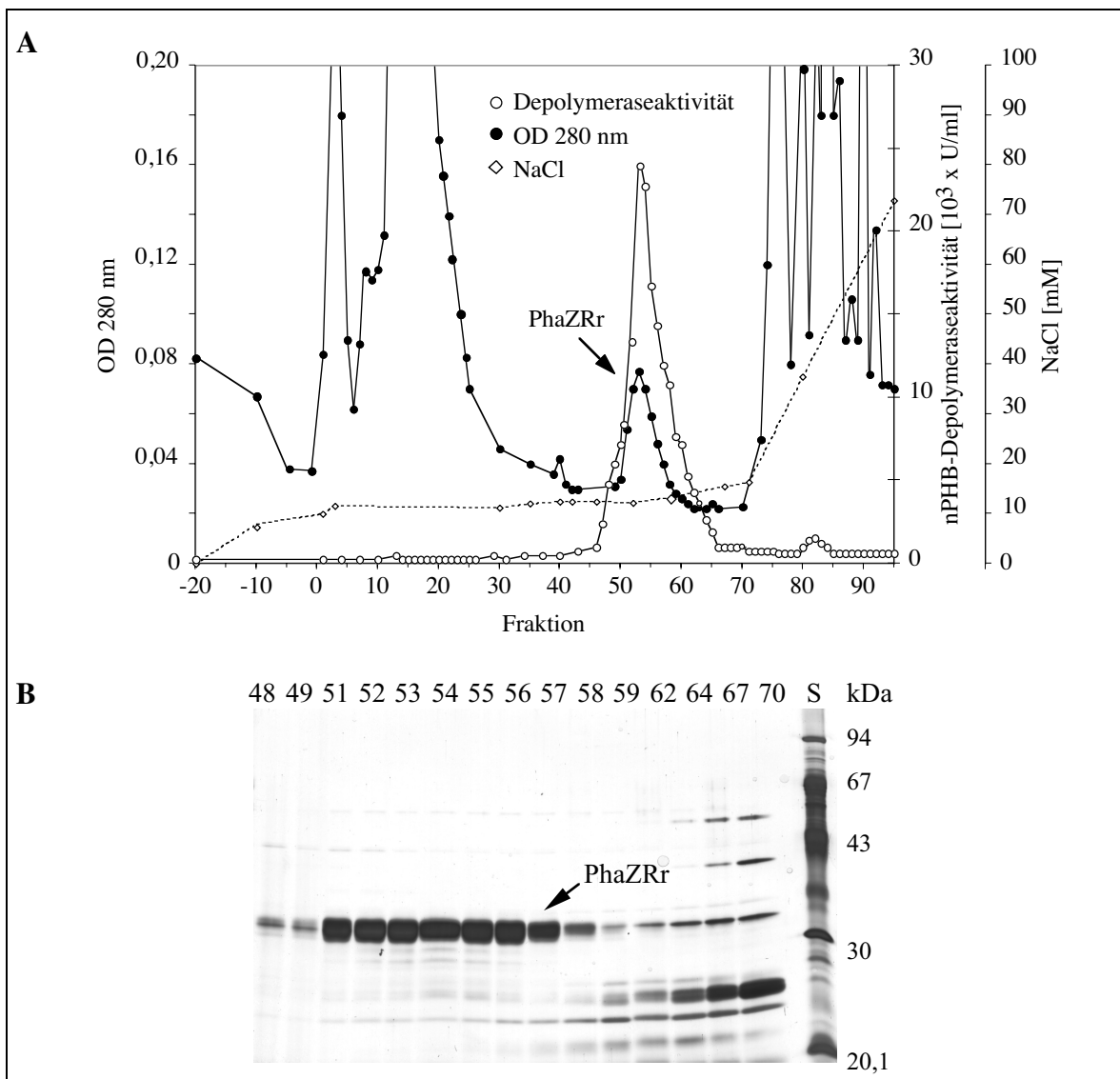
**Abb. 63:** Gelfiltrationschromatographie der nPHA-Depolymerase aus *R. rubrum*.

(A) Reinigung und Größenbestimmung an Superdex™ 200 (60ml Bettvolumen, Durchmesser 16 mm). Bei einer Flußrate von 0,4 ml/min wurde ein auf 2 ml konzentrierter Pool der durch Fällung nach 3.10.2., DEAE-Sephacel und CM-CL6B Sepharose Ionenaustauschchromatographie angereicherten Depolymerase aufgetragen und mit 25 mM 1,3-Diaminopropan-HCl (pH 10); 500 mM NaCl eluiert. Fraktion 1 entspricht 50 ml Zeitvolumen. Je 75  $\mu$ l der Fraktionierung (Fraktionsgröße 1 ml) wurden Trübungstest mit nPHB im 2 ml Ansatz nach 2.10.1.3. auf Aktivität untersucht.

(B) SDS-PAGE mit je 20  $\mu$ l ausgewählter Fraktionen nach Silberfärbung (2.8.3.). S = LMW-Proteinstandard; CM = Probe vor Säulenauftrag, nach partieller Reinigung an CM-Sepharose.

### 3.10.2.4. Ionenaustauschchromatographie an Mono S

Alternativ zur Reinigung mittels CM-Sepharose und Gelfiltration wurde der stärkere Ionentauscher Mono S eingesetzt. Die hohe Bindekapazität der Säule für PhaZRr ( $> 400 \mu\text{g}$ ) und die durch ein geringeres Säulenvolumen mögliche Volumenreduktion ermöglichten eine effektive Reinigung bei vergleichbarer oder besserer Qualität in wesentlich kürzerer Zeit. Lag die Proteinkonzentration nach DEAE-Sephacel und CM-Sepharose CL6B über  $0,5 \text{ mg/ml}$ , waren jedoch sukzessive Säulenläufe an Mono S erforderlich. Als Puffer wurde  $25 \text{ mM}$  2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure MES (pH 5,9) eingesetzt. Nach Abtrennung von Proteinen geringerer Affinität durch einen initial aufsteigenden NaCl-Gradienten wurde die Depolymeraseaktivität bei  $12 \text{ mM}$  NaCl isokratisch eluiert (Abb. 64). Auf diese Art gewonnene PhaZRr lag zu über  $95 \%$  rein und in zehnfacher Konzentration verglichen mit Proben nach einer Gelpermetionschromatographie (3.10.2.3.) vor.

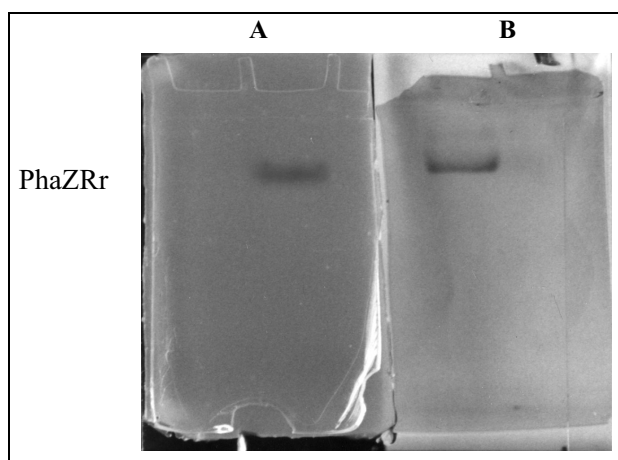


**Abb. 64:** Reinigung der nPHB-Depolymerase PhaZRr durch Ionenaustauschchromatographie an Mono S (BV 1 ml; Laufpuffer  $25 \text{ mM}$  MES-Puffer, pH 5,9,  $1 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ; Fraktionsgröße  $0,4 \text{ ml}$ ; Flußrate  $0,4 \text{ ml/min}$ ). Aufgetragen wurden  $5 \text{ ml}$  einer gegen  $25 \text{ mM}$  MES-Puffer äquilibrierten Probe nach DEAE-Sephacel. (A) Elugramm der Säule. Die nPHB-Depolymeraseaktivitäten wurden durch Trübungstest im Mikrotiterplattenphotometer bestimmt (2.10.1.3.). (B) SDS-PAGE und Silberfärbung der Fraktionen hoher Aktivität.



### 3.10.2.5. Nachweis von nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymeraseaktivität im nativen Gel

Um sicherzustellen, daß es sich bei der beobachteten 34 kDa Proteinbande tatsächlich um die gesuchte nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymeraseaktivität handelte, wurde ein „Umkehr“-Gradienten-Gelsystem zur Trennung der nativer Proteine mit anschließender Aktivitätsbestimmung entwickelt. Da die potentielle nPHA-Depolymerase in der Anionenaustauschchromatographie mittels DEAE-Sephacel (pH 7,0) keine Bindung zeigte, besaß das Protein offenbar einen isoelektrischen Punkt bei deutlich höherem pH. Die Trennung erfolgte im nativen kathodischen Gradientengel (4,5-20 % Acrylamid) bei pH 6,5. Ein kombinierter MES/Tris-Puffer (50 mM, pH 6,5) wurde als Gel- und Laufpuffer gewählt. Nach erfolgter Elektrophorese und dem Umpuffern des Geles auf pH 10,5 mittels 1,3-Diaminopropan ließ sich in der anschließenden Aktivitätsbestimmung nach etwa 120 min eine klar der dominierenden 34 kDa Proteinbande zuzuordnende Aktivität mit Trypsin-behandelten nPHB-Granula (s. 2.10.1.3.) in Form einer Aufklarungszone auf nPHB-Agaroseplatten (2.2.6.) nachweisen. Im Test gegen dPHB war das Enzym inaktiv. Die im Verhältnis zur eingesetzten Enzymmenge verglichen mit PhaZ7 aus *P. lemoignei* scheinbar geringe Aktivität wurde auf eine fortschreitende Inaktivierung von PhaZRr während der Elektrophorese zurückgeführt. Für die nPHA Depolymerase wurde unter den beschriebenen Versuchsbedingungen ein Rf-Wert von 0,14 bestimmt.



**Abb. 65:** Laufverhalten von PhaZRr in der kathodischen nativen Gradienten-PAGE (4–20 %).

Partiell gereinigte nPHB Depolymerase aus *R. rubrum* (6,5 µg Protein pro Spur) wurden im nativen Gradientengel (4-20 % Acrylamid) bei 4°C, 100 V, 1 W und pH 6,5 einer 3,5 stündigen Elektrophorese unterzogen. Je eine Hälfte des Geles wurde 5 min in frischem 1,3-Diaminopropanpuffer (50 mM, pH 10,5) umpuffert und auf einer Aktivitätsagaroseplatte mit durch Trypsin/Ovomucoidbehandlung aktivierten nPHB-Granula 120 min bei 30°C inkubiert (A) bzw. mit Silber gefärbt (B).

Bei dem 34 kDa Protein handelte es sich offenbar um die gesuchte nPHB spezifische Hydrolyseaktivität. Das Enzym wurde in Analogie zu der von STEINBÜCHEL et al. (1992) und JENDROSSEK et al. (1993b) vorgeschlagenen Nomenklatur für PHA-Depolymerase mit PhaZRr bezeichnet.

### 3.10.3. Ergebnis der Anreicherung nPHA-Depolymerase aus *R. rubrum*

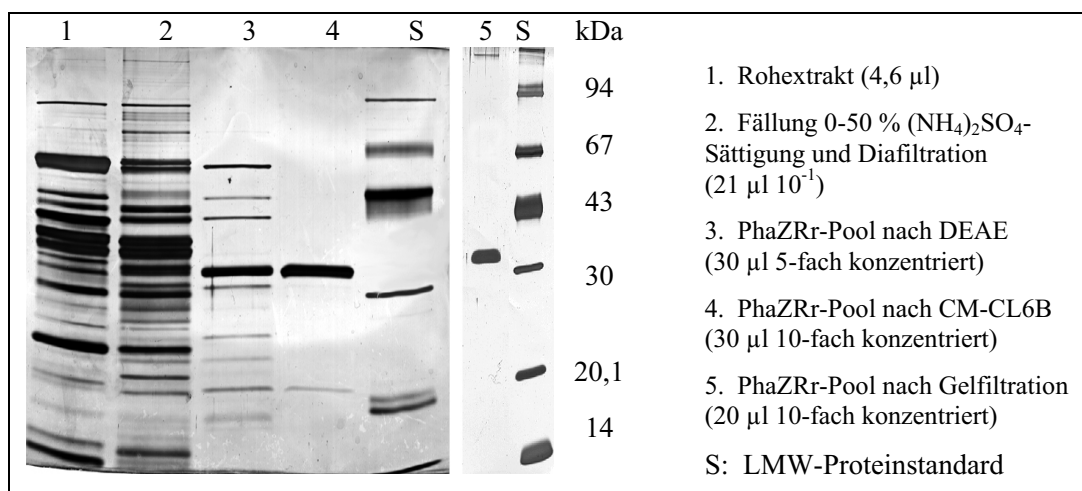
Die für nPHA Depolymerase PhaZRr erzielte Ausbeute lag mit 19 % scheinbar niedrig, jedoch wurde das Enzym insbesondere durch den Einsatz der Kationenaustauscherchromatographie zwischen 320 bis zu 430-fach angereichert. Der Verlauf der Gesamtaktivitäten ist in Tabelle 21 dargestellt. Der Erfolg der Reinigung konnte in der SDS-PAGE nachgewiesen werden (Abb. 66). Mit der nPHASCL-Hydrolyseaktivität korrelierte eine Proteinbande im Molekulargewichtsbereich zwischen 33 und 35 kDa.

**Tab. 21:** Reinigungsverlauf der nPHA-Depolymerase PhaZRr aus *R. rubrum*.

Arbeitsschritt/Fraktion	Protein- konzentration [mg/ml]	Protein [mg]	Aktivität [10 <sup>2</sup> *U]	Spezifische Aktivität* [10 <sup>2</sup> *U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung [x-fach]
lösliches Protein des Rohextraktes	0,92	520	1200	2,3	100	1
Überstand nach Ammonium- sulfatfällung und Diafiltration	2,8	434	824	1,9	68	0,82
DEAE-Sepharcel-Pool	0,14	24	552	23	46	10
CM-Sepharose CL-6B-Pool	0,03	0,38	280	750	23	326
Gelfiltration (Superdex200)	0,006	0,29	230	790	19	343
Mono S-Pool*	0,36	1,01	740	740	13	427

Die Bestimmungen nPHB-Depolymeraseaktivität erfolgten im Trübungstest nach 2.10.1.3. [1 U = 1 µg native PHB Granula/min].

\* Separate Reinigung aus 184 g Feuchtzellen unter Verzicht auf CM-Sepharose CL6B und Gelfiltrationsschritt. Es wurden 5 Säulenläufe gepoolt.



**Abb. 66:** 12 %-iges SDS-Polyacrylamidgel (Silberfärbung) zur Kontrolle der Reinigungsschritte der nPHASCL-Depolymerase PhaZRr aus *R. rubrum*.

### **3.11. Biochemische Charakterisierung der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZRr aus *R. rubrum***

#### **3.11.1. Bestimmung der Molekularmasse von PhaZRr**

##### **3.11.1.1. Molekularmasse unter reduzierenden Bedingungen**

PhaZRr wies nach Denaturierung mit Mercaptoethanol im 12 % SDS-Polyacrylamidgel ein apparentes Molekulargewicht von  $35 \pm 3$  kDa bei einem Rf-Wert von 0,53 auf. Die erhaltenen Werte zeigten eine stärkere Varianz in Abhängigkeit vom jeweiligen Reinigungs-Experiment, weshalb im folgenden weitere Experimente zur Bestimmung der Molekularmasse durchgeführt wurden.

##### **3.11.1.2. Bestimmung der Molekularmasse von PhaZRr durch Gelpermeationschromatographie**

Zur Ermittlung der Größe des nativen Proteins wurde eine Gelfiltration mit Superdex™ 75 PC 3.2/30 (Matrix: Dextran, 12 % quervernetzte Agarose) durchgeführt. Das Totvolumen der Säule lag bei 1,94 ml (Blue Dextran,  $2 \times 10^3$  kDa). Im Experiment unter Abb. 67 wurden 20 µl Probe (6,2 µg Protein) in 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) in Gegenwart von 500 mM NaCl auf die Säule aufgetragen, um mögliche Wechselwirkungen zwischen Protein und Säulenmatrix zu minimieren. Auftretende Peaks wurden gesammelt und im turbidimetrischen Test auf Aktivität getestet. Die Retention von PhaZRr lag mit einem Retentionskoeffizienten R ( $V_0/V_e$ ) von 0,66 (22 kDa) in einem Größenbereich unterhalb der für das Monomer nach SDS-PAGE (34 kDa) erwarteten Größe. Es kam trotz alkalischem pH und hoher Salzkonzentration offenbar zu Wechselwirkungen mit der als schwachem Kationentauscher wirkenden Säulenmatrix. Das Phänomen schien für PHA-Depolymerasen als überwiegend basische Proteine unabhängig vom Grad der Homologie auf Aminosäuresequenzebene charakteristisch und wurde unter 3.7.1.2. für PhaZ7 in deutlich stärkerer Ausprägung ebenfalls beobachtet.

Der Einsatz von Superdex 200 (Bettvolumen 60 ml, Säulenvolumen 120 ml, Ausschlußvolumen mit Blue Dextran 47,19 ml), welches bereits zur Reinigung des Enzyms eingesetzt worden war, führte bei Verwendung von 1,3-Diaminopropanpuffer (25 mM, pH 11,0) zur Retention mit einem  $k_{av}$  von 0,77, was einem Molekulargewicht von  $29 \pm 5$  kDa entsprach. Da ebenfalls eine verzögerte Retention beobachtet wurde, lag PhaZRr möglicherweise anders als die verwendeten Eichproteine unter den gewählten Bedingungen als Monomer in einer nicht globulären Form vor. Während die Gelfiltration zur Molekulargewichtsbestimmung nur bedingt geeignet erschien, ermöglichte die Methode im Zuge der präparativen Reinigung von PhaZRr eine Abtrennung niedrigmolekularer Proteine (< 30 kDa, z.B. Cytochrom C'), welche durch Ionenaustausch-Chromatographie an CM-Sepharose nicht in allen Fällen quantitativ separiert werden konnten.

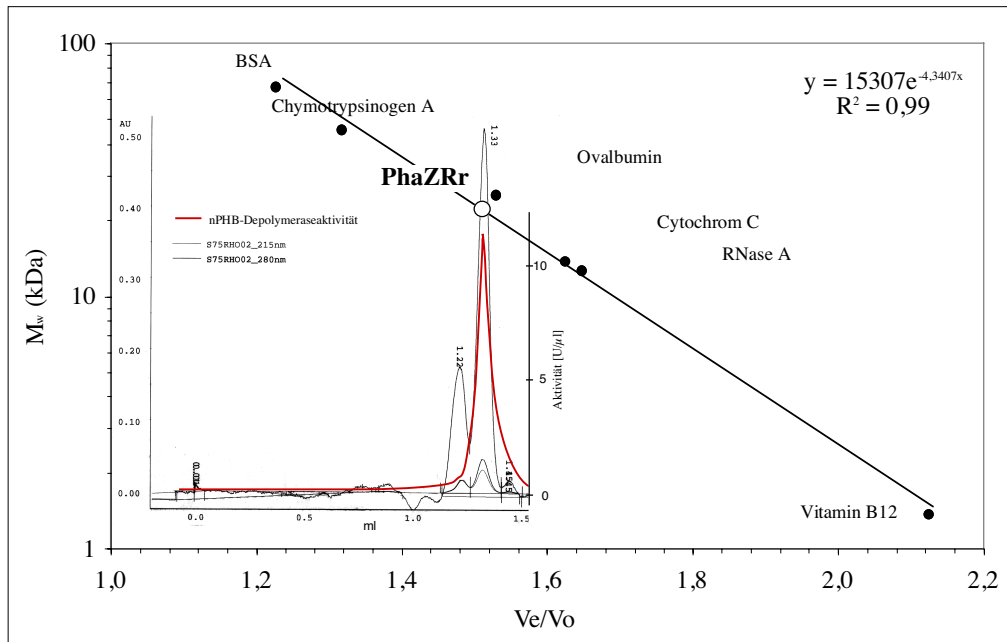
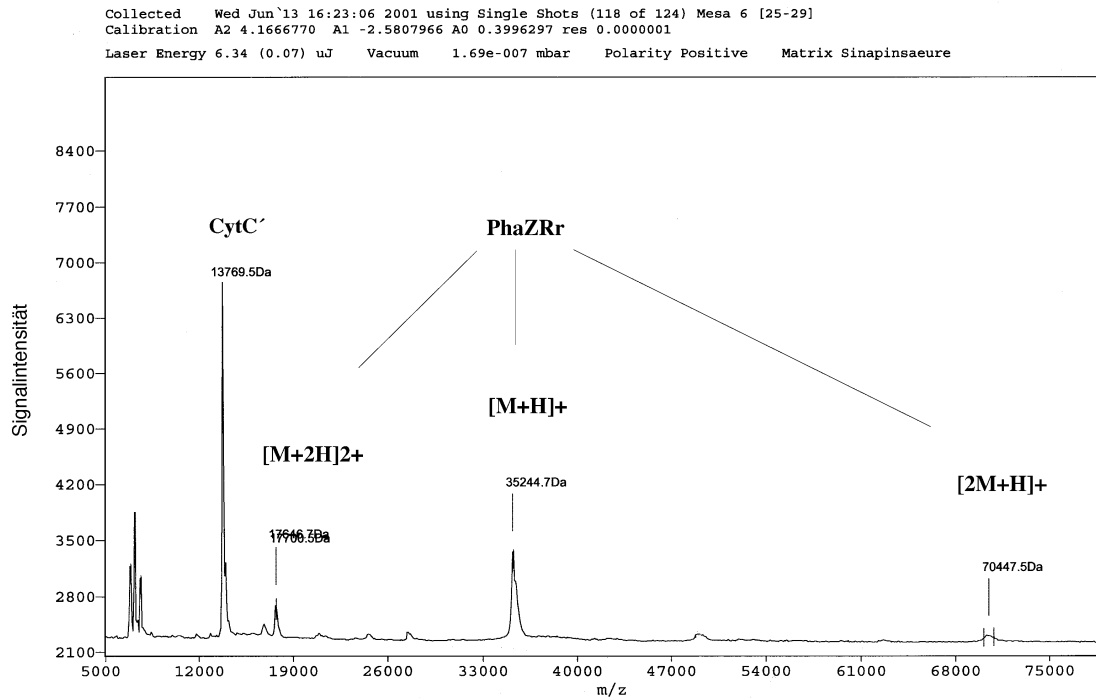


Abb. 67: Gelpermeationschromatographie der nPHA-Depolymerase PhaZRr an Superdex™ 75 PC 3.2/30.

### 3.11.1.3. Bestimmung der Molekularmasse von PhaZRr durch MALDI-TOF-MS

Da die mittels Gelpermeationschromatographie ermittelte Molekularmasse der nPHA<sub>SCL</sub> Depolymerase PhaZRr offenbar vom apparenten Molekulargewicht unter reduzierenden Bedingungen (SDS-PAGE) abwich, und auch für PhaZ7 aus *P. lemoignei* unter 3.7.1.2. bereits eine deutliche Abweichung der nativen Molekulargewichte beobachtet worden war, wurde eine Größenbestimmung des Proteins und eventueller Untereinheiten mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie nach 2.6.12. durchgeführt. Die externe Kalibrierung erfolgte mit Carbonic Anhydrase B (28980 Da). Das MALDI-TOF-Massenspektrum der nPHA Depolymerase PhaZRr (Abb. 68) besaß ein für Proteine charakteristisches Peakmuster. Neben einem Hauptpeak, im dargestellten Experiment bei  $m/z$   $35247 \pm 85$  Dalton, welcher dem einfach geladenen Protein ( $[M+H]^+$ ) entsprach, traten zwei Peaks geringerer Signalintensitäten auf. Im Rahmen der Messgenauigkeiten handelte es sich hierbei offenbar um das doppelt geladene Monomer ( $[M+2H]^{2+}$ ,  $m/z$  17647) sowie das Signal des einfach geladenen Dimeren ( $[2M+H]^+$ ,  $m/z$  70448). Bei  $m/z$  13770 fand sich in einigen Proben der Massenpeak einer häufig über den Reinigungsverlauf beobachteten Kontamination, welche in der SDS-PAGE ein apparente Molekulargewicht von  $16 \pm 3$  kDa besaß. Die N-terminale Ansequenzierung der zugehörigen Proteinbande nach Western-Blot ergab die Sequenz: N'-ADPAAYVEYRXSVL-C'. Im anschließenden Datenbankvergleich konnte gezeigt werden, daß es sich hierbei offenbar um CytC' (MEYER et al., 1975; DUS et al., 1968; SELF et al., 1990) aus *R. rubrum* handelte. Die ermittelte Masse zeigte Übereinstimmung mit der des abgeleiteten Proteins von 13116 Dalton ohne Hämgruppe (SwissProt Accession Nr. P00144).



**Abb. 68:** MALDI-TOF-Massenspektrum der nPHASCL-Depolymerase PhaZRr. 1  $\mu$ l Proteinlösung (0,36  $\mu$ g) wurde mit Sinapinsäure kokristallisiert (2.6.12.).

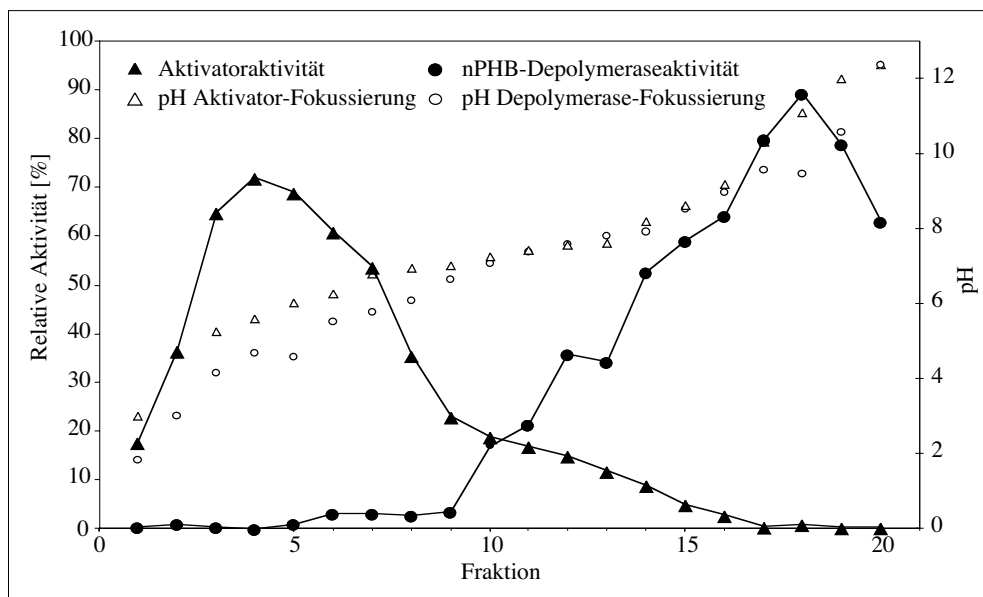
#### 3.11.1.4. Glycosylierungstests

Beschriebene extrazellulären dPHASCL-Depolymerasen aus *P. lemoignei* zeigten bei heterologer Expression in *E. coli* eine geringere Größe in der SDS-PAGE als die Wildtypenzyme. Aus dem Nachweis von Neutralzuckern mit bis zu 5 % Anteil am Molekulargewicht (JENDROSSEK et al., 1995b) sowie Ergebnissen der Proteinmassenspektroskopie wurde von den Autoren für *P. lemoignei* eine Glycosylierung der Exoenzyme postuliert. Zur Überprüfung der nPHB-Depolymerase PhaZRr auf das Vorhandensein möglicher glycosidischer Reste wurde 1  $\mu$ g des unter 3.10.3. gereinigten Proteins im Dot-Blotverfahren auf einer PVDF-Membran immobilisiert, und ein immunologischer Test mit Hilfe des DIG Glycan Detection Kit (Boehringer, Mannheim) nach 2.9.4. durchgeführt. PhaZRr zeigte, wie PhaZ7 und die Negativkontrolle Creatinase, keine Reaktion. Wie aus Abb. 23 (3.7.1.4.) zu erkennen, gaben die in gleicher Menge eingesetzten dPHB-Depolymerasen PhaZ2 und PhaZ5 in Übereinstimmung mit den Angaben von BRIESE et al. (1994b) eine deutlich positive Färbung.

#### 3.11.2. Isoelektrischer Punkt

Die isoelektrische Fokussierung ergab für PhaZRr einen experimentellen isoelektrischen Punkt von pH  $9,5 \pm 0,5$ . Das Ergebnis stimmte mit dem während der Chromatofokussierung an Mono P beobachteten Bindeverhalten, und der Retention bei pH-Werten zwischen 8,5 und 9,9 überein. Zugleich konnte für die Aktivatorkomponente bei Einsatz eines Ammoniumsulfat gefällten (Fraktionsbereich 50 –65 % Sättigung) und gegen 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), hitzebehandelten und

nach Abzentrifugation mit 1 Volumen  $H_2O_{bidest.}$  verdünnten Zellextraktes ein deutlich niedrigerer pI bei  $pH\ 5,6 \pm 0,4$  ermittelt werden.



**Abb. 69:** Bestimmung des isoelektrischen Punktes der nPHB-Depolymerase PhaZRr und des Aktivators durch analytische Flüssigfokussierung in einer 18 ml Rotofor®-Kammer.

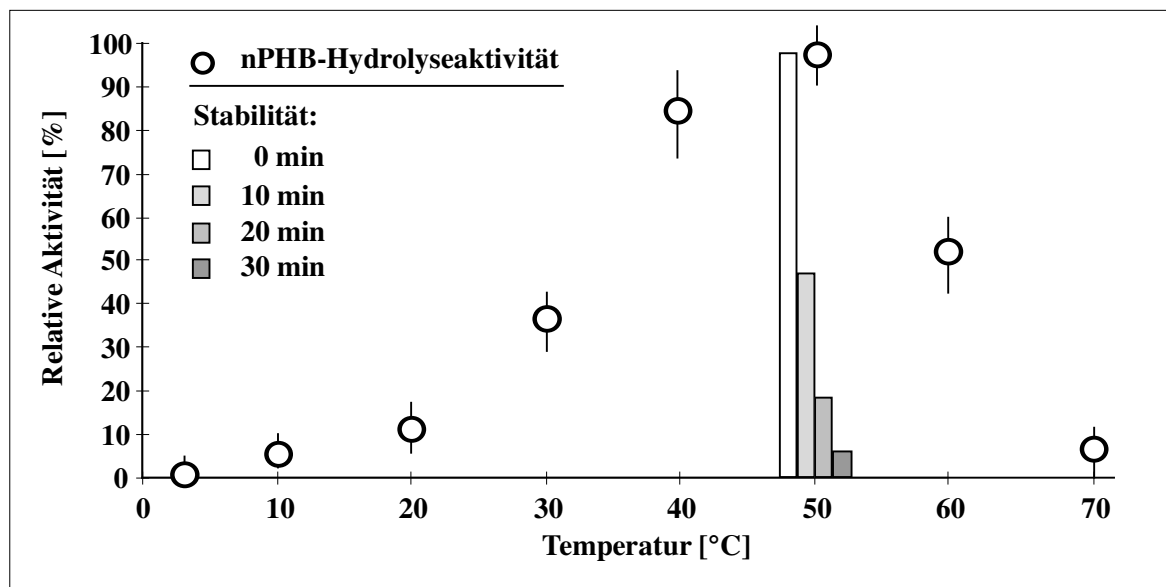
Im ersten Experiment wurden 8 ml (126  $\mu$ g) an DEAE-Sephacel gereinigte PhaZRr in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 (Depolymeraseaktivität) in 18 ml  $H_2O_{bidest.}$  mit 1 % (v/v) Ampholyt (Biolyte®, pH-Bereich 3-10) für 3 h bei 4°C fokussiert (2.6.8.) und anschließend die Aktivitäten im Trübungstest (2.10.1.3.) ermittelt.

Für die Fokussierung der Aktivatorkomponente wurden 0,5 ml eines nach Fällung mit Ammoniumsulfat (50-65 % Sättigung) und nach Dialyse gegen 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) in 1 Volumen  $H_2O_{bidest.}$  verdünnten, für 10 min bei 95°C behandelten und von ausgefallenem Protein abgetrennten löslichen Aktivatorextraktes (0,2 mg Protein/ml) mit 1 % (v/v) Ampholyt (Biolyte®, pH-Bereich 5-7) versetzt, mit  $H_2O_{bidest.}$  auf 19 ml Endvolumen verdünnt und ebenfalls für 3 h fokussiert. Die anschließende Detektion der Aktivatoraktivität erfolgte im optischen Test nach 10-minütiger Vorinkubation von nPHB in Gegenwart der Aktivatorprobe durch Zugabe von je 5  $\mu$ l gereinigter (Aktivator-freier) nPHAS<sub>CL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum*. Um pH-Änderungen durch die jeweiligen IEF-Proben im Test zu unterbinden, wurde für die Aktivitätsbestimmung mit 200 mM Tris-HCl, pH 9,0, gearbeitet.

Da die Daten zweier unabhängiger Versuche zusammengefasst sind, wurden alle Aktivitäten in relativen Werten angegeben. Als Bezug (100 % = 1900 U/ml) diente ein Testansatz mit Trypsin und PhaZRr nach 2.10.1.3.

### 3.11.3. Temperaturoptimum der nPHA-Hydrolyse durch gereinigte PhaZRr

Die nPHAS<sub>CL</sub>-Hydrolyse durch PhaZRr erwies sich in hohem Maße temperaturabhängig. Untersuchungen zur Hydrolyse von nPHB aus *R. eutropha* H16 und rekombinanten *E. coli* (*phaABCP*) im turbidimetrischen Test (2.10.1.2., 2.10.1.3.) ergaben ein Temperaturoptimum der Esterasereaktion von  $50 \pm 5$  °C (Abb. 70). Während die Aktivität im Bereich zwischen 4°C (keine signifikante Polymerhydrolyse) bis 50°C exponentiell anstieg, kam es bei weiterer Erhöhung der Temperatur auf 60°C zu einer drastischen Aktivitätsabnahme, welche offenbar mit einer zunehmend rascheren Inaktivierung des Enzyms einherging. Bei Temperaturen oberhalb 70°C war keine signifikante enzymatische Hydrolyse mehr nachweisbar.



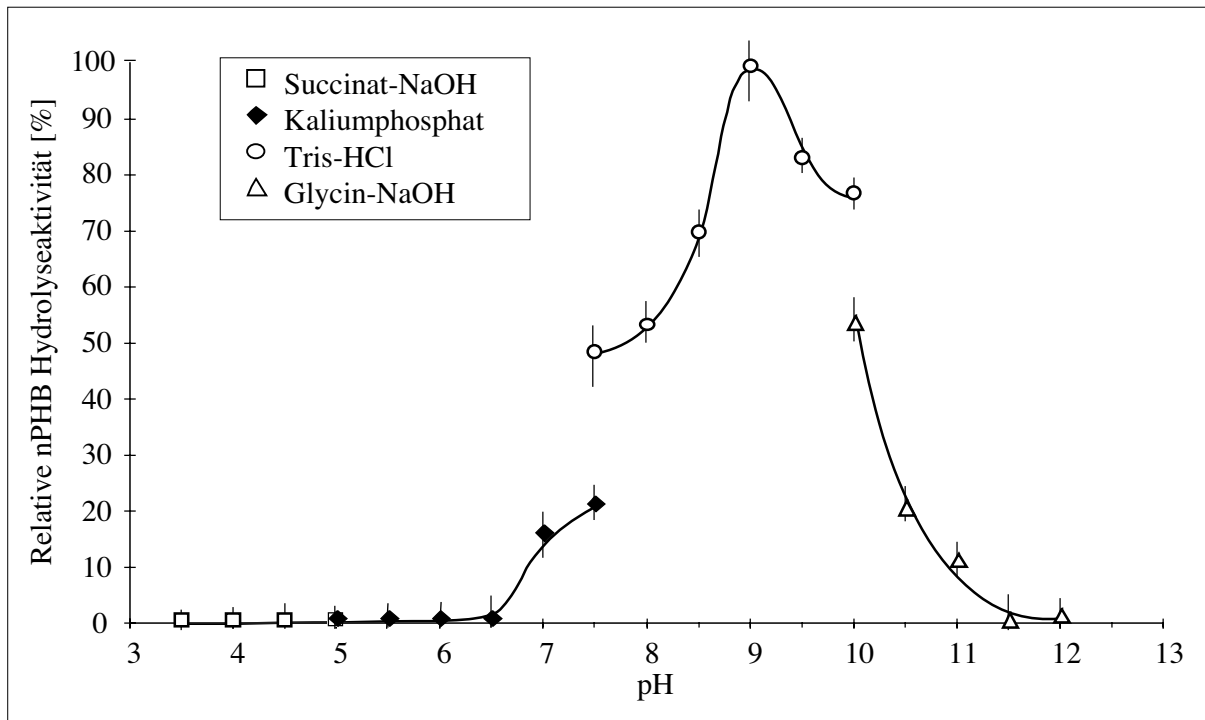
**Abb. 70:** Temperaturoptimum der Hydrolyse nativer PHB-Granula aus *R. eutropha* H16 durch PhaZRr (○) und Stabilität des Enzyms bei optimaler Hydrolysetemperatur (Säulendiagramm) in 100 mM Tris-HCl (pH 8,0). Die Hydrolyserate in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur wurde in temperierten 1 ml Küvetten nach 2.10.1.3. bestimmt und die erhaltenen Aktivitäten zur jeweils bestimmten maximale Rate (Temperaturoptimum) der Meßreihe korreliert. Nach 0, 10, 20 und 30 min wurden je 40 µl der Stabilitätstestansätze bei 50°C entnommen und ein Aktivitätstest mit 20 µl Probe als Doppelbestimmung in 2 ml Tris-HCl (100 mM, pH 8,0) im Mikrotiterplattenreader durchgeführt.

PhaZRr besaß bei 50°C in Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl; pH 8,0) eine Halbwertszeit von 9 min. Bei niedrigeren Temperaturen erwies sich die nPHA-Depolymerase hingegen in Abhängigkeit vom verwendeten Puffer zunehmend stabiler. Jedoch lagen die Halbwertszeiten deutlich unter den für die extrazelluläre dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase bestimmten Werten. Bei Raumtemperatur sank die Aktivität innerhalb von 10 min um bis zu 22 % (3.11.6.4., Abb. 80). Nach 12 h in Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) bei 21°C waren noch 45 % der Ursprungsaktivität nachweisbar. Gegenwart von 5 % (w/v) NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> führte zu einer geringfügigen Stabilisierung (53 % Restaktivität nach 24 h). Selbst bei Lagerung auf Eis traten innerhalb von 24 h Verluste von bis zu 25 % auf. Für eine längerfristige Konservierung mußten die Proben daher nach Schockgefrieren (Flüssigstickstoff) bei -20 oder -70°C gelagert werden, wobei sich Zusätze von bis zu 5 % (w/v) NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>; Saccharose oder 5 % (v/v) Glycerol als vorteilhaft erwiesen.

Da PhaZRr bei optimaler Reaktionstemperatur bereits instabil war, die Reaktion bei physiologischen Temperaturen jedoch mit deutlich geringerer Geschwindigkeit ablief, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit Aktivitätsmessungen routinemäßige bei 40°C durchgeführt. Eine Reihe extrazellulärer dPHA<sub>SCL</sub>- und dPHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen zeigten hinsichtlich des Temperaturoptimums ein ähnliches Verhalten (MÜLLER, 1992; SCHIRMER, 1994) wie PhaZRr. Die beschriebenen Aktivitätsmaxima korrelierten gut mit den für die nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZRr bestimmten Werten. Das Enzym unterschied sich jedoch offenbar von der wesentlich stabileren extrazellulären nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei*.

### 3.11.4. Einfluß des pH-Wertes auf die nPHB Depolymeraseaktivität von PhaZRr

In vorangegangenen Versuchen zur Bestimmung von Temperaturstabilität und optimaler PHA-Hydrolysetemperatur wurde eine erhöhte Aktivität des Enzyms in alkalischen Puffern beobachtet. Wie die Mehrheit der beschriebenen extrazellulären dPHB-Depolymerasen (JENDROSSEK, 2001b) war auch PhaZRr im sauren Milieu nicht aktiv. Zwischen pH 8,5 und 10,0 kam es hingegen zu einer drastischen Aktivitätszunahme. Das Optimum der nPHB-Hydrolyse durch das Enzym lag im Tris-HCl-gepufferten Test bei  $\text{pH } 9,0 \pm 0,5$  (Abb. 71).



**Abb. 71:** nPHB-Hydrolyseaktivität von PhaZRr in Succinat-NaOH (pH 3,5-5,0), Kaliumphosphatpuffer (pH 5,0-7,5), Tris-HCl (pH 7,0-10,0) sowie Glycin-NaOH (pH 10,0-12,0).

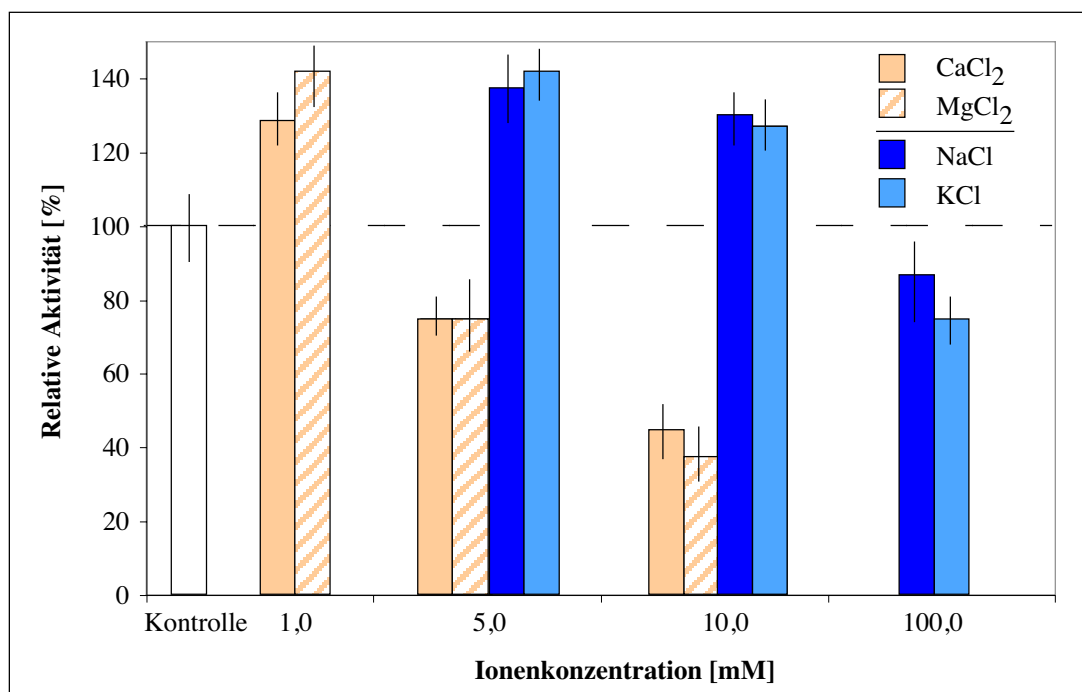
Zur Bestimmung des pH Optimums wurde nPHB-Granulasuspension (zehnfach konzentriert) in 2,5 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 min bei 40°C in Gegenwart von 12,5 µg/ml Trypsin vorinkubiert, die Protease anschließend durch Zugabe von 25 µg/ml Ovomuroid inhibiert und die Reaktion nach  $10^{-1}$  Verdünnung im entsprechenden Puffer (150 mM) durch Zugabe von 20 µl Enzym (0,72 µg verdünnt in H<sub>2</sub>O) gestartet. Gemessen wurde die Trübungsabnahme (s. 2.10.1.3.). Die Autohydrolyserate der Granula bei entsprechendem pH wurde in Kontrollen ohne PhaZRr erfaßt und von den Meßwerten abgezogen.

Es bestand eine strikte Abhängigkeit der Aktivität von der Art des eingesetzten Reaktionspuffers, wie sie bereits unter 3.7.4. für PhaZ7 beobachtet wurde. So lag die Hydrolyserate bei Verwendung von Glycin-NaOH anstelle von Tris-HCl bei pH 10,0 um 39 % niedriger. Bei pH 1,0 bzw. 13,0 wurde das Enzym vollständig inaktiviert.



### 3.11.5. Einfluß von Ionen auf die PHA-Depolymerisation durch PhaZRr

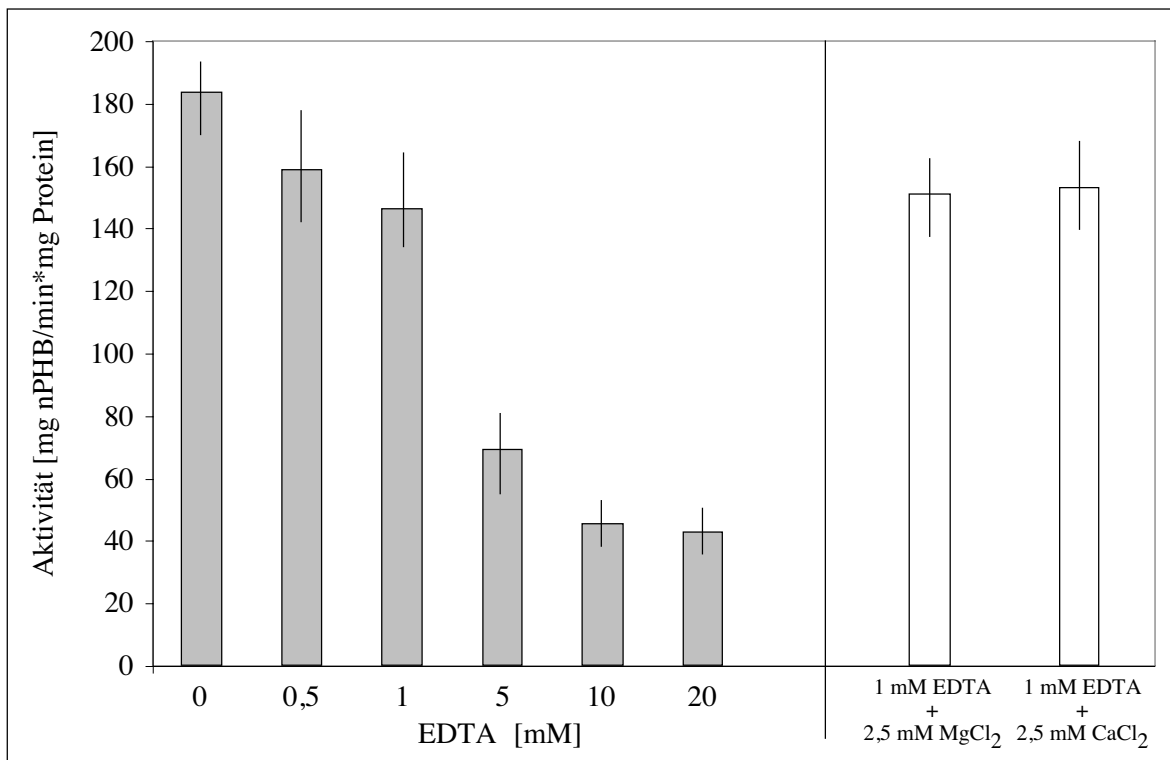
Die nPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZRr zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Gegenwart ein- und zweiwertiger Kationen (Abb. 72).  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  führten in geringer Konzentration zwischen 1 und 25 mM zu einem Anstieg der Hydrolyseraten um 40 %. Überschritt die Konzentration dieser Ionen im Testpuffer 50 mM, kam es mit steigender Konzentration zur 15 bis 25 %-igen Verringerung der hydrolytischen Aktivität mit nPHB. Mit zweiwertigen Kationen traten bereits bei 1 mM Ionenkonzentration signifikante Steigerungen der initialen Hydrolyserate auf. Der stimulatorische Effekt sank mit zunehmender Konzentration jedoch bereits ab 5 mM deutlich unter die Werte der Kontrolle ohne Ionenzusatz. Sowohl mit  $\text{CaCl}_2$  als auch in Gegenwart von  $\text{MgCl}_2$  kam es bei Überschreiten von 10 mM Endkonzentration im Test zu makroskopisch sichtbaren Ausfällungen.



**Abb. 72:** Einfluß der Konzentration ein und zweiwertiger Kationen auf die nPHB-Hydrolyseaktivität von PhaZRr. Die photometrischen Tests wurden nach 2.10.1.3. durchgeführt. Als Referenz (100 % = 178 mg nPHB/min\*mg Protein) dienten Kontrollansätze in 50 mM Tris-HCl, pH 9,0. Vertikale Linien geben den absoluten Meßfehler wieder. Aufgrund aufgetretener Ausfällungen konnten keine Werte für >10 mM bivalenter Ionen bestimmt werden.

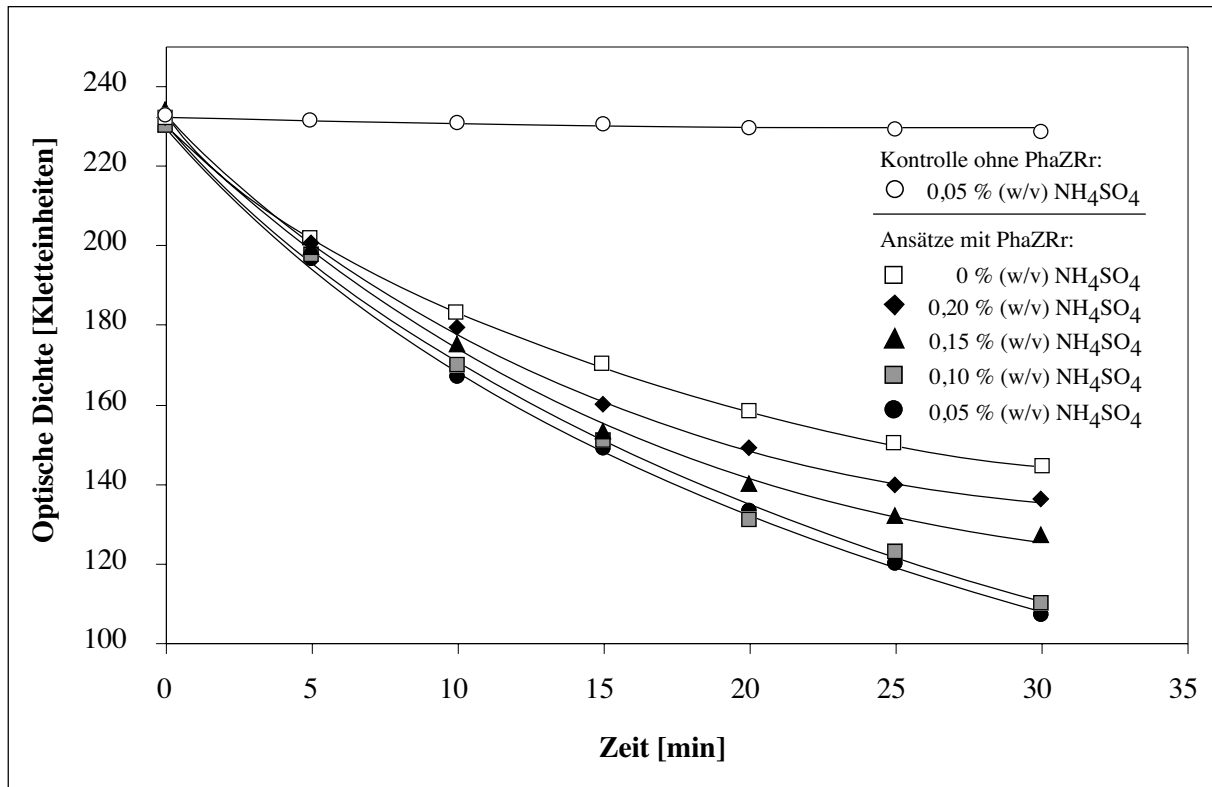
Um den Einfluß von bivalenten Kationen auf das Enzym genauer zu charakterisieren, wurden Hemmversuche mit zunehmender Konzentration an EDTA durchgeführt. Die Gegenwart des Komplexbildners im Testansatz führte zu einer konzentrationsabhängigen Verminderung der nPHB-Hydrolyse. Die wirksamen EDTA-Konzentrationen lagen jedoch mit 5 mM für 52 % Hemmung relativ hoch (Abb. 73). Selbst in Gegenwart von 20 mM EDTA war keine vollständige Hemmung zu beobachten. Die Aktivitätsverluste konnten durch Zugabe eines 2,5-fachen molaren Überschusses an  $\text{MgCl}_2$  oder  $\text{CaCl}_2$  nicht kompensiert werden. Möglicherweise waren strukturstabilisierend wirkende zweiwertige Ionen im korrekt gefalteten Protein nicht exponiert lokalisiert.

Routineaktivitätstests erfolgten aufgrund der Ergebnisse stets in Gegenwart von 1 mM MgCl<sub>2</sub> oder CaCl<sub>2</sub>.



**Abb. 73:** Hemmung der nPHB-Depolymerase PhaZRr durch EDTA (graue Säulen) sowie Reaktivierung durch zweiwertige Ionen. Die Aktivitäten wurden nach 2.10.1.3. im turbidimetrischen Test in 50 mM Tris-HCl (pH 9,0) bestimmt. Im Falle des Reaktivierungsexperimentes (weiße Säulen) wurden dem Reaktionspuffer zu Beginn 1 mM EDTA zugesetzt und der Ansatz 1,5 min bei 40°C vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von in Reaktionspuffer mit 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA inkubierter Probe von PhaZRr. Zur Reaktivierung wurden nach 4,5 min 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> bzw. MgCl<sub>2</sub> zugegeben, so daß die Endkonzentration theoretisch frei verfügbarer bivalenter Kationen 1,5 mM betrug. Vertikale Linien markieren den Meßfehler der Parallelbestimmungen.

Die offenbar im Falle von PhaZRr generell stabilisierende Wirkung geringer Ionenkonzentrationen insbesondere bei höherer Temperatur wurde durch eine weitere Beobachtung bestätigt. Bei Einsatz des in Gegenwart von 5 % (w/v) Ammoniumsulfat gelagerten Enzyms kam es offenbar zu einer Stabilisierung der Aktivität unter Testbedingungen [Tris-HCl, pH 8,0; 40°C; Endkonzentration (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> maximal 0,1 % (w/v)]. Der Zeitraum des linearen nPHB-Abbaues verlängerte sich und die verbliebene Resttrübung im Test sank entsprechend stärker, was auf einen vollständigeren Abbau hindeutete. Erst bei einer Erhöhung der Sulfatkonzentration über 20 % (w/v) konnte eine signifikante Ausfällung des Enzyms beobachtet werden, die bei nachfolgender Verdünnung im Test zu 72 % reversibel erschien.



**Abb. 74:** Stabilisierende Wirkung von Ammoniumsulfat auf die nPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZRr im Testansatz bei 40 °C. Das Enzym wurde in 50 mM Tris-HCl-Reaktionspuffer mit 0; 5; 10; 15; 20 % (w/v) Ammoniumsulfat vorverdünnt und die Reaktion durch Zugabe von 20 µl der Verdünnung auf 2 ml Testansatz im Klettphotometer gestartet. Die gezeigten Werte entsprechen der Trübung nach Leerwertabzug (ohne Enzym ○).

### 3.11.6. Untersuchungen zur Substratspezifität von PhaZRr

Für die in der Literatur beschriebenen PHA-Depolymerasen war eine ausgeprägte Spezifität gegenüber den Kettenlängen der im Polymer vorkommenden Monomereinheiten charakteristisch. Sie zeichneten sich dadurch aus, entweder PHA<sub>SCL</sub> (C3 bis C5; PhaZ1 bis PhaZ7 aus *P. lemoignei*) oder PHA<sub>MCL</sub> (C6 bis C14; PhaZ aus *Pseudomonas fluorescens* GK13, SCHIRMER et al., 1995) hydrolysieren zu können. Die gereinigte nPHB-Depolymerase PhaZRr zeigte ebenfalls ein offenbar strikt auf PHA<sub>SCL</sub> begrenztes Substratspektrum. Jedoch schien wie bereits im Falle von PhaZ7 eine strikte Präferenz für die amorphe Konformation zu bestehen. Native PHB-Granula aus *R. eutropha*, *B. megaterium* sowie *B. cereus* wurden mit vergleichbarer maximaler Rate umgesetzt (Tab. 22). Das Enzym besaß signifikante Aktivität mit nPHB aus rekombinanten *E. coli* sowie mit nPHV aus *Chromobacterium violaceum*. Die absoluten Aktivitätswerte für die gleiche Granulaart divergierten in Abhängigkeit von der Art der Aktivierung (Trypsin, Aktivator; s. 3.11.6.1. Abb. 75) und den verwendeten Granulapräparationen um bis zu > 50 % im Trübungstest. Unterschiede in der Granulabeschaffenheit und -größe und damit die verfügbare Substratoberfläche hatten offenbar ebenfalls einen Einfluß auf die Aktivität. Aus diesem Grunde wurde für die Enzymcharakterisierung in einer Meßreihe nach Möglichkeit Material ein und derselben Granulapräparation verwendet. Um Effekte der, an native biochemisch intakte PHA-Granula gebundenen, intrazellulären Depolymerase des jeweiligen PHA-

Donororganismus auszuschließen, wurden wiederum Kontrollen zur Autohydrolyse der Granula mitgeführt. Die Rate der Autohydrolyse ( $0,017 \mu\text{mol}/\text{min}$  pro mg nPHB aus *R. eutropha* H16) im Test nach 2.10.1.5. (Titristat) lag nicht signifikant über den geringen beobachteten Raten der chemischen Hydrolyse des Polyesters. Die Verwendung von nPHB aus rekombinanten *E. coli* HMS174, welche die Gene des PHB-Genclusters (*phaCAB<sub>re</sub>* mit und ohne *phaP*) aus *R. eutropha* trugen, jedoch keine intrazelluläre PHB-Depolymerase besaßen, bestätigte die Spezifität von PhaZRr für nPHB unabhängig von An- oder Abwesenheit der Phasinproteine. Gegen nPHO-Granula aus *P. oleovorans* (Sowohl ohne als auch, zum Schutz vor Autohydrolyse, mit 1% (w/v) SDS isoliert; s. 2.12.) erwies sich PhaZRr vollständig inaktiv.

Um die Oberflächenstruktur nativer nPHA<sub>SCL</sub>-Granula als Voraussetzung einer Hydrolysierbarkeit ausschließen und den Zusammenhang einer Hydrolysierbarkeit mit der physikalischen Konformation des Polyesters untersuchen zu können, wurden ausgehend von in Lösungsmittel gelöstem PHB oder PHV sogenannte artifizielle Polymergranula hergestellt (2.13.). In diesen wurden PHA in ihrer amorphen Form von einer Detergenzschicht umhüllt und der amorphe, dem des Polymers in nativen Granula ähnliche Zustand stabilisiert. Mit SDS oder Natriumcholat präparierte artifizielle PHB- oder PHV-Granula wurden von PhaZRr ebenfalls hydrolysiert, wohingegen Latices aus PHO oder P(3HD-*co*-3HO) kein verwertbares Substrat darstellten. Wurde zur Herstellung der artifiziellen PHB- oder PHV-Granula CTAB verwendet, so konnte keine signifikante Hydrolyse nachgewiesen werden. Eine positive Oberflächenladung hemmte offenbar die Aktivität des Enzyms, wohingegen die negative Ladung durch Natriumcholat dem natürlichen Zustand eines biochemisch intakten von strukturellen Phasinproteinen und polaren Phospholipiden umgebenen nPHA-Granulum offenbar besser entsprach. Für eine hydrolytische Aktivität von PhaZ7 mit artifiziellen Granula war die Gegenwart der Aktivatorkomponente nicht erforderlich. Der Trübungsverlust der anfangs milchigen Granulasuspensionen ging in allen Fällen einer Aktivität von PhaZRr mit einer durch Titration nachgewiesenen Freisetzung von Säuregruppen infolge der Spaltung der Esterbindungen einher.

Eine Behandlung nativer Granula mit Proteasen (Trypsin) und anschließender Inaktivierung der Protease mittels Ovomuroid erhöhte die Säurefreisetzung bei Zugabe von PhaZRr auf bis zu  $3100 \text{ U}/\text{mg}$  Protein, was die Bedeutung der Oberflächenstruktur hinsichtlich der Zugänglichkeit des Polymersubstrates unterstrich (Tab. 22).

Wurde nach 2.2.3. gewonnene parakristalline PHA als Substrat eingesetzt, konnte weder mit dPHB oder dPHV bzw. dPHO noch mit den Copolymeren d(3-HB-*co*-HV) oder dP(3HD-*co*-HO) (Copolymer aus 3-Hydroxyoctanoat und 3-Hydroxydecanoat) eine Hydrolyse nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob es sich um Polymerfilme oder Suspensionen handelte. PhaZ2 und PhaZ5 hingegen zeigten als Kontrollen signifikante Säurefreisetzung aus dem parakristallinen Polymer. Die Werte lagen jedoch nur bei 25 % der Raten, welche für diese Enzyme bei proteasebehandelten nPHB-Granula beobachtet wurden.

Alle bisherigen Befunde sprachen für eine Verwandtschaft von PhaZRr zu extrazellulären Polyester-Depolymerasen. Um sicherzustellen, daß es sich bei diesem Enzym um eine echte PHA-Depolymerase handelte, wurden im Ausschlußverfahren weitere Substrate getestet. Die im folgenden beschriebenen Tests wurden sowohl bei pH 7,5 als auch bei pH 9,0, nahe dem für PhaZRr bestimmten pH-Optimum (2.10.1.2.; 2.10.1.5.) ausgeführt. Mit Poly(6-hydroxyhexansäure)-Suspensionen (s. 2.10.1.6.), welche von den Kontroll-Lipasen (Schweineleber, CalB *Candida antartica*) jedoch nicht von *P. aeruginosa* Lipase oder Esterasen (*Streptomyces diastatochromogenes*, KHALAMEYZER und BORNSCHEUER, 1999; *Pseudomonas fluorescens*, KREBSFÄNGER et al., 1998) hydrolysiert wurden, konnte keine Polycaprolactonase-Aktivität für PhaZRr nachgewiesen werden.

PhaZRr war nicht in der Lage, die Triglyceride Tributyrin und Triolein als typische Esterase- und Lipasesubstrate zu hydrolysieren. Auf entsprechende Testagarplatten aufgebracht Enzym führte auch nach 72 h Inkubation zu keiner Hofbildung, während in Gegenwart von 2,5 µg der Kontroll-Lipasen oder Esterasen bereits nach 10 min bei 366 nm deutlich fluoreszierende Aufklarungszonen entstanden. Die im Plattentest mit Rhodamin B nach 2.10.4. erhaltenen Ergebnisse wurden durch Titistatversuche (2.10.1.5.) bestätigt, wobei auch ein Verzicht auf die Gegenwart von Lösungsvermittlern (Natriumcholat oder Gummi arabicum) keinen Einfluß auf die für PhaZRr negativen Resultate hatte. Olivenöl konnte von PhaZ7 offenbar ebenfalls nicht gespalten werden. Die Qualität der Testbedingungen wurde durch den Einsatz von Lipase aus Schweineleber, CalB aus *C. antarctica* sowie Esterasen (*S. diastatochromogenes*, *P. fluorescens*) sichergestellt.

Serinproteasesubstrate wie Casein (Plattentest und Suspensionstest nach 2.10.5.; Positivkontrollen: Proteinase K, E und Trypsin) und N- $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin-4-nitrilid (BAPNA) ergaben keine Anhaltspunkte für eine proteolytische Aktivität von PhaZRr. Papain und Trypsin führten hingegen zu einer an der Gelbfärbung erkennbaren Phenolfreisetzung.

Das Enzym zeigte keine Amidase-/Nitrilase-Aktivität gegen aliphatische oder aromatische Nitrile (Valeronitril, Benzotrinitril, 2-Phenylpropionitril). PhaZRr wies keine Amylaseaktivität auf Stärke-Testagar (2.10.8.), während die zur Kontrolle eingesetzte  $\alpha$ -Amylase aus *Bacillus amyloliquefaciens* innerhalb von 20 min zu nachweisbaren Hydrolysehöfen führte.

Gurken-Cutin (BONNEN und HAMMERSCHMIDT, 1989; DEISING et al., 1992), in Gegenwart von PhaZRr im Titrationstest auf Abbaubarkeit geprüft, ergab auch nach 60-stündiger Inkubation der Ansätze bei 40°C mit bis 50 µg/ml PhaZRr keine signifikante hydrolytische Aktivität. Die als Positivkontrolle eingesetzte pankreatische Lipase hingegen führte zur Freisetzung von Säuregruppen. PhaZRr unterschied sich hinsichtlich seines Substratspektrums grundlegend von lipolytischen Enzymen und anderen Hydrolasen. Jegliche Lipase, Protease und von der PHA-Spaltung verschiedene Esterase-Aktivität fehlte. Offenbar handelte es sich bei PhaZRr um eine echte PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase.

Ataktisches PHB, welches weder durch Esterasen (*S. diastatochromogenes*, *P. fluorescens*) noch durch Lipasen (aus *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida antarctica* und

Schweineleber) hydrolysiert wurde, schien allerdings unabhängig von der Gegenwart des Aktivators auch kein Substrat für PhaZRr darzustellen.

Bei PhaZRr aus *R. rubrum* handelte es sich offenbar um eine PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase mit ausschließlicher Spezifität für PHB und PHV in seiner amorphen Form. Das Enzym wurde aufgrund der biochemischen Daten und zur Abgrenzung von anderen dPHA-Depolymerasen als nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase bezeichnet. In Tab. 22 wurden die Substratspezifitäten von PhaZRr zusammengefaßt.

### 3.11.6.1. Verlauf der PHA-Hydrolyse durch PhaZRr und Abhängigkeit von einer „Aktivierung“ nativer PHA-Granula

In Gegenwart von PhaZRr kam es bei Verwendung von nPHB aus rekombinanten *E. coli* (*phaCAB<sub>Re</sub>* mit und ohne Phasinproteingen: *phaP*), als auch mit nPHB aus *R. eutropha* nach 30 min Inkubation nur zu einer vergleichsweise geringen Monomerfreisetzung während die Trübung der milchigen nPHB-Suspensionen in weniger als fünf Minuten nahezu vollständig verschwand (Abb. 75), was auf eine Bildung löslicher Produkte hinwies. Wurden die gaschromatographisch bestimmten 3-HB-Gehalte der Granula (*R. eutropha* H16: 81 % w/w; *E. coli*: 77 % w/w) zugrunde gelegt, so entsprachen die freigesetzten Monommengen 16 % der theoretisch vorhandenen Monomeruntereinheiten bei vollständiger Hydrolyse (9,4 bzw. 9 µmol/mg nPHB). Oligomere 3-HB-Ester sollten einen Großteil der Hydrolyseprodukte von nPHB durch PhaZRr bilden. Mit biochemisch intakten nPHB-Granula aus verschiedenen Organismen wurde jedoch stets eine signifikante Resttrübung > 0,02 beobachtet, welche auch bei fortschreitender Inkubation nicht weiter sank. Das Ausmaß dieser Resttrübung war abhängig von der Art der Aktivierung. Eine exzessive Inkubation der nPHB-Granula in Gegenwart von Trypsin führte zum allmählichen Anstieg der Resttrübung, was möglicherweise auf eine unter diesen Bedingungen einsetzende Kristallisation des Polyesters hinweist. Eine Vorbehandlung der nPHB-Granula mit Phospholipase A führte zum vollständigen Verlust der Hydrolysierbarkeit. Die sofortige maximale Rate der nPHB-Hydrolyse wurde nur nach Vorbehandlung von nPHB mit Protease oder Aktivator erzielt. Die beobachteten *lag*-Phasen bei zeitgleicher Zugabe von mit Aktivator versetzter PhaZRr legen nahe, daß es sich beim Aktivierungsphänomen nicht um eine direkte Enzymaktivierung sondern um eine Substratmodifikation durch die Aktivatorkomponente handeln könnte.

**Tab. 22:** Substratspezifitäten der nPHA<sub>SCL</sub> Depolymerase aus *R. rubrum*.

	<b>nach Behandlung der Substrate mit</b>		
	<b>ohne Vorbehandlung</b>	<b>Aktivator</b>	<b>Trypsin/Ovomucoid</b>
<b>nPHA-Granula isoliert aus:</b>			
<i>R. eutropha</i> H16	660 <sup>a)</sup>	2800 <sup>a)</sup>	3100 <sup>a)</sup>
<i>E. coli</i> ( <i>phaCAB+phaP</i> )	104 <sup>a)</sup>	560 <sup>a)</sup>	1600 <sup>a)</sup>
<i>E. coli</i> ( <i>phaCAB</i> )	95 <sup>a)</sup>	490 <sup>a)</sup>	1900 <sup>a)</sup>
<i>B. megaterium</i>	(-)	+	++
<i>B. cereus</i>	(-)	+	++
<b>n-PHV-Granula:</b>			
<i>C. violaceum</i>	-	+	++
<b>n-PHO-Granula:</b>			
<i>P. oleovorans</i> ±1 % (w/v) SDS	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
<b>ataktisches PHB</b>			
[Poly( <i>R</i> -, <i>S</i> -3-HB)]	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
<b>denaturierte PHA (isotaktisch, parakristallin)</b>			
dPHB	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,05 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
dPHV	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
dPHO; dP[HO- <i>co</i> -HD] <sup>f)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>
<b>artifizielle (amorphe) PHA</b>			
PHB stabilisiert mit SDS oder Natriumcholat	++ (Na-Cholat) + (SDS)	++ (Na-Cholat) Cholat) + (SDS)	+ (Na-Cholat) + (SDS)
PHV stabilisiert mit SDS oder Natriumcholat	+ (Na-Cholat) + (SDS)	+ (Na-Cholat) + (SDS)	+ (Na-Cholat) + (SDS)
PHO-; dP[HO- <i>co</i> -HD] <sup>f)</sup> -Latex	< 0,01 <sup>a)</sup>		
PHB, PHV stabilisiert mit CTAB	< 1 <sup>a)</sup>	< 5 <sup>a)</sup>	< 1 <sup>a)</sup>
<b>weitere Hydrolase-Substrate:</b>			
Poly(6-hydroxyhexanoat)	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	n.b.
Triolein, Tributyrin, Olivenöl	< 0,01 <sup>a)</sup>	< 0,01 <sup>a)</sup>	n.b.
Casein; N- $\alpha$ -Benzoyl-	-	-	n.b.
L-arginin-nitrilid (s. 2.10.5.)			
Gurken-Cutin <sup>b)</sup>	< 0,01 <sup>b)</sup>	< 0,01 <sup>b)</sup>	< 0,01 <sup>b)</sup>
<i>p</i> -Nitrophenylester <sup>c)</sup> :	< 0,01 <sup>c)</sup>	< 0,01 <sup>c)</sup>	n.b.

**Methoden:** wenn nicht anders angegeben: Trübungstest (2.10.1.2.);

1 U mg<sup>-1</sup> = 1  $\mu$ g PHB min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> [- <1 U/mg; (-) <5 U/mg; + >5 U/mg; ++ >100 U/mg]

<sup>a)</sup> Titristatmethode nach 2.10.1.5.;

1 U mg<sup>-1</sup> = 1  $\mu$ mol Säure min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>

<sup>b)</sup> Test nach 2.10.7.;

[ $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>]

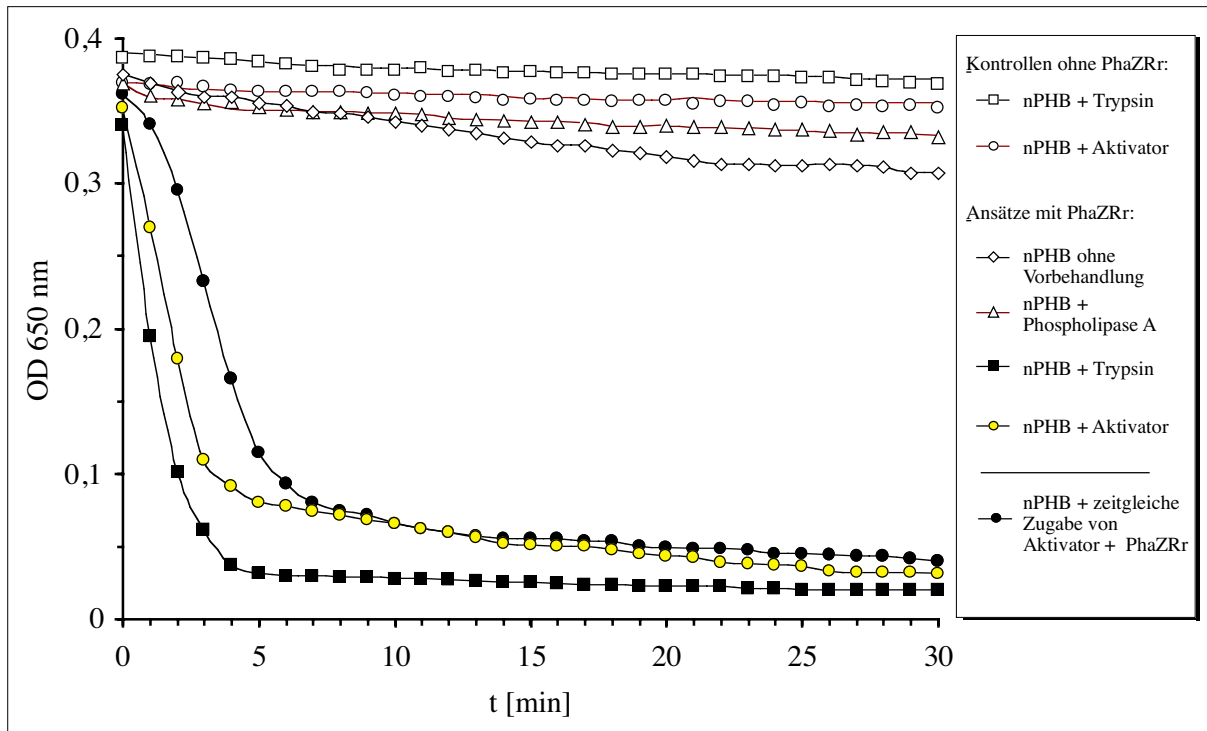
<sup>c)</sup> Optischer Test nach 2.10.3.;

[ $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>]

Verwendete *p*-Nitrophenylestersubstrate : *p*-NP-Acetat, *p*-NP-Butyrat, *p*-NP-Hexanoat (*p*-NP-Caproat), *p*-NP-Octanoat (*p*-NP-Caprylat), *p*-NP-Decanoat, *p*-NP-Hexadecanoat (*p*-NP-Palmitat)

<sup>f)</sup> Copolymer aus 3-Hydroxyoctansäure und 3-Hydroxydecansäure

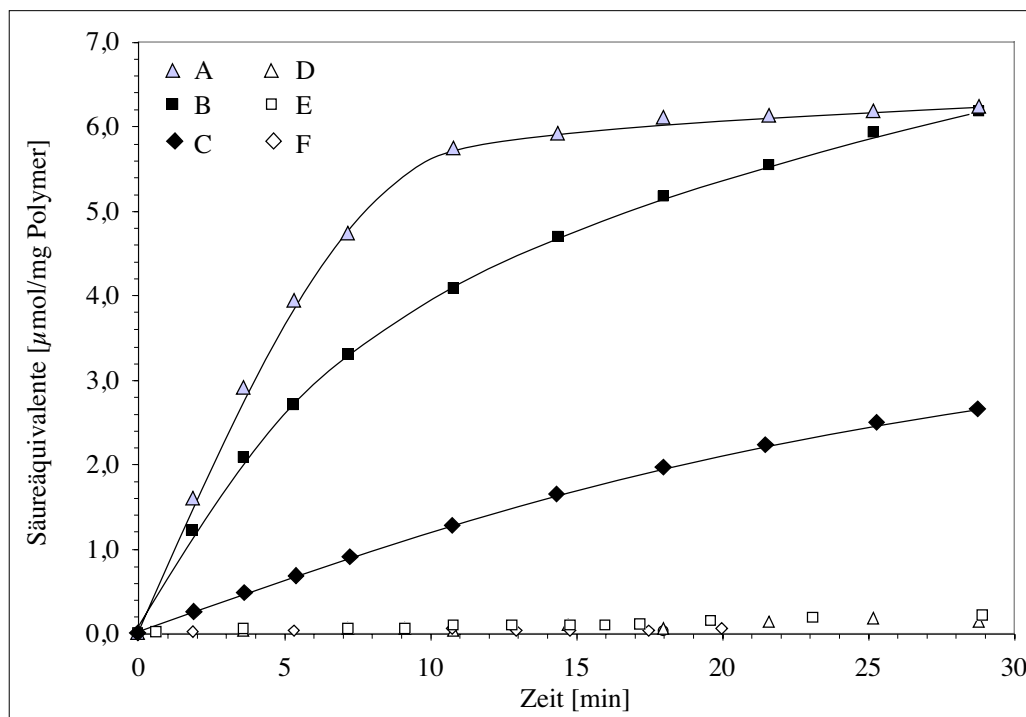
n.b. nicht bestimmt



**Abb. 75:** Aktivierungsabhängige Trübungsabnahme von nPHB-Suspensionen aus *E. coli* HMS174 (*phaABCP<sub>Re</sub>*) durch PhaZRr. Die Polymergranula wurden je 5 min bei 40°C mit Trypsin [0,55 µl Stammlösung (1,25 mg/ml) pro ml Ansatz], angereicherter Aktivatorkomponente (1/20 Volumen) oder Phospholipase A2 (Rinderpankreas; 50 µg/ml) vorbehandelt. Je 200 µl Suspension [5 mg native Granula in 5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,02 % w/v Natriumazid] mit oder ohne Aktivierung wurden mit 0,7 µg PhaZRr versetzt und bei 40°C inkubiert. Die Trübung wurde bei 650 nm verfolgt. In den mitgeführten Kontrollen ohne PhaZRr wurde die Eigenhydrolyse der Granula dokumentiert. Im Falle der zeitgleichen Zugabe von PhaZRr und Aktivator wurden beide Komponenten gemeinsam für 3 min vorinkubiert.

Die im Titrstatexperiment ermittelte Säurefreisetzung aus nPHB durch PhaZRr lag höher als die Werte der 3-HB-Freisetzung, blieb aber zugleich unter der maximal freisetzbaren Anzahl von Säureäquivalenten. Für verschiedene PHA<sub>SCL</sub>-Granula charakteristische Titrationskurven sind in Abb. 76 zusammengefaßt. Der Anteil von in der enzymatischen Reaktion freigesetzten Säuregruppen lag in allen Experimenten unabhängig von der Art der eingesetzten nPHA<sub>SCL</sub>-Granula zwischen 0,4 und 0,5 µmol pro µmol theoretischer Monomermenge im eingesetzten Polymer, was einer theoretischen Spaltung etwa jeder zweiten Esterbindung im Polymer entsprechen würde. Da es sich um die durchschnittliche Spaltungshäufigkeit handelte, konnten noch keine endgültigen Aussagen über die tatsächliche Länge der Hydrolyseprodukte getroffen werden. Gesichert schien jedoch auch für PhaZRr das Vorhandensein höherkettiger 3-HB-Oligomere im Überstand. Die Produktanalyse durch Normalphasen-Kieselgel-HPLC nach 2.11.3. zeigte, daß es sich bei den Hauptprodukten der enzymatischen Aktivität von PhaZRr um ein Gemisch aus 3-HB-Mono-, Di- und Trimeren handelte (3.11.6.2.; Abb. 78 C). Während PhaZRr mit parakristallinem dPHB offenbar keine Hydrolyse zeigte, konnte für das gereinigte Enzym im Titrationstest eine signifikante Aktivität mit nPHB ohne Vorbehandlung der Polymergranula nachgewiesen werden. Die Werte lagen bei 21 % der Hydrolyseraten nach Aktivierung der Granula mit Protease oder Aktivator.





**Abb. 76:** Säurefreisetzung aus PHB durch PhaZRr in Abhängigkeit von der Granula-Art und Aktivierung. Vortitrierte (und je nach Experiment speziell vorbehandelte) PHA-Suspensionen in  $\text{H}_2\text{O}$  mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$  (5,005 mg PHA Granula/10 ml; pH 9,0) wurden bei  $40^\circ\text{C}$  mit  $25 \mu\text{l}$  ( $0,9 \mu\text{g}$ ) in Wasser vorverdünnter nPHB-Depolymerase PhaZRr versetzt und die Reaktion gestartet (2.10.1.5.). Die freigewordenen Säureäquivalente wurden mit dem in der Gaschromatographie bestimmten 3-Hydroxyfettsäuregehalt der Granula korreliert (vergleiche 3.7.7.). (A) 10-minütige Vorbehandlung von nPHB mit 1,25 mg/ml Trypsin und anschließende Zugabe von 2,5 mg/ml Ovomucoid ( $40^\circ\text{C}$ ); (B) 10-minütige Vorbehandlung von nPHB mit  $10 \mu\text{l}$  partiell angereicherter Aktivatorfraktion; (C) nPHB ohne Vorbehandlung; (D) dPHB; (E) nPHB analog A proteaseaktiviert ohne PhaZRr; (F) nPHB analog B mit Aktivatorfraktion versetzt aber ohne PhaZRr. Ansätze A, B, C und D wurden mit PhaZRr inkubiert. E und F dienen als Kontrollen ohne Enzymzugabe.

### 3.11.6.2. Titrationsexperimente mit oligomeren PHA und Hydrolyseprodukte

Zur Klärung der Frage nach der Spezifität von PhaZRr und zur Bestätigung des unter 3.11.6. ermittelten, für bisher untersuchte  $\text{PHA}_{\text{SCL}}$ -Depolymerasen ungewöhnlichen Substratspektrums wurden Titrationsexperimente nach 2.10.1.5. mit synthetischen PHB-Oligomeren (Abb. 77 sowie 3.7.6.3, Abb. 31) durchgeführt. Aufgrund der geringen Löslichkeiten insbesondere höherkettiger Oligomere (R6 und R8) wurde mit maximal 1-2 mg pro 4 ml Ansatz gearbeitet. Da in den ersten bei pH 9,0 durchgeführten Versuchen eine stärkere chemische Hydrolyse der kurzkettigen Polyester auftrat [von 22 (Dimer) bis  $85 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Polymer}^{-1}$  (Oktamer)] wurden die Experimente bei pH 7,5 wiederholt [Spontanhydrolyse von 9 (Dimer) bis  $55 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Polymer}^{-1}$  (Oktamer)]. Die qualitativen Ergebnisse beider Experimente zeigten gute Übereinstimmung. Während das 3-HB-Dimer nicht und das 3-HB-Trimer nur mit vergleichsweise geringer Rate gespalten wurden, ergab sich mit höherkettigen Oligomeren eine im Vergleich zum 3-HB-Trimer um bis zu sechsmal höhere Anfangsrate der Hydrolyse (Tab. 23). Für all-R-Dimer wurde keine signifikante enzymatische Hydrolyse festgestellt. Die maximale Spezifität besaß PhaZRr offenbar für das 3-HB-Pentamer. Die Aktivitäten stiegen über 340 U/mg für das Trimer auf 1970 U/mg für das Penta- und 1220 U/mg für

das Hexamer. Die mit zunehmender Kettenlänge ansteigende und mit nPHB maximale Aktivität stützten im Konsens mit der unterhalb der Nachweisgrenze liegenden Aktivität gegen lösliche *p*-Nitrophenylacylester (3.11.6.) die Annahme, daß es sich bei PhaZRr um eine Polymerhydrolase handelt. Die Hydrolyseaktivitäten für polymeres nPHB lagen um 30 bis 60 % über der maximalen Säurefreisetzung aus 3-HB-Oligomeren.

PhaZRr war in der Lage, auch zyklisches 3-HB-Pentamer und 3-HB-Hexamer mit über der Rate für linearisiertes Hexamer und der Spontanhydrolyse des Oligolides ( $33$  und  $42 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Polymer}^{-1}$ ) liegender Aktivität zu spalten. Dies lieferte einen weiteren Hinweis auf eine signifikante *endo*-hydrolytische Aktivität des Enzyms. Im Gegensatz zu linearem Oligomer, welches aufgrund der Hydroxyl- und Carbonsäurereste eine polare Kette darstellte, stellte das hydrophobere Oligolid offenbar ein besseres Substrat dar.

Syndiotaktisches Oktamer wurde nicht abgebaut. Während die vollgeschützten all-*R*-3-HB-Tetramere hydrolysiert wurde, war PhaZRr mit dem ebenfalls Schutzgruppen-tragenden all-*S*-Tetramer vollständig inaktiv. Die Spezifität der Hydrolyse schien, wie für alle getesteten extrazellulären Depolymerasen aus *P. lemoignei*, ausschließlich auf *R-R*-Bindungen beschränkt (s. hierzu auch 3.7.6.3.; Tab. 15).

Die Spaltung von Bn-R4-*t*-But und eine Hydrolyse von an den Hydroxyl- oder Carboxylgruppen *S*-konfigurierten Oktameren deutete auf einen *endo*-Hydrolysemechanismus. Mit zunehmender Zahl der *S*-Untereinheiten sank die Säurefreisetzung durch PhaZRr und im Produktspektrum einer HPLC-Analyse der zuvor durch schonende Methylierung mittels Diazomethan derivatisierten Hydrolyseprodukte (2.11.3.) fanden sich gegen Ende der Abbauxperimente stets deutliche Signale für  $[n^*S+1]$  – Oligomere (Abb. 78). Offenbar konnte die *R-S*-konfigurierte Bindung von PhaZRr nicht gespalten werden.

Strukturformel	Konfiguration	Abkürzung
	<b>RRRRRSSS</b>	<b>R5 S3</b>
	<b>SSRRRRRR</b>	<b>S3 R5</b>
	<b>RRRRRSSS</b>	<b>R6 S2</b>
	<b>SSRRRRRR</b>	<b>S2 R6</b>

Modifikationen:

$R^1 = R^2 = H$	entschützt
$R^1 = \text{Bn (Benzoyl-); } R^2 = H$	hydroxy-geschützt
$R^1 = H; R^2 = t\text{-But (tert.-Butyl-)}$	carboxy-geschützt
$R^1 = \text{Bn (Benzoyl-); } R^2 = t\text{-But (tert.-Butyl-)}$	vollgeschützt

**Abb. 77:** In Ergänzung zu den unter 3.7.6.3. für die Abbauntersuchungen mit PhaZRr eingesetzte 3-HB-Oligomere und verwendete Kurzbezeichnungen. Zur Struktur und Nomenklatur weiterer getesteter linearer und zyklischer Oligomere (Oligolide) siehe Abb. 31.

**Tab. 23:** Ergebnisse der Abbauntersuchungen mit 3-HB-Oligomeren durch PhaZRr.

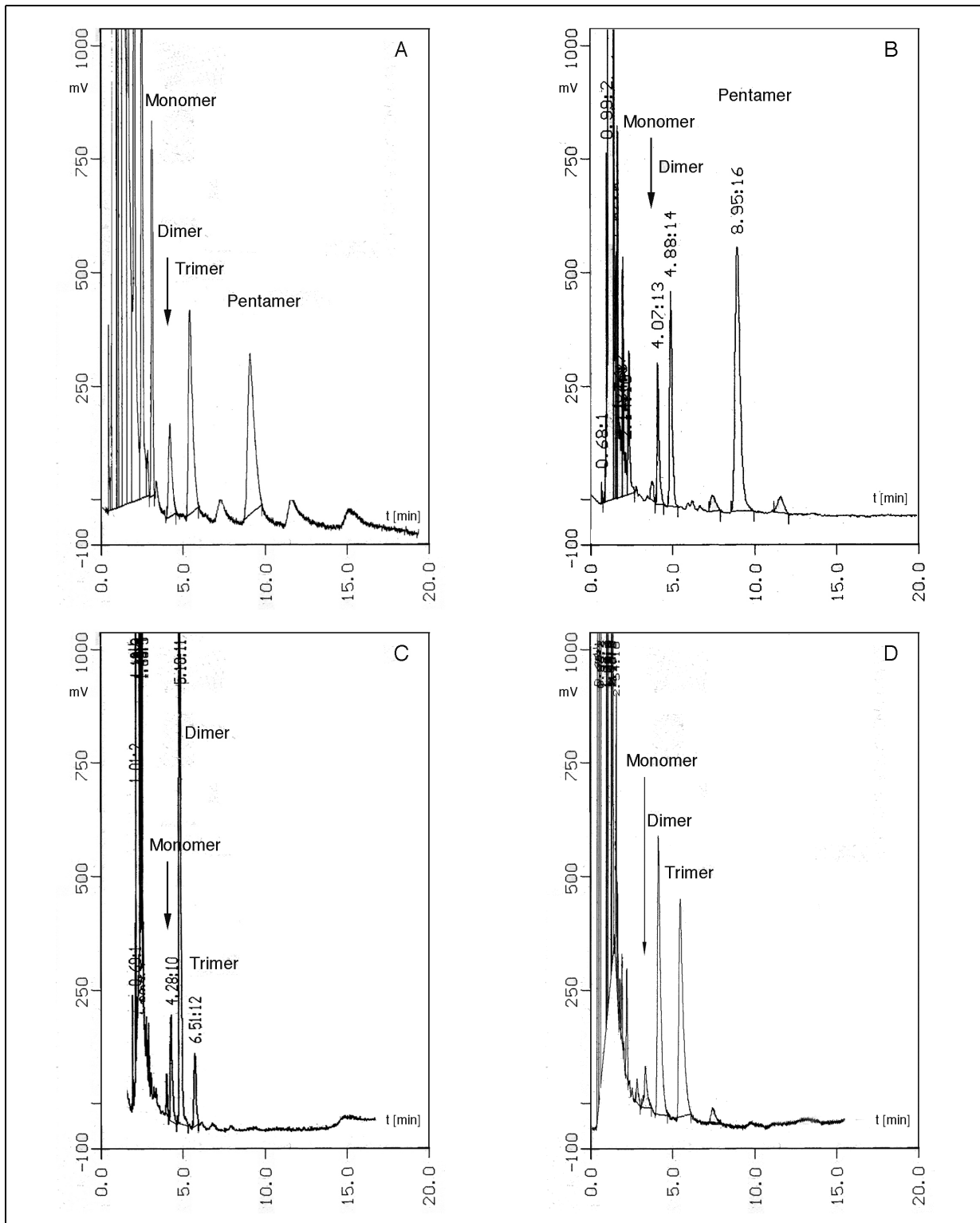
<b>3-HB Oligomere</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
R2	0	< 0,01	keine Hydrolyseprodukte nachweisbar
R3	0,7	340	Monomer, Dimer
R4	1,1	1430	Dimer, (Spuren Monomer und Trimer)
R5	1,3	1970	Dimer, Trimer (Spuren Monomer)
R6	1,8	1220	Dimer, Trimer, (Spuren Tetramer)
R8	3,1	930	Dimer, Trimer (Spuren Monomer)
R4S4		++*	Monomer, Dimer, Trimer, Pentamer
S4R4		++*	Monomer, Dimer, Pentamer
R5S3		++*	Dimer, Trimer, Tetramer (Spuren Monomer)
S3R5		++*	Dimer, Trimer, Tetramer (Spuren Monomer, Pentamer)
R6S2		++*	Dimer, Trimer, (Spuren Monomer, Tetramer)
S2R6		++*	Dimer, Trimer, Tetramer (Spuren Monomer,)
R7S1		++*	Dimer, Trimer, (Spuren Monomer, Tetramer)
S1R7		++*	Dimer, Trimer, Tetramer, (Spuren Monomer)
[RS]4		< 0,01	keine Hydrolyseprodukte nachweisbar
S4		< 0,01	keine Hydrolyseprodukte nachweisbar
Bn-R4- <i>t</i> -But (vollgeschützt)		1390	n.b.
Bn-S4- <i>t</i> -But (vollgeschützt)		< 0,01	n.b.
<b>zyklische Oligomere (Oligolide)</b>			
oR1S3		< 0,01	keine Hydrolyseprodukte nachweisbar
oR5		2300	Dimer, Trimer
oR6		1840	Dimer, Trimer, (Spuren Monomer, Tetramer)
<b>nPHB</b> (Trypsinaktivierung)		3100	Monomer, Dimer, Trimer

**A:** Äquivalente gespaltene Esterbindungen nach 24 h Inkubation. Für die Endpunktbestimmung wurden die Ansätze nach 2 h dem Titrinstaten entnommen und die nach erneutem Enzymzusatz bei weiterer Inkubation gebildeten Säuren in 5 h-Intervallen bis  $t = 24$  h nachtitriert.

**B:** Im Titrinstaten (2.10.1.5.) bei pH 7,5 anhand der freigesetzten Säureäquivalente nach Abzug der Spontanhydrolyse bestimmte Abbauraten [ $1 \text{ U mg}^{-1} = 1 \mu\text{mol Säure min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ ].

\* Endpunktbestimmungen zur Untersuchung der Produktspektren [++ > 1000 U/mg; + > 100 U/mg]

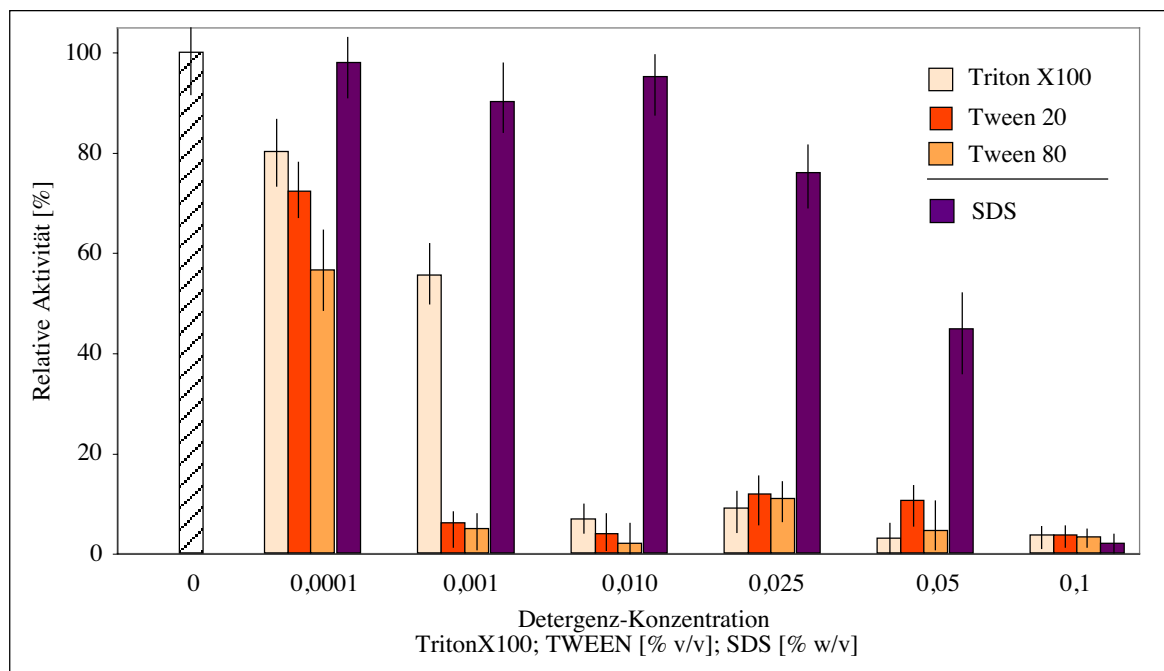
**C:** Produktanalyse mittels HPLC an Normalphasen-Silicagel (Lichrosorb Si-60, 250 x 4 mm, 7  $\mu\text{m}$ ) nach 2.11.3.



**Abb. 78:** Produktspektren der PhaZRr-abhängigen Hydrolyse linearer 3-HB-Oligomerester [R4S4 (A); S4R4, (B); R8, (D)] und nPHB (C; Trypsin/Ovomucoid-Vorbehandlung nach 2.10.1.3.) aus rekombinanten *E. coli* (*phaCABP*) nach 24 h Verdau im Titrationsexperiment (s. 2.10.1.5.). Die entstandenen Oligomersäuren wurden methyliert und die Methylester an Normalphasen-Kieselgel-HPLC getrennt (Lichrosorb Si-60, 250 x 4 mm, 7  $\mu$ m, s. 2.11.3). Gezeigt ist die Absorption bei 214 nm in Abhängigkeit vom Elutionszeitvolumen. Die Elution erfolgte isokratisch mit n-Hexan/2-Propanol (96:4; v/v) bei einem Fluß von 3 ml/min. Neben deutlich erkennbaren Peaks für 3-HB-Mono; Di- und Trimer ist in (A) und (B) ein signifikanter Peak für 3-HB-Pentamer erkennbar. Die Zuordnung der Peaks der 3-HB-Oligomere erfolgte anhand der jeweils mit Reinsubstanz bestimmten Retentionszeit.

### 3.11.6.3. Einfluß von Detergentien auf die hydrolytischen Aktivitäten von PhaZRr

Gegenüber ionischen (SDS) und nichtionische Detergentien (Tween20, Tween80, TritonX100) erwies sich PhaZRr im Gegensatz zu PhaZ7 als äußerst sensitiv. Die nPHB-Hydrolyse sank bereits in Gegenwart von 0,001 % (v/v) Tween oder TritonX100 um > 95 % bzw. 45 %. Auch in Gegenwart von SDS als ionischem Detergenz wurde ab einer Konzentration von 0,1 % (w/v) die Hydrolyse der Polymergranula vollständig gehemmt (Abb. 79). Zugabe von Natriumcholat bis 50 mM führte zu keiner signifikanten Änderung der nPHB-Hydrolyseraten.



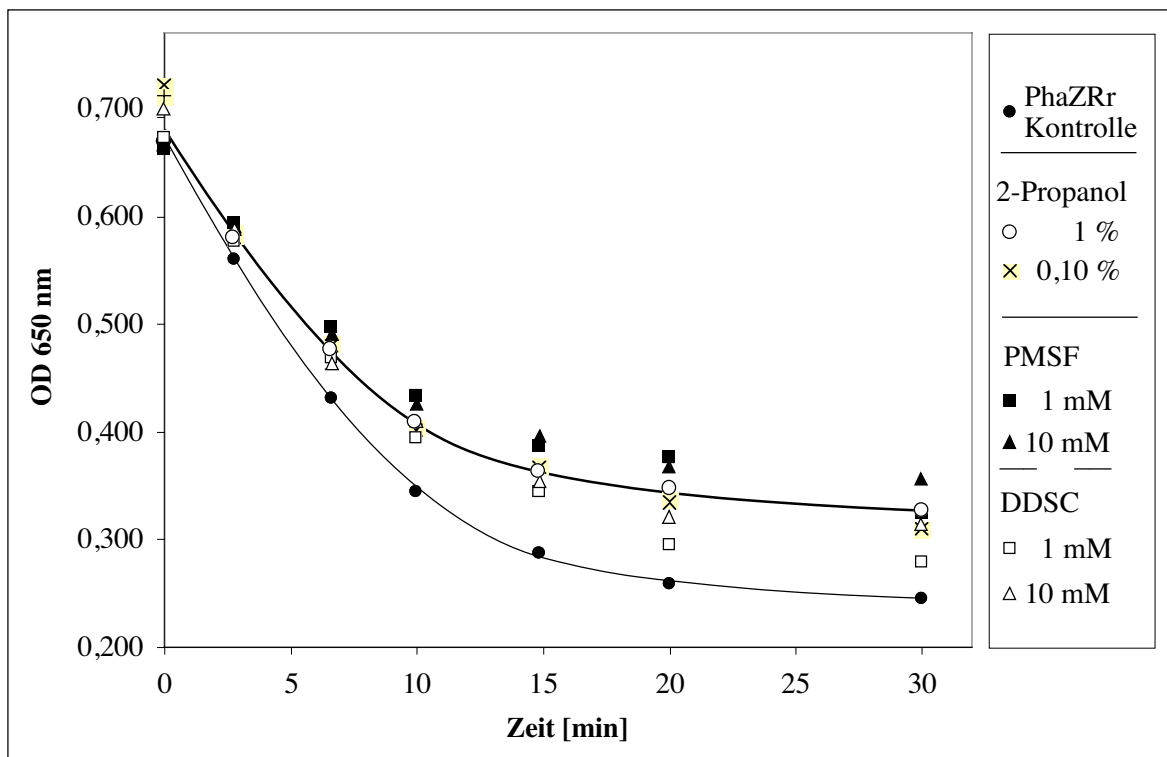
**Abb. 79:** Einfluß von Detergentien auf die nPHB Depolymeraseaktivität von PhaZRr. Die Werte wurden im turbidimetrischen Test nach 2.10.1.3. bestimmt (100 % = 178 mg PHB/min\*mg Protein). Für die gezeigten Experimente wurden die Granula 10 min mit Trypsin vorbehandelt, die Aktivierung durch Ovomuroid gestoppt und Detergenz der entsprechenden Konzentration zugesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl PhaZRr gestartet.

Möglicherweise beeinflussten Detergentien im Falle der Hydrolyse nativer PHB-Granula durch PhaZRr die Substratverfügbarkeit, über eine Veränderung/Störung der Beschaffenheit der Granulahülle. Die beobachteten Hemmeffekte waren unabhängig von der Art der Aktivierung der Polymergranula und traten auch bei Einsatz der Aktivatorkomponente auf. Ein signifikanter Einfluß auf die Hydrolyse der unter 3.11.6.2. als Substrat getesteten löslichen PHB-Oligomere konnte nicht beobachtet werden.

### 3.11.6.4. Hemmung der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase-Aktivität von PhaZRr durch Esterasehemmstoffe und Einfluß redoxaktiver Substanzen

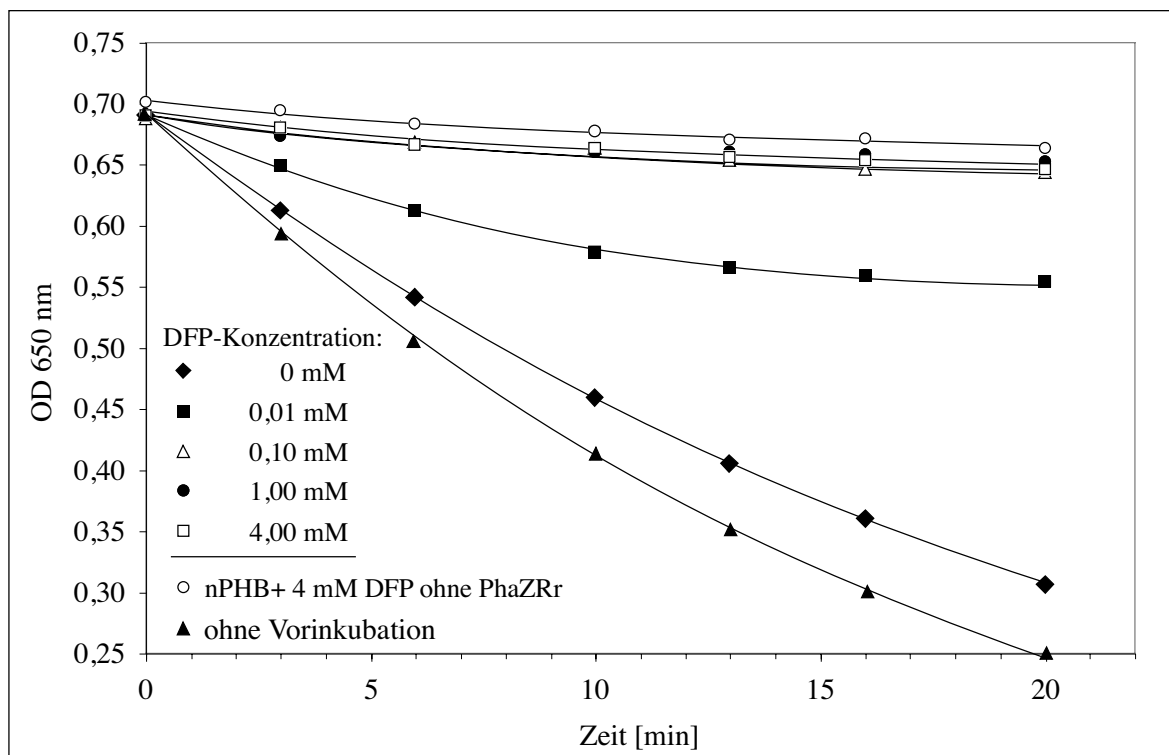
Wie im Falle der extrazellulären nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei* wurde für PhaZRr aus *R. rubrum* der Esterspaltungsmechanismus der Serin-Hydrolasen angenommen (PERSSON et al., 1989; OLLIS et al., 1992; JAEGER et al., 1994, EGGERT et al., 2000) angenommen. Für einen

experimentellen Nachweis wurden Hemmtests mit Serin-Hydrolase-Inhibitoren durchgeführt. Weder Dodecansulfonylchlorid (DDSC), dessen inhibitorische Wirkung für PhaZ5 aus *P. lemoignei* (BRIESE et al., 1994b) und Lipasen (GROCHULSKI et al., 1994) beschrieben war, noch das als Serinprotease-Hemmstoff bekannte Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) führten in Konzentrationen unter 1 mM zu signifikanten Hemmefekten. Die im Vergleich zu unbehandeltem Enzym gefundene Inaktivierung war, wie in Abb. 80 ersichtlich, überwiegend auf eine die nPHB-Hydrolyse verlangsamende Wirkung des Lösungsmittels Isopropanol zurückzuführen. Wurden 10 mM Inhibitor eingesetzt, lag die verbliebene nachweisbare Depolymeraseaktivität noch immer über 89 % (PMSF) bzw. 98 % (DDSC).



**Abb. 80:** Einfluß der Serin-Hydrolase-Inhibitoren PMSF und DDSC auf die Aktivität von PhaZRr. 20 µl Enzym (25 ng) wurden mit Tris-HCl 250 mM und 10 bzw. 20 µl einer konzentrierten Hemmstofflösung verdünnt (Endvolumen 100 µl) und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die verbliebene nPHB-Hydrolyseaktivität wurde mittels turbidimetrischer Tests unter Verwendung Trypsin-behandelter (= aktivierter) nPHB-Granula im 2 ml Reaktionsansatz ermittelt (2.10.1.3.). Zur Überprüfung der Wirkung des als Lösungsmittel eingesetzten Isopropanols wurden entsprechende Kontrollen mitgeführt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde als weiteres Substratanalogon, Diisopropylfluorophosphat (DFP), hinsichtlich einer Wirkung auf PhaZRr getestet. Bereits in Konzentrationen von 0,01 mM war eine deutliche irreversible Hemmung der nPHB-Depolymeraseaktivität zu beobachten (Abb. 81). Die halbmaximale effektive Hemmkonzentration lag bei 97 µM. DFP lag bei dieser Konzentration jedoch in deutlichem molaren Überschuß zum Enzym vor, was auf eine unter den Versuchsbedingungen relativ schlechte Zugänglichkeit des postulierten katalytisch aktiven Serins für den wasserlöslichen Inhibitor hinwies. Wurde DFP (in Puffer gelöst) zur laufenden nPHB-Hydrolysereaktion zugegeben, konnten im beschriebenen Konzentrationsbereich keine signifikanten Wirkungen auf die Hydrolyserate beobachtet werden.



**Abb. 81:** Einfluß des Serin-Hydrolase-Inhibitors DFP auf die Aktivität von PhaZRr. 20  $\mu$ l Enzym (25 ng) wurden mit 70  $\mu$ l Tris-HCl 250 mM und 10  $\mu$ l einer jeweils zehnfach konzentrierten Hemmstofflösung vorverdünnt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die verbliebene nPHB-Hydrolyseaktivität wurde durch turbidimetrischen Test mit durch Trypsinbehandlung aktivierte nPHB-Granula in 2 ml Reaktionsansatz ermittelt (2.10.1.3.). Neben Kontrollen ohne Enzym mit nPHB in Gegenwart des Hemmstoffes wurden, zur Überprüfung der Stabilität des Enzyms, Ansätze mit PhaZRr mit und ohne 10-minütige Vorinkubation der Verdünnung bei Raumtemperatur mitgeführt.

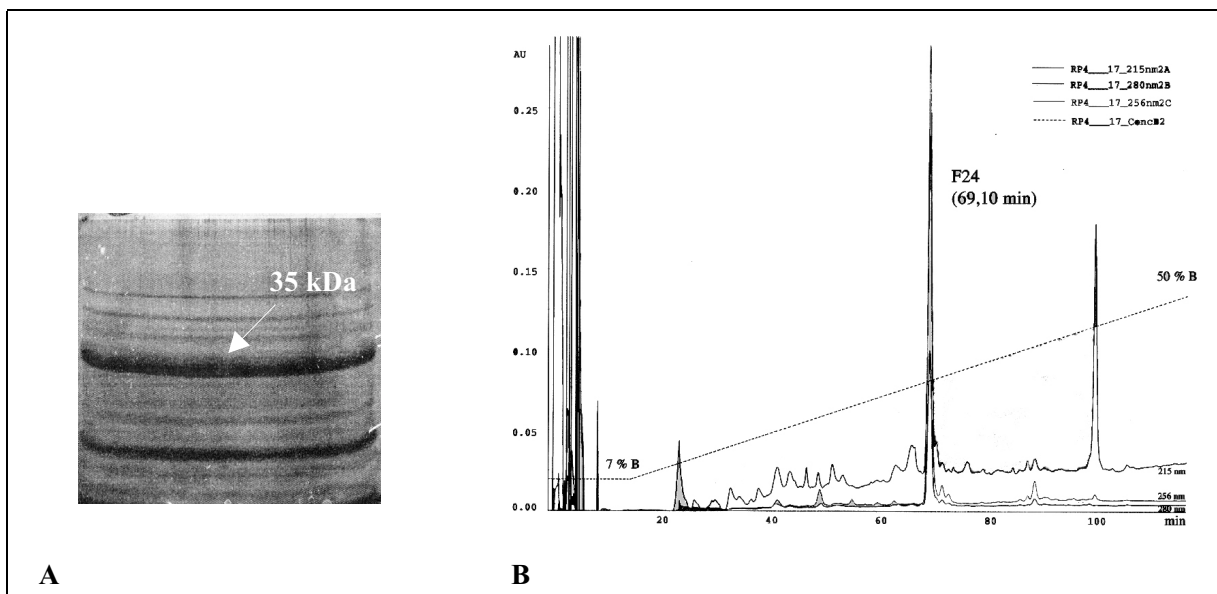
Zur Detektion anderer für die katalytische Funktion möglicherweise essentieller Gruppen, wurde PhaZRr mit weiteren Agentien versetzt, bis zu 10 min bei 21°C inkubiert und anschließend die nPHB-Hydrolyseaktivität nach 2.10.1.3. getestet. Um eine Beteiligung von Cysteinresten an einer möglichen Stabilisierung des Enzyms über Disulfidbrücken zu prüfen, wurden bis zu 4 mM DTT (0,4 mM Endkonzentration im anschließenden Trübungstest), 4 mM DTE oder 2-Mercaptoethanol (Endkonzentration 1 mM) als Reduktionsmittel zugesetzt. Unter diesen Bedingungen schien PhaZRr vollständig inaktiviert zu werden. Ellman-Reagenz (Dithiodinitrobenzoat, DTNB) führte bei Einsatz Hemmer-äquimolarer Endkonzentrationen nur zu einer geringfügigen Reaktivierung (17 %).

Kaliumcyanid und Natriumazid ließen in Konzentrationen bis 10 mM keine Hemmwirkung auf die nPHB-Depolymeraseaktivität erkennen, so daß eine direkte Beteiligung von Metallionen an der Katalyse offenbar auszuschließen war. *p*-Hydroxy-Mercuribenzoat als potentieller Inhibitor funktioneller -SH Gruppen zeigte bis zu einer Konzentration von 4 mM keine über 10 % Inhibierung hinausreichenden Hemmeffekte. Die gefundenen Stabilitäts-/Reaktivitätsmuster wiesen auf eine mögliche Beteiligung von Sulfhydrylgruppen an der Stabilisierung nativen Enzyms hin. Metallionen waren offenbar an der unmittelbaren Katalyse der Esterspaltung durch PhaZRr nicht beteiligt. Das Enzym wurde aufgrund der irreversiblen Hemmung durch DFP als Serin-Hydrolase klassifiziert, deren Vertreter ein hochreaktives Serin in charakteristischen katalytischen Zentrum besitzen.

### 3.12. Gewinnung von Aminosäuresequenzen der nPHA Depolymerase aus *R. rubrum*

#### 3.12.1. Bestimmung des N-Terminus und tryptischer Verdau von PhaZRr

Für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* wurden  $\approx 100 \mu\text{g}$  angereichertes Protein im 14 %-igen SDS-Polyacrylamidgel der Elektrophorese unterzogen (2.8.1.) und die nach Western-Blot (2.9.1.) durch Coomassiefärbung sichtbare dominante Bande bei 35 kDa separiert. Nach 30 durchgeführten Abbauzyklen in der Edman-Sequenzierung konnten 25 Aminosäuren identifiziert werden (Tab. 24). Parallel wurden  $\approx 125 \mu\text{g}$  Protein nach Trennung in der SDS-PAGE und Zinkfärbung direkt im Gel einem Verdau mit Trypsin unterzogen (s. 2.8.5.; 2.15.3.). Die Reinigung der gewonnenen Fragmente erfolgte nach 2.6.10. mit Hilfe der RP-HPLC (Abb. 82 B). Das Chromatogramm zeigte bei 24 % Elutionspuffer B nach 69,1 min einen dominanten UV-Peak. Die zugehörige Fraktion wies im MALDI-TOF-Massenspektrum eine Hauptmasse bei 1694 Dalton auf und konnte bis zur Position 14 sequenziert werden (Tab. 24).



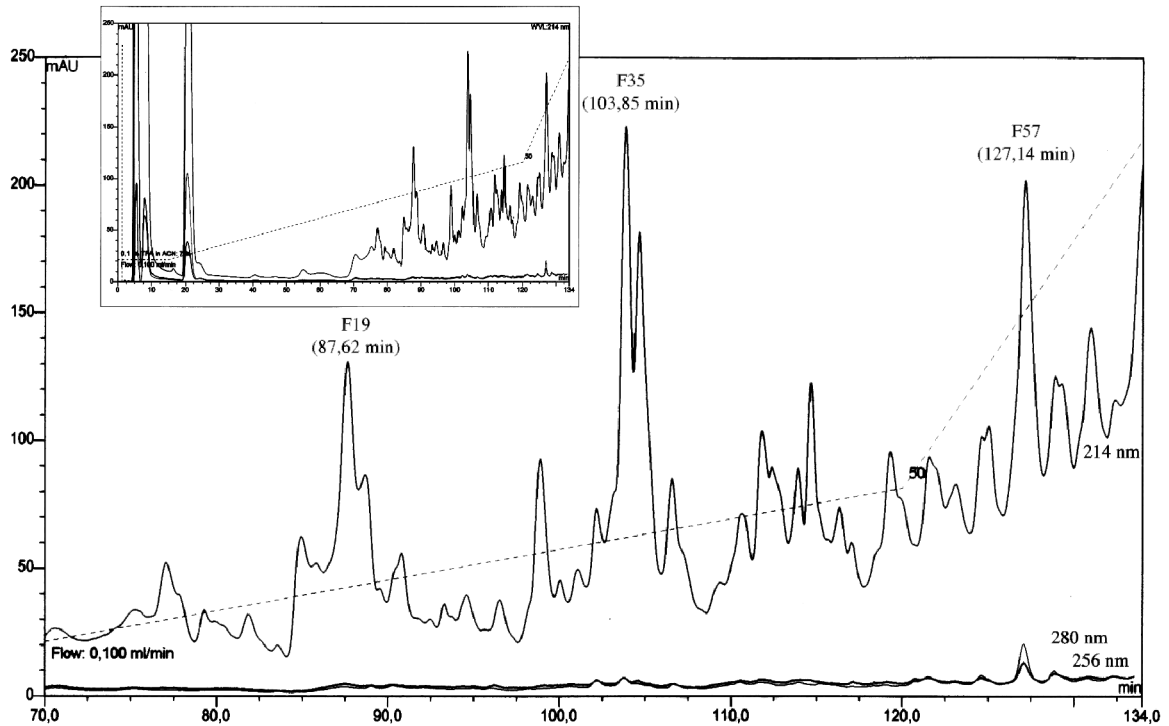
**Abb. 82:** Gewinnung interner Peptide der nPHA-Depolymerase aus *Rhodospirillum rubrum* durch tryptischen Verdau im Gel. (A) Präparatives 12,5 % SDS Polyacrylamidgel einer partiell gereinigten Fraktion von PhaZRr (125  $\mu\text{g}$  Protein). Das Gel wurde nach 2.8.5. negativ gefärbt. (B) HPLC-Elutionsprofil interner Peptide der nPHA-Depolymerase aus *R. rubrum* an Reverse-Phase C18 Hypersil ODS nach tryptischem „In-Gel“-Verdau. Puffer A bestand aus 0,1 % (v/v) TFA in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ . Nach einem 15-minütigen isokratischen Schritt bei 7 % (v/v) Puffer B [0,085 % (v/v) TFA in Acetonitril] und einer Flußrate von 0,1 ml/min erfolgte die Elution durch einen linearen Gradienten auf 50 % B in 105 min. Fraktion 24 wurde N-terminal sequenziert.

#### 3.12.2. Proteolytischer Verdau von PhaZRr mit Lys-C

Neben Trypsin wurde bei Verfügbarkeit gereinigter PhaZRr zum Verdau Endoproteinase Lys-C eingesetzt (s. 2.15.2.). Die Spaltung erfolgte in diesem Falle C-terminal von Lysin. Der Verdau erbrachte nach 12 h ein reproduzierbares Ergebnis, und die Fragmente wurden nach 2.6.10. mittels HPLC an Reverse-Phase C18 Hypersil ODS-Material getrennt. Die Retention der Peptide aus PhaZRr (Abb. 83) war im Vergleich zum tryptischen Verdau von PhaZ7 (s. 3.6.2.; Abb. 21) deutlich hin zu



höheren Retentionszeiten/Acetonitrilkonzentrationen verschoben, was auf die Entstehung größerer relativ hydrophober Peptide hinwies. Mit den Fraktionen F19, F35 und F57 wurden dominante Peaks ausgewählt und die Peptide dem Edman-Abbau unterzogen. Im Falle von F35 und F57 wurden jeweils Doppelsequenzen erhalten, welche aufgrund starker Intensitätsunterschiede der zugehörigen Aminosäurepeaks jedoch gut voneinander unterscheidbar waren (Tab. 24).



**Abb. 83:** Elutionsprofil interner Peptide der nPHA-Depolymerase PhaZRr aus *R. rubrum* (125 µg) nach Lys-C-Verdau [Puffer A: 0,1 % (v/v) TFA in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>; Puffer B: 0,085 % (v/v) TFA in Acetonitril; Flußrate 0,1 ml/min] (Ausschnitt 70 bis 134 min). Das inliegende Fenster zeigt das komplette Chromatogramm. Es wurden die Absorption (214 nm, 256 nm, 280 nm) und der Gradientenverlauf (unterbrochene Linie) aufgezeichnet. Später im Edman-Abbau N-terminal sequenzierte Peptidpeaks sind mit Fraktionsnummer und Retentionszeit gekennzeichnet.

**Tab. 24:** Im Edman-Abbau bestimmte N-terminale Aminosäuresequenz von *PhaZRr* sowie Sequenzen interner, durch chemische Spaltung und Proteaseverdau erhaltener Peptide.

Fragment	Aminosäuresequenz
<b>N-Terminus des reifen Proteins</b>	DSL <u>PKL</u> AIDADHV ( <b>T</b> /G) VSGI (X) SGA ( <b>Y</b> /T) ( <b>M</b> /A) ANQF (X) V
<b>Trypsin-Verdau (im Gel)</b>	
F24	( <b>V</b> /S) LYGP ( <b>S</b> /I) LAP ( <b>P</b> /N) A ( <b>P</b> /F) ( <b>V</b> /E) L
<b>Lys-C-Verdau</b>	
F19	[ K] ( <b>Q</b> /I/A/V) S ( <b>D</b> /A) ( <b>Q</b> /R) ( <b>V</b> /N) ( <b>L</b> /Q) ( <b>G</b> /L) SAE[ K]
F35 Hauptsequenz	[ K] <u>L</u> AIDADHV ( <b>T</b> /G) (R/ <b>V</b> ) (X) G
F35 Nebensequenz	[ K] <u>AGHA</u> FLT ( <b>P</b> /V) D ( <b>R</b> /V) G ( <b>N</b> /G) AACS (X) EK
F57 Hauptsequenz	[ K] SPFFNA (E/C) RYDQAE (X) I
F57 Nebensequenz	[ K] FWDLAGY

Aminosäuresequenzen, die zur Ableitung von degenerierten Oligonukleotidprimern verwendet wurden, sind durch Unterstreichung hervorgehoben. Nicht eindeutig bestimmte Aminosäuren sind durch (X) oder die Schreibweise in runder Klammer markiert. Kursivgedruckte Aminosäuren stellen postulierte Reste im Falle einer vollständigen Spaltung mit Lys-C dar. Aminosäuren im Fettdruck dominierten im Chromatogramm nach Edman-Abbau.

### 3.12.3. Gewinnung spezifischer Oligonukleotidsonden

Zur Identifizierung potentieller *phaZRr*-Klone vorangereicherter partieller Genbanken in *E. coli* DH5 $\alpha$  durch Koloniehybridisierung wurden, ausgehend von den unter 3.12.2. (Tab. 24) erhaltenen Proteinsequenzen, degenerierte Primer für eine PCR-Amplifikation interner Abschnitte des Strukturgenes der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* abgeleitet (Tab. 25; zum Primerentwurf s. 2.17.16.). Diese dienten der Herstellung einer spezifischen Oligonukleotidsonde.

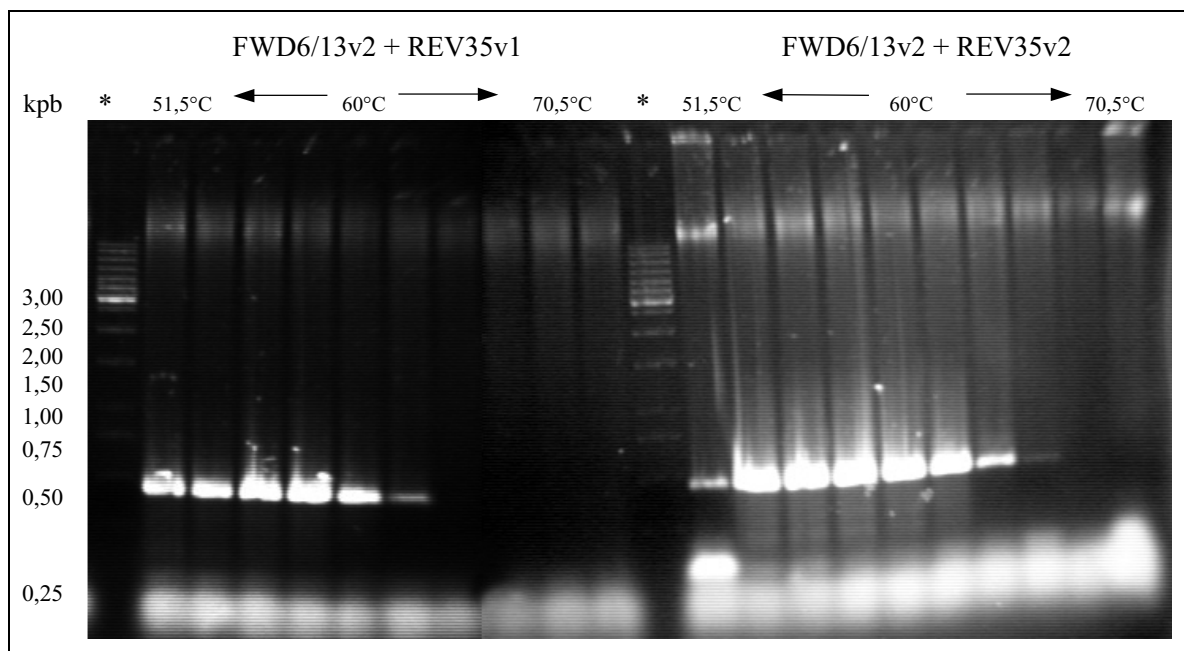
**Tab. 25:** Aus den Aminosäuresequenzen ausgewählter Peptide abgeleitete degenerierte PCR-Primer zur Gewinnung eines Templates für die Herstellung homologer Nukleotidsonden.

<b>N-Terminus des Proteins (Pos. 6 bis 13)</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>I</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>D</b>	<b>H</b>	<b>V</b>
Primer FWD 6/13v1	5' - TTR	GCN	ATN	GAY	GCI	GAY	GAY	GT -3'
Primer FWD 6/13v2	5' - CTN	GCN	ATY	GAY	GCI	GAY	GAY	GT -3'
<b>Peptid F35 Nebensequenz nach Lys-C-Verdau (Pos. 1 bis 8)</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>A</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	<b>T</b>
Primer REV35v1	3' - TTY	CGI	CCN	GTR	CGN	AAR	AAY	TG -5'
Primer REV35v2	3' - TTY	CGI	CCN	GTR	CGN	AAR	GAN	TG -5'

Legende:

D: A+T+G; R: A+G; N: A+C+T+G; Y: C+T; I: Deoxyinosin

In der Temperaturgradienten-PCR (Annealingtemperaturen von 51,5 bis 70,5°C) mit nach 2.17.2. isolierter genomischer DNA aus *R. rubrum* S1 konnte bei Verwendung von jeweils *Taq*- oder *Pfx*-Polymerase mit keinem Primerpaar eine Bildung stringenter Produkte beobachtet werden. Erst der Einsatz einer Kombination aus 15 U/ml *Pfx*- und 30 U/ml *Taq*-Polymerase bei Annealingtemperaturen oberhalb 53°C führte zur Amplifikation eines spezifischen Produktes von 461 bp Länge. Ausbeute und Reinheit waren für die Primer-Anlagerungstemperaturen von 53 bis 62°C optimal. Das 461 bp Produkt diente nach Elektroelution aus dem Agarosegel (2.17.6.2.) der Herstellung DIG-Oxigenin-11-dUTP markierte Sonden nach 2.17.9.

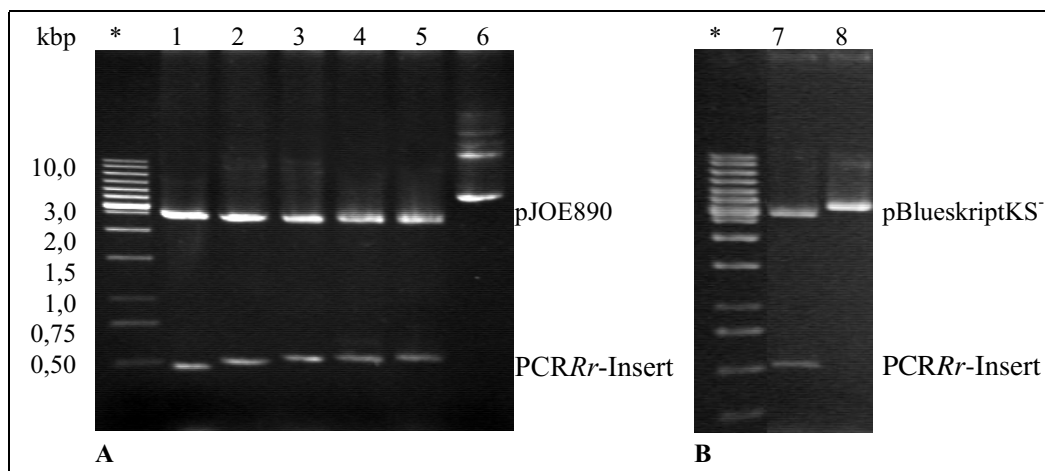


**Abb. 84:** Temperaturgradienten-PCR mit aus den Sequenzen interner Peptide von PhaZRr abgeleiteten degenerierten Primern (FWD6/13v2 + REV35v1; FWD6/13v2 + REV35v2). Die Ansätze enthielten 1 µg Template, 100 pmol Primer, 0,5 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl *Pfx*-PCR-Puffer (10x), 3 µl je 2,5 mM dNTP, 0,75 U *Taq*- sowie 0,38 U *Pfx*-Polymerase und wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 25 µl aufgefüllt. Nach dem initialen Denaturieren der DNA (3 min 95°C) erfolgte das Anlagern der Primer in einem Temperaturgradienten (1 min bei 51,5; 52,9; 55,0; 57,4; 59,8; 62,2; 64,6; 66,9; 69,1; 70,5°C) und die Amplifikation für 2 min bei 69°C. Anschließend wurde erneut 30 s bei 95°C denaturiert und der Zyklus insgesamt 30 mal wiederholt bevor die Reaktion durch abschließende Elongation bei 72°C und Abkühlen auf 4°C beendet wurde.

### 3.13. Klonierung des Genes der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum*

Die Verwendung von *Pfx*-Polymerase im PCR-Ansatz unter 3.12. ermöglichte die anschließende direkte „blunt end“-Klonierung des Fragmentes [FWD6/13v2+REV35v2] parallel in *EcoRV* geschnittenen pBlueskript KS<sup>-</sup> sowie zu Vergleichszwecken in pJOE890-Vektor (freundlicherweise von J. ALTENBUCHNER, Universität Stuttgart, zur Verfügung gestellt). Das Plasmid pJOE890 erwies sich aufgrund seiner besonderen Eigenschaften als hervorragend geeignet für die rasche Klonierung sowohl genomischer Fragmente als auch von PCR-Produkten (Abb. 85 A). Es war einer Replikation nur zugänglich, wenn ein DNA-Fragment in die Polylinkerregion inseriert wurde und es bedurfte keiner Expression eines Reportergenes wie etwa im Falle des *lacZ'* im pBlueskript-System unter Kontrolle des *lac*-Promotors zur Identifikation von Transkonjuganten. Fehlte im Falle des pJOE890-Vektors ein Insert, d.h. kam es während einer Ligation zur Religation des Vektors (oder unterschritt die Insertgröße etwa 50 bp), dann bildete die zyklisierte Form Sekundärstrukturen aus, welche eine Replikation unterbanden. Die Selektion der Transkonjuganten erfolgte durch die Plasmid-kodierte Ampicillinresistenz. Der Nachweis positiver Klone wurde durch Koloniehybridisierung (s. 2.17.12.) und anschließenden Kontrollverdau mit *HindIII*-, *SalI*- und *PstI*-Restriktionsendonuklease erbracht. Für den ersten Klonierungsschritt eines Genes aus partiellen Genbanken war das System herkömmlichen pBlueskriptKS/SK-Vektoren hinsichtlich Transformationseffizienz und der entsprechenden Ausbeute positiver Klone mit *E. coli* DH5 $\alpha$  deutlich überlegen und schien infolge des Fehlens eines Promotors in unmittelbarer Nähe zur Multiplekloningsite als reiner Klonierungsvektor auch für die primäre Klonierung potentiell toxischer Gene in *E. coli* geeignet, was insbesondere mit Rücksicht auf die unter 3.8.2. dargestellten Probleme der Klonierung des *phaZ7*-kodierenden 3,6 kbp-*PstI*-Fragmentes aus *P. lemoignei* von Vorteil erschien. Der scheinbare Nachteil einer schlechteren Sequenzierbarkeit in pJOE890 und die daher notwendige anschließende Umklonierung in andere einer Sequenzierung besser zugängliche Vektorsysteme wurden durch die genannten Vorteile aufgewogen. Die sich (hinsichtlich *EcoRV*) in spiegelbildlicher Abfolge wiederholenden Schnittstellen des Polylinkers ermöglichten außerdem eine rasche Umklonierung. Die Abfolge der Schnittstellen wurde durch den in Abb. 85 dargestellten Restriktionsverdau des Klones K3pJOE890::*EcoRV*PCRRr bestätigt. Mit einem Standardligationsansatz (400 ng PCR-Produkt, 100 ng *EcoRV*-verdauter dephosphorylierter Vektor) nach 2.17.5.9. wurden nach Elektrotransformation 325 (pJOE890) bzw. 650 (pBlueskriptKS<sup>-</sup>) Transformanten pro 100  $\mu$ l Transformationsansatz erhalten. Von den 13 weißen Kolonien in Falle von pBluskriptKS<sup>-</sup> wurde für drei Klone durch Southern-Blot und Hybridisierung mit dem als Sonde eingesetzten PCR-Produkt (s. 3.12.3.) der Einbau des korrekten DNA-Fragmentes nachgewiesen. In pJOE890 hingegen fanden sich in der Koloniehybridisierung nur acht negative Klone. Von zehn exemplarisch durch *SalI*-, *PstI*- und *BamHI/HindIII*-Nukleaseverdau getesteten pJOE890::PCRRr-Klonen besaßen alle das Insert in der geforderten Größe. Wurde die Ligation mit

identischen DNA-Mengen in Gegenwart von *EcoRV* ("Restriktionsligation", 2.17.5.10.) durchgeführt, verdoppelte sich die Zahl positiver Klone für pJOE890 auf 648.

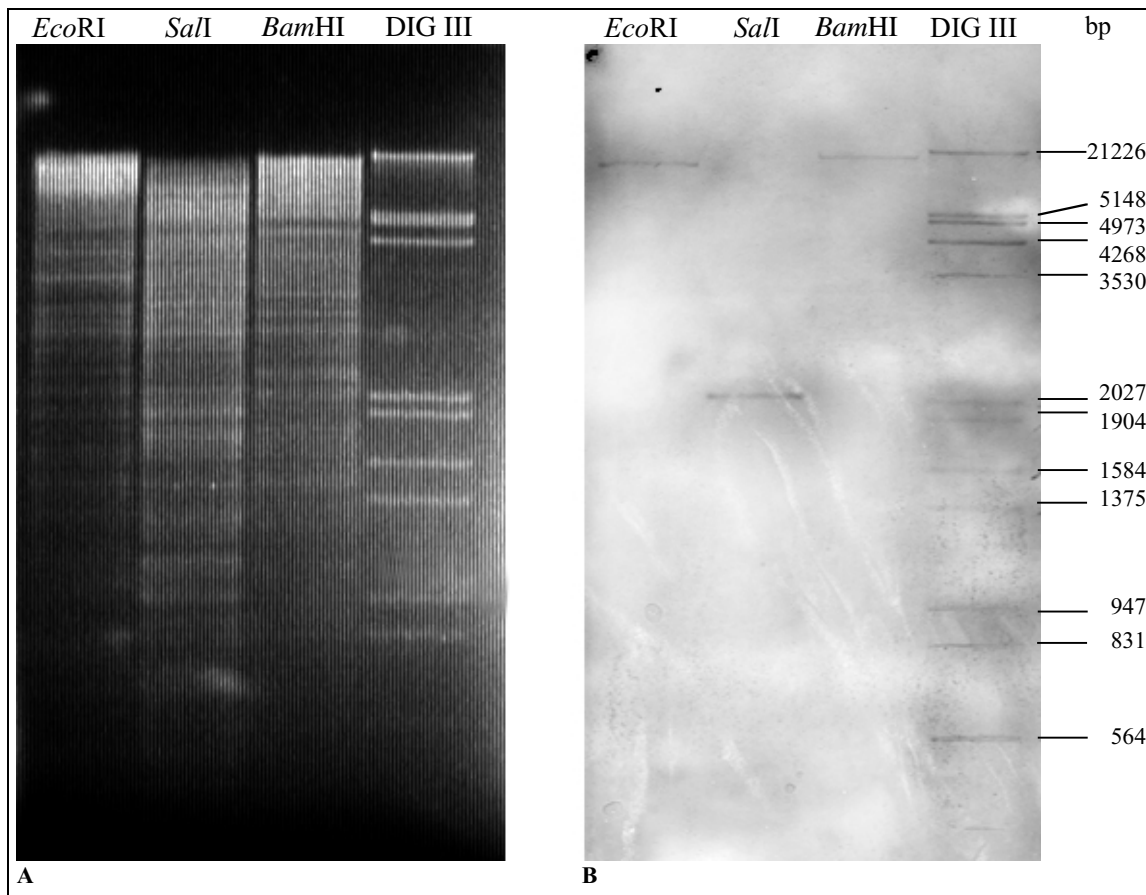


**Abb. 85:** Klonierung des PCR-Produktes [FWD6/13v2+REV35v2]. Kontrolle der positiven Klone K3pJOE890::PCRRr FWD6/13v2+REV35v2 (A) und K48pBKS<sup>+</sup>PCRRr (B) durch Spaltung mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen nach 2.17.5.1. und Fragmenttrennung durch Elektrophorese im 1 % (w/v) Agarosegel. Spuren: (A) 1:*EcoRI*, 2: *BamHI*, 3: *SalI*, 4: *PstI*, 5: *HindIII*, 6: K3pJOE890::PCRRr unverdaut, (B) 7: Doppelverdau *BamHI/HindIII*, 8: *PstI*, \* 1 kbp DNA-Ladder Standard (MBI Fermentas).

Um sicherzustellen, daß die Sequenzen des 461 bp Fragmentes und der hiervon abgeleiteten Sonde dem gesuchten Gen entsprachen, wurde die DNA-Sequenz des Klones K48pBKS<sup>+</sup>PCRRr durch Doppelstrangsequenzierung nach 2.17.19.1. bestimmt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte Übereinstimmung mit unter 3.12.2. (Tab. 24) ermittelten 25 Aminosäuren des N-Terminus und des überlappenden Fragmentes F35 (Hauptsequenz) sowie 18 Aminosäuren des internen Peptides F57 (Hauptsequenz), 20 Aminosäuren der F57 Nebensequenz und 14 Aminosäuren des tryptischen Fragmentes aus dem „Im Gel“-Verdau. Alle infolge der Verwendung von Lys-C-Protease postulierten Lysine konnten bestätigt werden. In der abgeleiteten Primärsequenz folgten F35 (Nebensequenz), F57 (Hauptsequenz) und das tryptische Fragment unmittelbar aufeinander und ermöglichten so die sichere Identifizierung eines 51 Aminosäuren langen Sequenzabschnittes. Das klonierte PCR-Produkt konnte offenbar eindeutig dem gesuchten Gen zugeordnet und als spezifische Sonde für die homologe Hybridisierung eingesetzt werden.

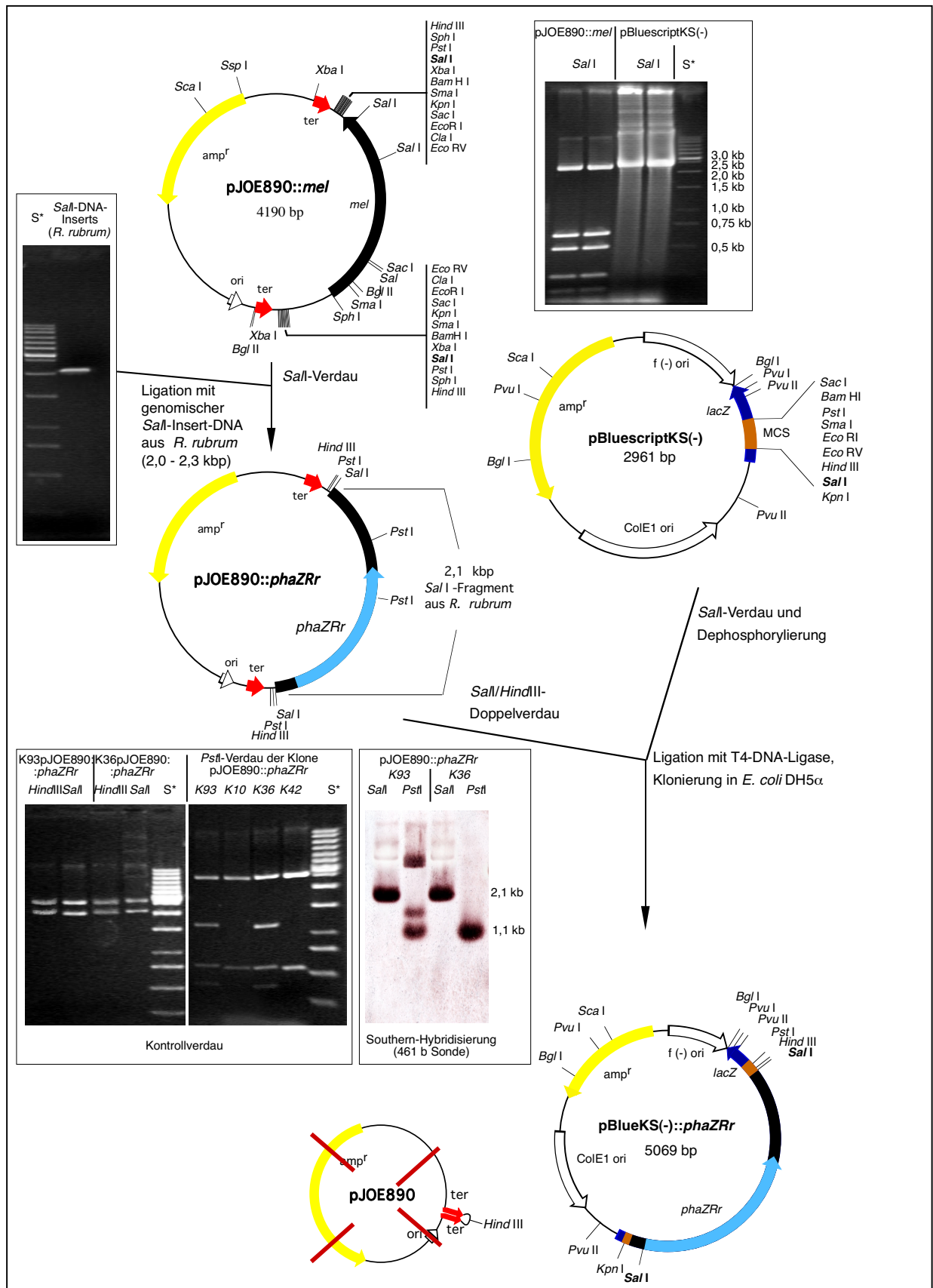
Für die Klonierung des vollständigen Genes der intrazellulären nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* sollte mit Hilfe des bereits beschriebenen Vektors pJOE890 eine partielle Genbank in *E. coli* DH5 $\alpha$  erstellt werden. Hierzu wurde mittels der für *R. rubrum* optimierten Methode (s. 2.17.2.2.) genomische DNA gewonnen und nach einem Verdau mit ausgewählten Restriktionsendonukleasen im 1 % (w/v) Agarosemaxigel aufgetrennt. Die Zuordnung der Depolymerase-homologen Fragmente erfolgte durch Hybridisierung mit der DIG-Oxigenin-11-dUTP markierte 461 bp Sonde bei 63°C (2.17.13.). Die aus dem Molekulargewicht des Proteins von 35274 $\pm$ 50 Dalton in der MALDI-MS zu erwartende Gengröße wurde in der Annahme, daß es sich um ein typisches intrazelluläres Enzym handelte auf 0,96 bis 1,0 kbp geschätzt. Während die detektierten 17 kbp *EcoRI*- und 19 kbp *BamHI*-Fragmente aufgrund ihrer Größe für eine Klonierung im beschriebenen System ungeeignet erschienen, bot sich

das durch *SalI*-Behandlung erhaltene stringent hybridisierende etwa 2100 Nukleotide große Fragment für die Klonierung an (Abb. 86).



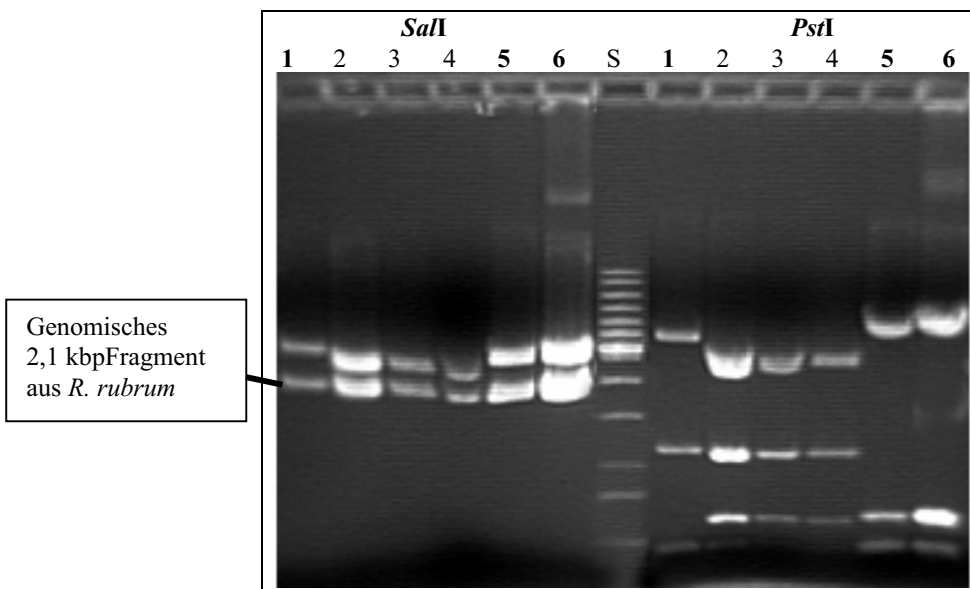
**Abb. 86:** Southern-Hybridisierung restriktionsverdauter Gesamt-DNA aus *R. rubrum*. (A) 1 %-iges Agarose-Maxigel nach Färbung mit Ethidiumbromid (2.17.5.6.). (B) Bei 64°C mit 461 bp DNA-Sonde [FWD6/13v2+REV35v2; s. 3.13.] hybridisierter Southern-Blot nach 2.17.13.

Die DNA-Fragmente zwischen 2,0 und 2,15 kbp wurden ausgeschnitten, nach Elektroelution (2.17.6.2.) im Dot-Blot (2.17.11.) durch Hybridisierung mit der 461 bp DNA-Sonde auf Vorhandensein des gesuchten Fragmentes überprüft und in *SalI*-verdauten sowie nach einer Dephosphorylierung mittels SAP (2.17.5.2.) ebenfalls durch Agarosegelelektrophorese und Elektroelution gereinigten pJOE890 ligiert (Abb. 87). Der verwendete Vektor trug primär zur Gewährleistung der Replikation das *EcoRV*-klonierte, für Tyrosinase (Monophenolmonooxygenase; *melC*) codierende DNA-Insert aus *Streptomyces antibioticus*. Dieses Insert besaß offenbar 3 interne *SalI*-Schnittstellen, so daß nach Restriktionsverdau neben dem Vektor (2,4 kbp) vier kleinere DNA-Banden aufgetrennt wurden. Nach der Elektrotransformation (2.17.8.5.) wurden pro 800 µl Transformationsansatz von 668 erhaltenen Transkonjuganten 49 in einer Koloniehybridisierung positiv getestet (7,4 %). 39 Klone zeigten nach einem Kontrollverdau mittels *PstI* ein charakteristisches Bandenmuster (350 bp, 550 bp, 1150 bp und die Vektorbande). Die Summe der Insertbanden entsprach der des gesuchten Fragmentes. 10 Klone besaßen nur ein 530 bp Insert und wurden verworfen.



**Abb. 87:** Klonierung des nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasegenes *phaZRr* aus *R. rubrum*. Die angewandte Strategie resultierte aus den Erfahrungen bei der Klonierung von *phaZ7* unter 3.8.2. Um die primäre Klonierung zu gewährleisten, wurde pJOE890 (J. Altenbuchner, unveröffentlicht) eingesetzt und anschließend das *phaZRr* tragende Insert mit flankierenden Regionen in pBluescriptKS- umklontiert. S\* 1 kb-DNA Ladder (MBI-Fermentas). Im Falle von K10 und K42 (*PstI*-Kontrollverdau) handelte es sich um negative Klone.

In einer Hybridisierung mit der 461 bp Sonde hybridisierte das etwa 1150 bp große *PstI*-Fragment sehr stringent, was vermuten ließ, daß ein wesentlicher Teil des gesuchten Strukturgenes in diesem Abschnitt lokalisiert sein sollte. K36pJOES*SalI*PhaZRr wurde ausgewählt und das 2,1 kbp Insert in pBlueskriptKS<sup>-</sup> umklontiert. Hierbei konnte die Eigenschaft von pJOE890, ohne Insert nicht zu replizieren genutzt werden. Da das gesuchte Fragment offenbar Schnittstellen für *PstI*, jedoch nicht für *HindIII* besaß, wurden 500 ng Plasmid mit *SalI* und *HindIII* im Doppelverdau geschnitten. Nach einer Abtrennung der Proteine und der generierten kurzen *HindIII/SalI*-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese und Elektroelution oder einem einfachen Säulchen-Reinigungsschritt (2.17.3., 2.17.6.), welcher sich als ausreichend erwies, konnte das 2,1 kbp Insert in *SalI*-verdauten dephosphorylierten pBlueskriptKS<sup>-</sup> kloniert werden. Die Verwendung des im Verlaufe der (schnelleren) Säulchenextraktion erhaltenen Gemisches aus pJOE890-*HindIII* und *SalI*-Insert hatte offenbar keinen signifikanten Einfluß auf die Ausbeute positiver Klone. Von 10 mittels *SalI*-Restriktionsverdau getesteten Klonen besaßen alle das gewünschte Fragment in der erwarteten Gesamtgröße von 2,1 kbp. Eine Lagekontrolle der Insert DNA durch *PstI*-Verdau und PCR (fragmentinterner Primer + T3-Primer oder T7-Primer) zeigte, daß K93pBlueKS<sup>-</sup>*SalI*PhaZRr, K367pBlueKS<sup>-</sup>*SalI*PhaZRr und K368pBlueKS<sup>-</sup>*SalI*PhaZRr offenbar die genomischen *SalI*-Fragmente aus *R. rubrum* in verschiedener Orientierung enthielten. Die Klone K93pBlueKS<sup>-</sup>*SalI*PhaZRr und K368pBlueKS<sup>-</sup>*SalI*PhaZRr wurden nachfolgend näher analysiert.



**Abb. 88:** Ergebnis des Restriktionsverdaus der isolierten Plasmide aus positiven Klonen in der Koloniehybridisierung mit 2,1 kbp DNA-Fragment aus *R. rubrum*. Spuren links des DNA-Standards (S 1 kbp DNA Ladder): vollständige Exzision der Inserts mittels *SalI*. Spuren rechts des Standards: Ermittlung der Insertorientierung durch Verdau mittels *PstI*. Spuren positiver Klone mit den erwarteten Fragmentgrößen (*SalI*: 2,1 und 2,9 kbp; *PstI*: 3,5 kbp, 1,2 kbp, 370 bp [Insert antiparallel zum *lacZ*-Promotor] bzw. 4,1 kbp, 606 bp, 372 bp bei paralleler Orientierung) wurden durch Fettdruck hervorgehoben. Bei K93pBlueKS<sup>-</sup>*SalI*PhaZR (Spur 1) und K368pBlueKS<sup>-</sup>*SalI*PhaZRr (Spur 6) handelte es sich um Klone mit entgegengesetzter Insertorientierung.



### 3.14. Die Sequenz der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZRr

Von den unter 3.13. erhaltenen Klonen der intrazellulären nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase wurde K93pBlueKS<sup>-</sup>*SalI*phaZRr und K368pBlueKS<sup>-</sup>*SalI*phaZRr zur vollständigen Sequenzbestimmung ausgewählt. Während der Sequenzierung kam es weitaus häufiger als mit *P. lemoignei*-DNA beobachtet zur vorzeitigen Verringerung der Signalintensitäten. Die durchschnittliche Leseweite lag bei nur 150 bis 200 bp mit Fehlerraten von bis zu 1,5 %. Eine Ursache bestand, wie unter Abb. 89 anhand der Gesamtsequenz erkennbar, im partiell sehr hohen GC -Gehalt des sequenzierten Abschnittes, welcher auch außerhalb des Strukturgenes noch bei 61,7 % lag. Außerdem traten gehäuft repetitive Sequenzbereiche und Regionen ausgeprägten G-Gehaltes auf. Zur Vermeidung von Kompressionen wurde 7-deaza-dGTP (c<sup>7</sup>dGTP) verwendet. Interessanterweise waren bereits Probleme bei der PCR-Amplifikation der Sondentemplates mit verschiedenen DNA-Polymerasen beobachtet worden (3.12.3.). Eine Anpassung der Sequenzierprotokolle war erforderlich und findet sich unter 2.17.19.1. Als vorteilhaft erwies sich die Verwendung linearisierter Plasmide. Wurde das 2112 bp Insert ausgeschnitten, mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt, elektroeluiert und mit internen Primern direkt sequenziert, konnten die Leseweiten bis auf durchschnittlich 450 Nukleotide gesteigert werden. Aufgrund der in einer einfachen Doppelstrangsequenzierung beobachteten Unsicherheiten wurde schließlich der Strukturgenbereich mit 4,5-facher Redundanz bestimmt. Die Nukleotidsequenz des gesamten 2112 bp *SalI*-Fragmentes aus *R. rubrum* ist in Abb. 89 dargestellt.

Bereits während der Edmansequenzierung fiel auf, daß die Primärsequenz gereinigter nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* offenbar mit einem Aspartat begann. Erstaunlicherweise zeigte die ermittelte DNA-Sequenz kein potentiell Startcodon in unmittelbarer Nähe des bekannten vermeintlichen N-Terminus.

Die Verwendung von „ORF-Finder“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) erbrachte folgende potentielle offene Leserahmen: ORF 1 (125-1213, *phaZRr*); ORF 2 (Start 1265); ORF 3 (Start 1312 [Ile]; antiparallel zu ORF 1 und 2). Um die Zuordnung der offenen Leserahmen zu prüfen und eventuelle Frameshiftfehler ausschließen zu können, wurden Sinnstrang und Gegenstrang mit dem Programm CodonPreference (GRIBSKOV et al., 1984; GCG®-Wisconsin Package 10.1) unter Zuhilfenahme einer zuvor mit 93 aus Datenbanken bekannten kodierenden Genen aus *R. rubrum* erstellten Codon-Häufigkeitstabelle analysiert (Abb. 90) und mit dem statistischen G+C-Gehalt an der jeweils dritten Codonposition verglichen (BIBB et al., 1984; Details siehe 3.8.5.). Der Bestimmung der Codon-Häufigkeit aus den verfügbaren DNA-Sequenzen bekannter Gene aus *R. rubrum* diente wiederum das Programm CodonFrequency (GCG®-Wisconsin Package 10.1).

TCGACGGCTTCTGGGTGATCTGCGGCAAGGATAAGGAAAGGGGCCCTTTCAGCGCGATCGGCTCTTTTCTTGGCTCTC  
 1  
 FR-3 S P K R P S R R C P Y P F P A R E A R D T K K K R E - 80

TTGCGTGCTGGGGTAAACTGGTCAGGCAAGCGAGGAGGGGCGATGAGGGCATTCTGTGGTTTGTGGGGCCGCTTTG  
 S/D *phaZRr (ORF1)* →  
 81  
 FR+1 M R A F C R F V G A A L - 160  
 FR-3 K R A P T F Q D P L R L L P R H P C E T P K D P G S Q -

TTGCTGGTGGGATTGGCCGGGCGGCTGGGCCGATTCTTGCCCAAGCTGGCCATCGATGCCGATCATGTGACGGTGTG  
 161  
 FR+1 L L V G L A G P A W A D S L P K L A I D A D H V T V S - 240  
 Conf 7 6 6 2 2 7 8 8 9 9 8 6 2 1 2 5 5 5 2 1 5 3 2 1 3 5  
 FR-3 Q Q H S Q G P R G P G I G Q G L Q G D I G I M H R H -

GGGGATCTCCTCGGGCGCCTATATGGCCAATCAGTTCATGTGCCCCATTGCGCGGGTGGATGGCGCCGGTTGGTGC  
 241  
 FR+1 G I S S G A Y M A N Q F H V A H S A R V D G A G L V A - 320  
 Conf 7 6 6 2 2 7 8 8 9 9 8 6 2 1 2 5 5 5 2 1 5 3 2 1 3 5  
 FR-3 R P D G R A G I H G I L E M D G M R R P H I A G P Q D -

CCGGTGGTCTGTATGGCTGCGCCGTTCCACGGTGTCAACGACAAGGTGATGGCGACGGCCTCGCGCCCTTGCCAC  
 321  
 FR+1 G G L Y G C A V S T V V N D K V M A T A S R A L A H - 400  
 Conf 7 8 8 2 0 4 5 3 7 7 8 8 8 7 6 3 5 7 6 3 5 7 6 7 4 1 1  
 FR-3 G T T Q I A A G N G R D D V V L H H R R G R A G K G V -

TGCATGCGTCAAAGCGGTTTCTGGAAGCGCCACCGCTTGTGGTATCGCCCGCAGCTTGAGCGGCCGGGCGAT  
 401  
 FR+1 C M R Q S A F L E S A D R F V G I A R Q L E R A G A I - 480  
 Conf 1 1 4 5 5 6 1 5 3 7 7 8 8 8 7 6 3 0 2 2 3 4 5 3 3 2  
 FR-3 A H T L A R K Q F A G V A K D T D G A L K L P G P R -

CGACGCCCTGGCCGATTGCGCGGATCGGGTTTATCTGTTACCGGCGAGGCCGATACGGTCTCGCGCCCAAGGTGG  
 481  
 FR+1 D A L A G L R G D R V Y L F T G E A D T V V G A K V V - 560  
 Conf 2 5 4 4 7 7 9 9 9 8 7 9 9 9 9 7 8 8 7 5 2 0 4 1 7 8 9  
 FR-3 D V G Q G S Q A A I P N I Q E G A L G I R D D A G L H -

TGAGGACGGCGCCGAAGCCCTGGGACGCTGGGGTGACCACCACCTGGTGAGTTCGCTTCAGGGAACCCCGGGCGCC  
 561  
 FR+1 R T A A E A L G T L G V T T T L V S S L Q G T P G A - 640  
 Conf 9 9 9 9 9 8 6 1 1 0 4 0 3 0 0 1 0 0 1 1 0 3 5 0 1 0  
 FR-3 D V G Q G S Q A A I P N I Q E G A L G I R D D A G L H -

GGGGCAAGGCCGGTACGCGCTTTTCTGACCCCCGATCGCGCAATGCCGCTGTTCGGCCGAAAAGAGCCCTTTTTC  
 641  
 FR+1 G A K A G H A F L T P D R G N A A C S A E K S P F F N - 720  
 Conf 0 0 0 0 5 2 1 4 3 6 4 5 4 7 8 6 6 6 6 8 8 8 8 9 8 2 1 3  
 FR-3 P G L G T V G K Q G G I A A I G G T R G F L A G K E -

CGCCTGCCGTACGATCAGCCGAAGCCATCCTCAAGTTCTCTATGGGCGTCTCTGGCTCCGCGGCCCGTCCCTGT  
 721  
 FR+1 A C R Y D Q A E A I L K V L Y G P S L A P P A P V L S - 800  
 Conf 5 6 8 8 5 0 7 8 9 9 9 9 8 5 3 2 3 6 8 8 8 8 9 8 7 6 5 4  
 FR-3 V G A A V I L G F G D E L N E I P R R Q S R R G R D Q -

CCGGCGGCTTTCGCGCTTTGACCAGTTCGCGCTATGTACGGGGGGAATGCCATCAAGCGTCTGTGGACAGGGG  
 801  
 FR+1 G R L S R F D Q S A Y V R G G N A I K A S L W D E G - 880  
 Conf 5 7 0 4 4 3 1 0 0 1 1 4 6 7 6 5 4 4 7 7 2 1 2 2 2 3  
 FR-3 G P P K R A K V L R G I Y P P P I G D L R R Q P V L P -

CTTGTTTATGTGCCCGCCGACTGCGCGGCGGCGGCCTGCCGCTGCATATCGCCTTCCATGGCTGCAAGCAGTCCGA  
 881  
 FR+1 L V Y V P A D C A A G A A C R L H I A F H G C K Q S D - 960  
 Conf 4 5 2 6 8 4 0 3 2 3 4 0 3 7 8 8 8 8 8 7 5 2 0 2 2 2  
 FR-3 K N I H G G V A G R A R G A P Q M D G E M A A L L G -

TCAGGTGCTGGGGTGGCGGAGAAGTCTGGGATCTGGCGGCTATAATGGCTGGGCCGATACCAACCACATCGTGTGC  
 961  
 FR+1 Q V L G S A E K F W D L A G Y N G W A D T N H I V V L - 1040  
 Conf 1 0 4 7 1 7 8 8 8 8 9 6 2 7 8 8 7 6 7 8 5 8 8 8 9 9 7  
 FR-3 I L H Q P R R L L E P I Q R A I I A P G I G V V D D H -

TCTATCCCCAGGCCCGGCCATCGCGCCACCGAGGGCTTTCCTTTGACGGCGATCAACCCGAGGGCTGCTGGAAGTGG  
 1041  
 FR+1 Y P Q A R A I G A T E G F P L T A I N P E G C W N W - 1120  
 Conf 4 0 4 5 1 5 3 5 6 7 6 6 6 5 4 5 6 7 8 1 1 3 0 0 3 0  
 FR-3 E I G L G P G D A G G L A K R Q R R D V G L A A P V P -

TGGGGCTATGGCCTTGATGAAAAATCCTGGGCCGAGGGGCTGCAGATCAGCGCGTGAACGCGATGATCAACGCCCT  
 1121  
 FR+1 W G Y G L D G K F L G R E G L Q I S A V N A M I N A L - 1200  
 Conf 0 0 1 3 5 7 7 6 2 0 1 2 4 7 4 1 7 9 9 9 9 9 9 9 9 8 6  
 FR-3 P A I A K I S F E Q A A L P Q L D A R H V R H D V G -

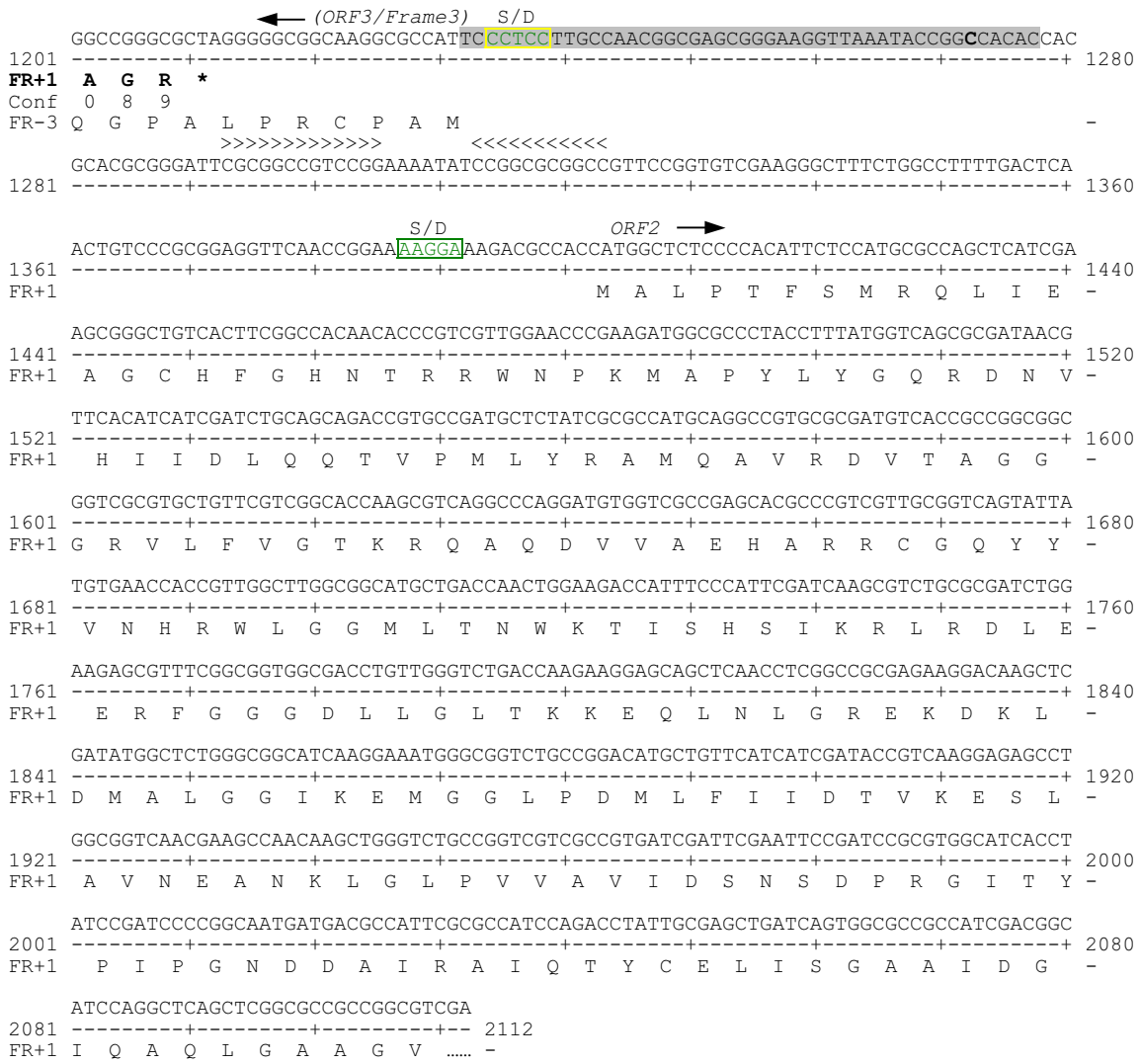
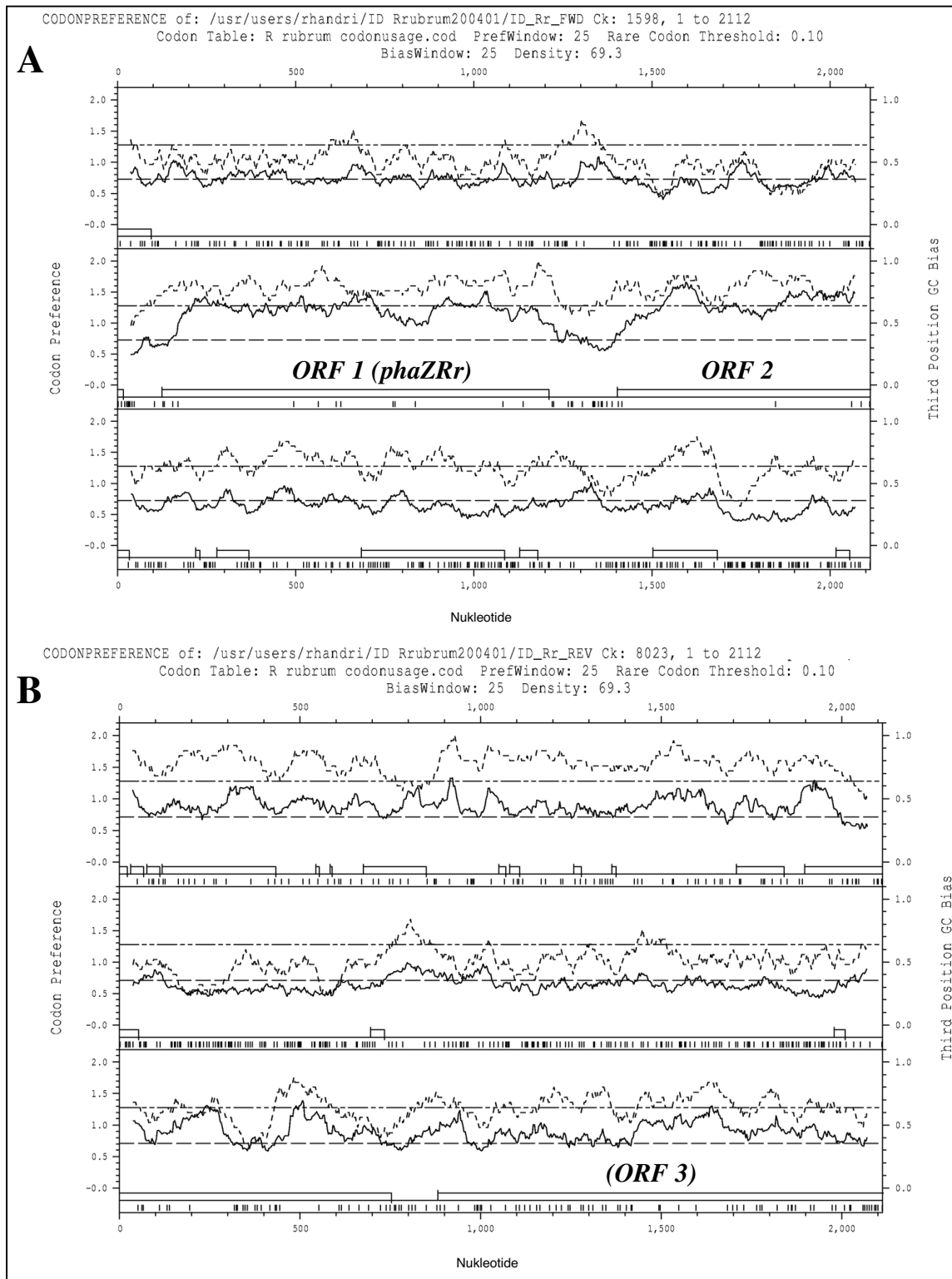


Abb. 89: (vorangehende Seiten) DNA-Sequenz des klonierten genomischen 2112 kbp *SalI*-Fragmentes aus *R. rubrum*. Die vom potentiellen Strukturgen *phaZRr* (ORF1, Frame +1), den offenen Leserahmen ORF2 (Frame +1) und ORF3 (Frame -3) abgeleitete Aminosäuresequenzen der intrazellulären nPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZRr (Fettdruck) sowie einem potentiellen 30S ribosomalen Protein S2 und einem nicht näher zugeordneten hypothetischen Protein (ORF3) sind mit Leserahmen (FR+1 bzw. FR-3) angegeben. Die abgeleiteten Aminosäuren befinden sich jeweils unter der ersten Base eines jeden Codons. Einfache Unterstreichung kennzeichnet die im Edman-Abbau bestätigten Aminosäuren. Die postulierte Signalpeptidaseschnittstelle in PhaZRr wurde durch einen senkrechten Pfeil markiert. Für das reife Protein PhaZRr wurde eine Sekundärstrukturanalyse mittels PSIPRED durchgeführt. Potentielle  $\alpha$ -Helices sind blau und an potentiellen  $\beta$ -Faltblattstrukturen beteiligte Aminosäuren gelb hinterlegt. Die unter „Conf“ angegebenen Zahlenwerte (0 bis 9) geben die mit steigendem Wert zunehmende Wahrscheinlichkeit einer Zugehörigkeit der jeweiligen Aminosäure zum vorausgesagten Sekundärstrukturelement wieder. Potentielle Ribosomenbindestellen wurden eingerahmt und mit S/D gekennzeichnet. Mittels „Neuronal Network Promoter Predict“ (s. 3.14.1.1.) ermittelte potentielle Promotorbereiche wurden grau hinterlegt. Offene Pfeile markieren repetitiv invertierte Sequenzen. Die Nukleotidsequenz des Strukturgens *phaZRr* wurde unter der „Accession“-Nummer AY061637 an GenBank übermittelt.

Wie aus Abb. 90 A zu erkennen, wurden ebenfalls drei potentiell codierende Bereiche identifiziert, von denen jedoch nur *phaZRr* vollständig auf dem klonierten Fragment vorlag und in seiner Lokalisation den Ergebnissen mit „ORF-Finder“ entsprach. Daß es sich bei ORF 1 von Position 125 bis 1213 um einen signifikant codierenden Bereich handelte, zeigten sowohl ein signifikant hoher GC-Gehalt als auch die gute Übereinstimmung mit der Codon-Verwendung in *R. rubrum*. Die Präferenz für Guanin und Cytosin in der dritten Codonposition, welche im Mittel für alle derzeit verfügbaren Sequenzen aus *R. rubrum* bei 82,47 % lag (Nakamura et al., 2000; <http://www.kazusa.or.jp/codon/>), wurde im Bereich von *phaZRr* mit 80,4 % GC-Gehalt für die letzte Tripletbase bestätigt. Stromaufwärts des potentiellen Strukturgens lag dieser Wert unter 62 % stromabwärts zwischen ORF 1 und ORF 2 unter 67 % (s. auch 3.14.1.2., Tab. 26). Das Strukturgen (*phaZRr*) beginnt offenbar mit einem ATG an Position 125.

Die Anwesenheit weiterer offener Leserahmen, wie mit „ORF-Finder“ vorhergesagt, wurde durch CodonPreference und parallel durchgeführter Analysen mit GLIMMER 2.0 (DELCHER et al., 1999), sowie dem Nachweis weiterer Strukturmerkmale wie potentieller Ribosomenbindestellen (SHINE und DALGARNO, 1974) und Promotorsequenzen (-35 und -10 Region) bestätigt. Jedoch wichen die Vorhersagen der Lage potentieller Start-Codons z.T. deutlich von den „ORF-Finder“-Ergebnissen ab. ORF 2 (Start 1403) und ORF 3 (Start 1231) waren jeweils nur partiell auf dem klonierten Fragment lokalisiert. Homologie-Analysen der potentiell kodierenden Regionen mit GenBank/SwissProt-Datenbanken und die Analyse potentieller Ribosomenbindestellen präferierten für ORF 2 das CodonPreference-Ergebnis mit einem ATG-Startcodon an Position 1403 der in Abb. 89 gezeigten Sequenz.



**Abb. 90:** Identifizierung potentieller offener Leserahmen in der ermittelten DNA-Gesamtsequenz der genomischen Klone von *R. rubrum* mit dem Programm CodonPreference (GRIBSKOV et al., 1984) unter Verwendung der Codonauswahl aus *R. rubrum*. (A) zeigt die Ergebnisse der Sinnstrangeanalyse (bezüglich *phaZ7*), (B) die des Gegenstranges der ermittelten Nukleotidsequenz. Die Ordinate gibt die Codon-Präferenz (schwarz) bzw. den GC-Gehalt der dritten Codonposition (grau) basierend auf der Methode nach BIBB et al. (1984) wieder. Die Signifikanzlimits sind durch unterbrochene Linien dargestellt.

### 3.14.1. Charakterisierung der offenen Leserahmen des DNA-Fragmentes aus *R. rubrum*

#### 3.14.1.1. Transkriptions- und Translationssignale

Das Strukturgen der intrazellulären nPHB-Depolymerase, *phaZRr*, erstreckte sich über 1089 bp, beginnend mit einem ATG-Startcodon in Position 125 bis zum Stopcodon TGA in Position 1213. Die Initiation der Proteinbiosynthese erfordert eine geeignete stromaufwärts des Startcodons gelegene purinreiche Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno-[S/D]-Sequenz) (Details s. 3.8.6.)

Stromaufwärts aller drei postulierten offenen Leserahmen wurden purinreiche Sequenzen mit fünf bis sechs Nukleotiden Identität zum komplementären Strang der 16S rRNA aus *E. coli* identifiziert. Dem ORF für *phaZRr* ging im Abstand von sieben Nukleotiden eine Ribosomenbindestelle der Sequenz GGAGG (Position 112 - 117) voran, die identisch zum komplementären Strang der 16sRNA aus *E. coli* war (Abb. 91). Von den durch SCHERER et al. (1980) und STORMO et al. (1982) aufgestellten Kriterien wich die betreffende Nukleotidsequenz im Bereich von -20 bis +15 bp teilweise ab. Die geforderte Limitierung auf maximal zwei Guanin im Bereich -1 bis -7 erfüllte die *phaZRr*-Primärsequenz nicht (dies konnte auch für *nifD* (Lehmann et al., 1990) mit 4 Guanin zwischen RBS und Startcodon beobachtet werden). Erwartete Adenine fanden sich nur in Position +3 und +7. Mit Hilfe des als PerlScript verfügbaren Programmes RBS-Finder (SUZEK et al., 2001) konnte, basierend auf dem Ergebnis der GLIMMER-Analyse als „Input“, der Sequenzabschnitt jedoch ebenfalls als potentielle Ribosomenbindestelle bestätigt werden. Typische Shine/Dalgarno-Sequenzen konnten auch mit 11 bzw. 2 Nukleotiden Abstand vor den potentiellen offenen Leserahmen 2 und 3 identifiziert werden.

Der stromaufwärts vom ermittelten *phaZRr*-Strukturgen liegende DNA-Bereich zeichnete sich durch einen höheren A + T-Gehalt (> 38 %) gegenüber der codierenden Region aus. Um Hinweise auf mögliche Promotorbereiche zu erhalten, wurde stromaufwärts der Strukturgene nach Konsensussequenzen für Promotorstrukturen gesucht. In einem Abstand von -11 bis -61 Nukleotiden vor dem Start von ORF 1 sowie -126 bis -170 Basen vor *phaZRr* konnten Nukleotidsequenzen identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zur Konsensussequenz  $\sigma^{70}$ -abhängiger Promotoren aus Enterobakterien aufwiesen (vergleiche 3.8.6.). Einem A+T-reichen „-43“-Bereich (BUJARD, 1980) folgten zwei konservierte Sequenzabschnitte, die als „-35“ und „-10“ -Region bezeichnet werden (ROSENBERG und COURT, 1979; HAWLEY und McCLURE, 1983). Die -10 Region wird nach PRIBNOW (1975) und SCHNALLER et al. (1975) auch als Pribnow-Schnaller-Box definiert. In der Regel sind die -10 und -32 Region durch 17 beliebige Nukleotide voneinander getrennt.

Gen	stromaufwärts liegende Nukleotidsequenz (-20 bis +3)	Referenz
<i>phaZRr</i>	GGCAAGCGGAGGAGGGGGCGATG	vorliegende Arbeit
<i>ORF 2</i>	GGAAAAGGAAAGACGCCACCATG	vorliegende Arbeit
<i>ORF 3</i>	TCGCCGTTGGCAAGGAGGGAATG	vorliegende Arbeit
<i>phaCRr</i> (Stamm HA)	.....CAAGGAATGGTGATG	CLEMENTE et al., 2000
<i>phaCRr</i> (Stamm ATCC 25903)	GGTTTTTCGCCCGGGCTCGATG	CLEMENTE et al., 2000
<i>cycA</i>	GTATTGGAGAGGAGTTCAAGATG	SELF et al., 1990
<i>glnA</i>	ACAAACTGGGAACTAAGGTCATG	JOHANSSON und NORDLUND, 1996
<i>glnB</i>	AGCCGGAGCGACCGGATTTTCATG	JOHANSSON und NORDLUND, 1996
<i>nifD</i>	GTCGATCAGAGGAGAGGGATATG	LEHMAN et al., 1990
<i>nifH</i>	CGAAGAAAAGGATTGATTCCATG	LEHMAN et al., 1990
<i>nifJ</i>	TCGAAGGAGGAGCGTTCCCTATG	LINDBLAD et al., 1996
<i>atp2</i> -Cluster	GAAAAGGGGCTGCCGCCGCATG	FALK und WALKER, 1988
<i>ORF 1(uncI homolog)</i>		
<i>atpA</i>	AGCGGAAGGGAACAAAGACCGTG	FALK und WALKER, 1988
<i>atpB'</i>	GCGACGCGGGAGCCCGTTCCATG	FALK und WALKER, 1988
<i>atpC</i>	TCTTTTGAAAAGGGTAAACTCATG	FALK und WALKER, 1988
<i>atpB</i>	GCGATCAAGGAGTAAGGCCGATG	FALK und WALKER, 1988
<i>atp2</i> -Cluster <i>ORF 4</i>	TCATGAATGGTCGAGAAACGATG	FALK und WALKER, 1988
komplementärer Strang der 16 S rRNA aus <i>E. coli</i>	---UAAGGAGGUGA---	BROSIUS et al., 1978

**Abb. 91:** Vergleich der S/D-Sequenzen der potentiellen ORF-Regionen mit den RBS-Sequenzen bekannter Gene aus *R. rubrum*. Zum komplementären Strang der 16 S rRNA aus *E. coli* homologe Bereiche wurden unterstrichen und potentielle Shine-Dalgarno-Sequenzen (purinreiche Regionen) wurden grau hinterlegt.

Im Falle der stromabwärts vor *phaZRr* und *ORF 2* gelegenen potentiellen  $\sigma^{70}$ -Promotorstrukturen war die -35 Region in der minimalen Konsensussequenz TTG konserviert. In dem geforderten Abstand von 16 bzw. 17 Nukleotiden folgte eine -10-Region mit je 4 bzw. 3 konservierten Nukleotiden. Ein möglicher -43-Bereich fand sich stromaufwärts der vor *phaZRr* gelegenen potentiellen Promotorsequenz (P1). Da für *R. rubrum* auch  $\sigma^{54}$  (NtrA)- abhängige Promotoren beschrieben waren, wurden die Regionen stromaufwärts der ermittelten offenen Leserahmen auf typische Sequenzmotive geprüft. Im Abstand von 49 Nukleotiden vor dem Start von *phaZRr* fand sich ein Sequenzabschnitt mit Homologie zur Konsensussequenz aus *E. coli* (Abb. 92). Weiteren Nukleotidsequenzen mit minimaler  $\sigma^{54}$ -Konsensussequenz (5'-GG-N10-GC-3') (AUSUBEL, 1984) wurde aufgrund des relativ hohen G+C-Gehaltes der *R. rubrum*-DNA und dem damit verbundenen statistisch gehäuften Auftreten keine physiologische Bedeutung beigemessen.

	"-43"	"-35"	"-10"
P1 vor <i>phaZRr</i>	65-CTTTTTTC	<u>TTGCGC</u> -N16-	<u>TAAACT</u> GGTCAAGCAAGCGGA-110
P2 vor <i>ORF2r</i>	1232-TCCCTCC	<u>TTGCCA</u> -N17-	<u>TAAATAC</u> CGGCCACACCACG-1277
<i>cycA</i>	TT	<u>TTGCCT</u> -N15-	<u>TAAAGC</u>
stromauf <i>glnB</i> (experimentelle Evidenz; JOHANSSON und NORDLUND, 1996)		<u>TAGCGC</u> -N21-	<u>TATATT</u>
stromauf des F(0)-ATP-Synthase-Genclusters		<u>TTGACA</u> -N17-	<u>TATTTT</u>
<i>atp2</i> -Cluster <i>ORF 4</i>		<u>TACACC</u> -N21-	<u>TATAAA</u>
<b><math>\sigma^{70}</math>-Konsensus aus <i>E. coli</i></b>		<u>TTGACA</u> -N17-	<u>TA</u> tAaT
<hr/>			
	"-24"	"-12"	
<i>nifA</i>	T	<u>GG</u> CATCATCCTT <u>GC</u> T	
<i>nifH</i>	T	<u>GG</u> CACGCTGGGT <u>GCA</u>	
<i>nifJ</i>	T	<u>GG</u> AGACGCGAC <u>GCG</u>	
<i>phaZRr</i>	62-C	<u>GG</u> TCTTTTCTT <u>GCG</u> -75	
<b><math>\sigma^{54}</math>-Konsensus aus <i>E. coli</i></b>		<u>GG</u> CATG-taatt <u>GCT</u>	

**Abb. 92:** Vergleich der stromaufwärts von *phaZRr* gelegenen potentiellen Promotorsequenzen mit der Konsensussequenz  $\sigma^{70}$ - und  $\sigma^{54}$ -abhängiger Promotoren „aus“ *E. coli*. Unterstrichene Nukleotide stehen in Übereinstimmung mit der Konsensussequenz aus *E. coli*. Großgeschriebene Nukleotide kommen in dieser Position in über 50 % und klein geschriebene in 40-50 % aller untersuchten *E. coli*-Promotoren vor (HAWLEY und McCLURE, 1983; AUSUBEL, 1984). Die mittels PromoterPredict vorhergesagten potentiellen Transkriptionsstartpunkte wurden in vergrößerter Schrift hervorgehoben. Die Zahlenwerte geben die absolute Position der Bereiche auf dem unter 3.14. (Abb. 89) gezeigten DNA-Fragment aus *R. rubrum* wieder.

Ein Hinweis auf potentielle Terminationssignale zwischen *phaZRr* und *ORF 2*, wie sie im Falle des *phaZ7*-Genes aus *P. lemoignei* (3.8.6.1.) postuliert wurden, ergab sich weder bei gezielter Suche nach Faktor-(Rho)-abhängigen (PLATT, 1986; CHENG et al., 1991) noch nach Faktor-unabhängigen Terminatoren (TINOCO, 1973). Möglicherweise können *phaZRr* und *ORF 2* in einem primären Transkript abgelesen werden.

### 3.14.1.2. Basenverteilung und Codonauswahl

Der G+C-Gehalt des sequenzierten DNA-Fragmentes aus *R. rubrum* lag bei 64 mol%. Die Codonauswahl innerhalb von *phaZRr* verdeutlichte die Bevorzugung G+C-reicher Codons, mit deutlicher Präferenz für Cytosin (80,4 mol%) in Codonposition 3 (Tab. 26). Ein Vergleich der Codonauswahltable für *phaZRr* und *ORF 2* mit der Codonauswahl für 93 andere bisher identifizierte Gene aus *R. rubrum* (CodonFrequency, GCG®-Wisconsin Package 10.1 und NAKAMURA et al., 2000) offenbarte nur geringfügige Unterschiede. So wurde für *phaZRr* von den sechs möglichen Codons für Arginin nur 5 % CGT und 45 % CGC im *ORF2* hingegen zu je 50 % CGC und CGT verwendet. Auch die Präferenz für TGC (Cys) fand sich in *ORF2* nicht, TGT wurde zu 50 % verwendet. Der Gesamt-[G+C]-Gehalt innerhalb des offenen Leserahmens 2 lag mit 61 mol% unter dem G+C-Gehalt des gesamten sequenzierten Bereiches. Auch hier zeigte sich jedoch mit einem G+C von 80,1 % in Codonposition 3 ein für Gene aus *R. rubrum* offenbar charakteristisches Ergebnis. Die gefundene Codonauswahl bestätigte den codierenden Charakter von *phaZRr* und *ORF 2*. Ein Vergleich des G+C-Gehaltes zeigte, daß *phaZRr* und *ORF 2* der von BIBB et al. (1984) formulierten



Regel für G+C-reiche DNA mit einem G+C-Gehalt von Position 3. > 1. > 2. folgten. Für ORF3, dessen Gesamt G+C mit 65 % etwa dem von *phaZRr* entsprach, wichen hingegen Codonauswahl und insbesondere der G+C-Gehalt in Codonposition 3 mit nur 65,8 % (Wert geringer als Position 1) deutlich von den in *R. rubrum* und G+C-reichen Organismen charakteristischen Werten ab. Aufgrund dieser Ergebnisse blieb trotz ermittelter potentieller RBS offen, ob es sich bei ORF 3 tatsächlich um eine kodierende Region handeln könnte.

**Tab. 26:** (G+C)-Gehalt der ersten, zweiten und dritten Codonposition des nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase-Strukturgenes sowie der potentiellen offenen Leserahmen aus *R. rubrum* im Vergleich zu bekannten Genen.

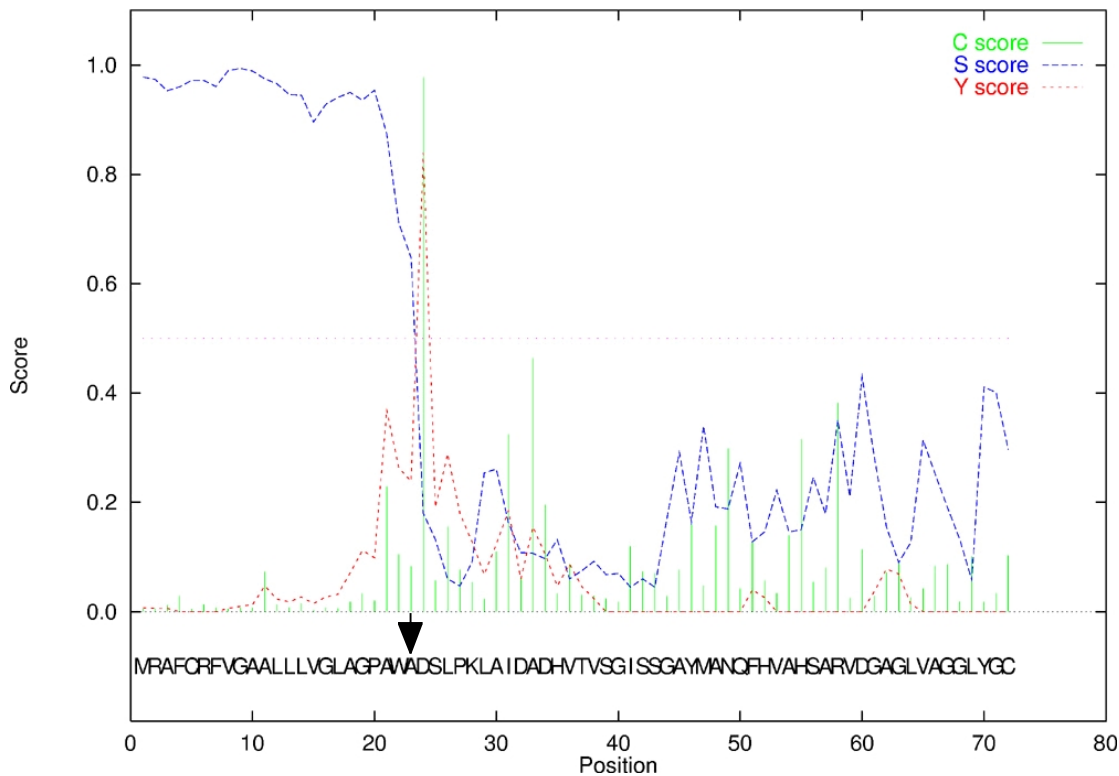
Codonposition	G + C [mol%]									Statistischer Wert für 93 Gene aus <i>R. rubrum</i> C+G
	ORF 1 ( <i>phaZRr</i> )			ORF 2			ORF 3			
	C	G	C+G	C	G	C+G	C	G	C+G	
1.	21,2	44,6	<b>65,8</b>	26,6	35,4	<b>62</b>	38,7	39,2	<b>77,9</b>	<b>65</b>
2.	29,5	22,9	<b>52,4</b>	20,7	21,5	<b>42,2</b>	24,6	29,0	<b>53,6</b>	<b>46,1</b>
3.	42,1	38,3	<b>80,4</b>	47,9	32,2	<b>80,1</b>	44,1	21,7	<b>65,8</b>	<b>82,5</b>
Gesamtanteil	31	35,3	<b>66,2</b>	31,7	29,7	<b>61,4</b>	30	35,8	<b>65,8</b>	<b>64,5</b>

### 3.14.2. Charakterisierung der abgeleiteten Aminosäuresequenz von PhaZRr

Die von *phaZRr* abgeleitete Aminosäuresequenz war von Asp<sub>24</sub> bis Val<sub>53</sub> identisch mit dem N-Terminus der reifen nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum*. Das dominante Peptid des tryptischen „im Gel“-Verdaues (F24; s. 3.12.2., Tab. 24) war offenbar zwischen Val<sub>212</sub> und Leu<sub>225</sub> lokalisiert. Alle Haupt- und Nebensequenzen der Peptide des Lys-C-Proteaseverdaues (F19: Gln<sub>277</sub> bis Lys<sub>287</sub>, F35-Hauptsequenz: Leu<sub>29</sub> bis Gly<sub>40</sub>, F35-Nebensequenz: Ala<sub>176</sub> bis Lys<sub>194</sub>, F57-Hauptsequenz: Ser<sub>195</sub> bis Ile<sub>209</sub>, F57-Nebensequenz: Phe<sub>288</sub> bis Tyr<sub>294</sub>) konnten der abgeleiteten Aminosäuresequenz eindeutig zugeordnet werden. Die Identifikation aller nach Lys-C-Behandlung des Ausgangsproteins zu erwartenden Lysine N-terminal der sequenzierten Proteinspaltprodukte bestätigte die Qualität des Proteaseverdaues. Aufgrund der guten Übereinstimmung aller durch Edman-Abbau erhaltenen Sequenzdaten und der sicheren Zuordnung aller Peptidfragmente (99 Aminosäuren = 27 % des Proteins) über den gesamten abgeleiteten Sequenzbereich handelte es sich bei dem beschriebenen ORF offenbar um das Strukturgen von PhaZRr.

Die abgeleitete Proteinsequenz umfaßte jedoch erstaunlicherweise ein insgesamt 363 Aminosäuren großes Präprotein ( $M_r = 37.704$  Da). Bei dem in der Edman-Abbau bestimmten N-terminalen Sequenz handelte es sich offenbar um den bereits prozessierten N-Terminus des Enzyms. Eine erste Analyse der Verteilung hydrophober und hydrophiler Bereiche in der Primärstruktur legte die Vermutung nahe, daß es sich eventuell um eine N-terminale Signalsequenz handeln könnte. Wie alle bekannten extrazellulären dPHA-Depolymerasen (JENDROSSEK 2001c) besaß die offenbar intrazellulär lokalisierte nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase (Reinigung aus der löslichen cytoplasmatischen Proteinfraction) ebenfalls ein N-terminales Signalpeptid, welches typischerweise von sekretorischen Proteinen für

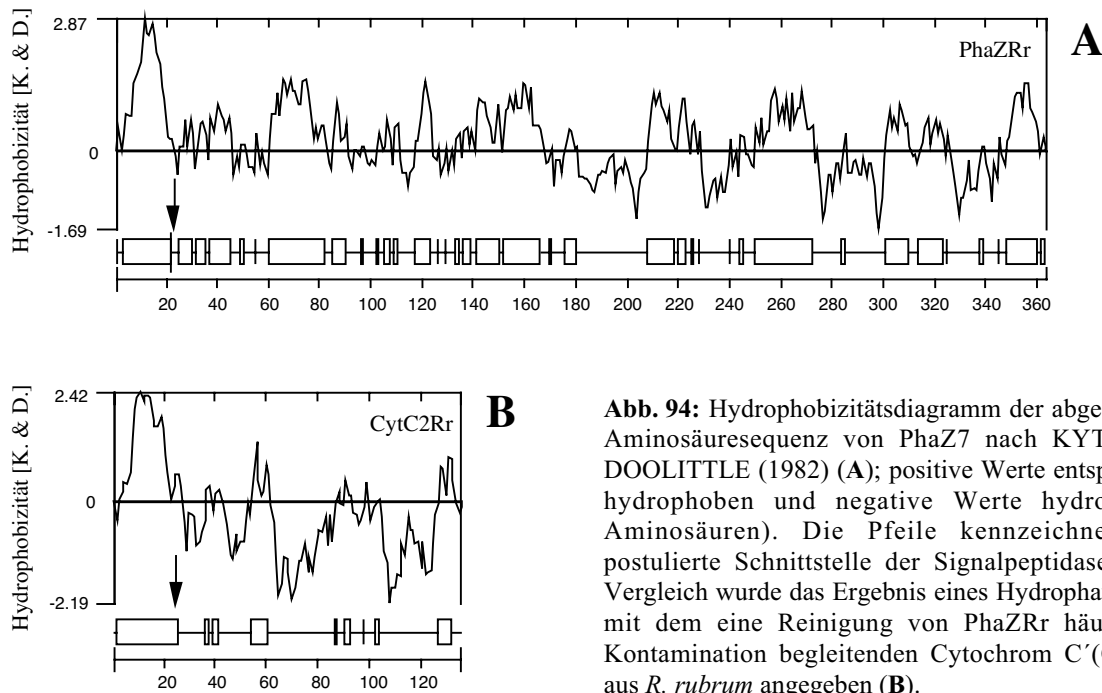
einen Transport über die Cytoplasmamembran benötigt wird. Während der Translokation wird das Leaderpeptid durch eine Leaderpeptidase vom funktionalen Protein abgespalten und das prozessierte reife Protein verläßt die Zelle. Mit Hilfe des Programmes SignalP (NIELSEN et al., 1997a; 1997b) wurde, ähnlich der Vorgehensweise für PhaZ7 aus *P. lemoignei* unter Verwendung einer Trainingsmatrix für Gram-negative Eubakterien die Leaderpeptidase-Schnittstelle mit hoher Evidenz zwischen den Positionen Ala<sub>23</sub> und Asp<sub>24</sub> des abgeleiteten Proteins vorhergesagt (Abb. 93).



**Abb. 93:** Analyse der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten N-terminalen Aminosäuresequenz mittels SignalP (NIELSEN et al., 1997). C-Score: Wahrscheinlichkeit einer Schnittstelle im Vergleich zu andern Sequenzen –höchste Werte an Position +1 nach potentieller Schnittstelle; S-Score: Signalpeptid-Wahrscheinlichkeit; Y-Score: geometrisches Mittel aus der Höhe des C- und Steigung des S-Wertes. Die potentielle Schnittstelle A23-D24 (Pfeil) ist durch den höchsten Y-Score der ersten 72 Aminosäuren des N-Terminus in Position +1 relativ zur Schnittstelle gekennzeichnet.

Die mit Asp<sub>24</sub> beginnende N-terminale Aminosäuresequenz des reifen gereinigten PhaZr-Proteins fand sich in Proteinfractionen zweier voneinander unabhängiger Aufreinigungen und die abgeleitete Molekularmasse (35.331 Da) der reifen nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase bestätigte die in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie (3.11.1.3.) und unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE (3.11.1.1.) ermittelten Molekularmassen. Die Sequenz des aus 23 Aminosäuren bestehenden Signalpeptides entsprach, wie im Falle der extrazellulären PHA-Depolymerase PhaZ7, den von PUGSLEY (1993) und VON HEINJE (1993) definierten Kriterien. Einer kurzen positiv geladenen N-terminalen Region (basische Aminosäure: Arg<sub>2</sub>; und Arg<sub>6</sub>; polare Aminosäure: Cys<sub>5</sub>) folgte ein ausgedehnter hydrophober Bereich. In dem Sequenzabschnitt fanden sich 15 hydrophobe Aminosäuren (6 x Ala; 4 x Leu, 2 x Phe; 2 x Val; 1 x Trp) und der C-terminale Bereich der Signalsequenz mit der Erkennungsstelle für die

Leaderpeptidase (Abb. 94). Der Hydrophobizitätsindex dieses Bereiches ähnelte, trotz divergierender Primärstrukturen, stark der postulierten Signalpeptid-analogen Leadersequenz aus Cytochrom C2, für welches eine posttranslationale Modifikation in *R. rubrum* angenommen wurde (SELF et al., 1990).



**Abb. 94:** Hydrophobizitätsdiagramm der abgeleiteten Aminosäuresequenz von PhaZ7 nach KYTE und DOOLITTLE (1982) (A); positive Werte entsprechen hydrophoben und negative Werte hydrophilen Aminosäuren). Die Pfeile kennzeichnen die postulierte Schnittstelle der Signalpeptidase. Zum Vergleich wurde das Ergebnis eines Hydrophatatieplots mit dem eine Reinigung von PhaZRr häufig als Kontamination begleitenden Cytochrom C'(CytC2) aus *R. rubrum* angegeben (B).

Der theoretische pI des reifen Proteins wich mit 7,0 deutlich vom experimentellen Wert (pH  $9,5 \pm 0,5$ ; s. 3.11.2.) ab. Für pH = 7,0 ergab sich eine theoretische Ladung von 0,016. Von 339 Aminosäuren waren 8,3 mol% positiv (K, R), 8,6 mol% negativ geladen (D, E) und 22,1 mol% polar ungeladen (S, T, C, N, Q, Y). Den Hauptbestandteil der prozessierten nPHA-Depolymerase aus *R. rubrum* bildeten jedoch mit 42,5 mol% hydrophobe Aminosäuren (A, V, L, I, W, F). Wie in den dPHASCL-Depolymerasen aus *P. lemoignei* stellten neben Glycin, Alanin und Threonin die häufigsten Aminosäuren dar (je >10 mol%). Auch PhaZRr wies, wie dPHASCL-Depolymerasen, eine Reihe hydrophober Bereiche auf, deren Ausdehnung jedoch stets auf weniger als 25 Aminosäuren beschränkt schien. Wie aus einem Hydrophatiediagramm (KYTE und DOOLITTLE, 1982; Abb. 94) erkennbar, dominierten abgesehen von der signifikant hydrophoben N-terminalen Signalsequenz offenbar eher polare Bereiche.

Das reife Protein besaß 8 Cysteine. Mit dem Programm CYPRED (FARISELLI und CASADIO, 2000) wurde für zwei C-terminal lokalisierte Cys-Reste (Cys<sub>252</sub>, Cys<sub>306</sub>) das Vorliegen in einer reduzierten Form vorhergesagt. Für die verbleibenden sechs Cysteine wies die Vorhersage auf eine mögliche Beteiligung an der Ausbildung von Disulfidbrücken hin. Um die Funktion und den Redoxzustand der Sulfhydrylgruppen dieser Aminosäurereste aufzuklären, wurde die enzymatische Aktivität nach Behandlung des Proteins mit Reduktionsmittel (DTT, Mercaptoethanol) bzw. Oxidationsmitteln (DTNB) näher untersucht. Die beobachtete Sensitivität der Depolymeraseaktivität

gegenüber DTT und Mercaptoethanol lieferte eine experimentelle Evidenz für das Vorhandensein essentieller Disulfidbrücken in PhaZRr (s. 3.11.6.4.).

### 3.14.3. Homologie von PhaZRr zu bekannten Sequenzen

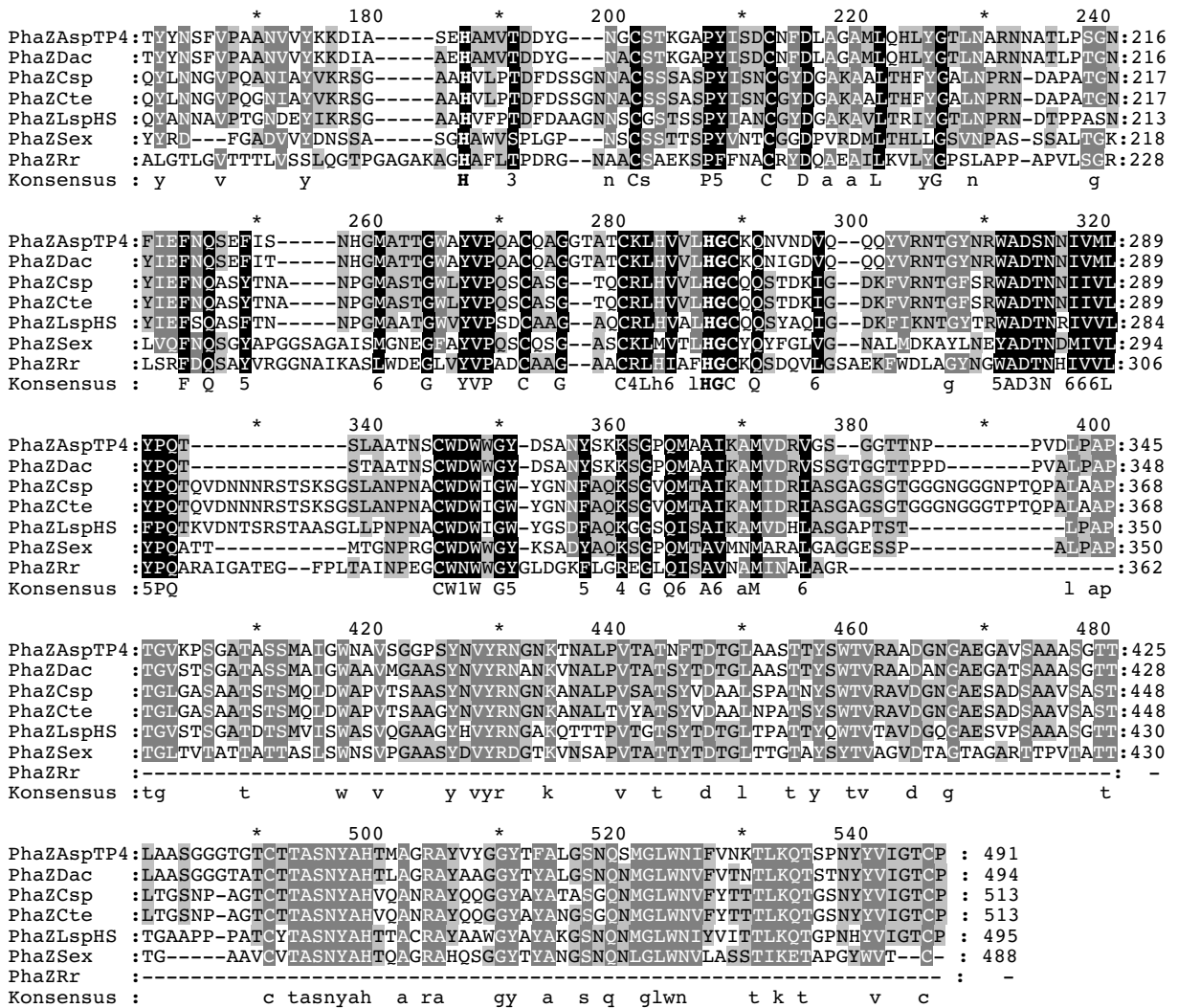
Vergleiche der abgeleiteten primären Aminosäuresequenz von *phaRr* mit Proteinsequenzen bzw. von Nukleotidsequenzen abgeleiteten Proteinsequenzen der Datenbanken Swiss-Prot, PIR, EMBL und GenBank (Stand Februar 2002) mit Hilfe der Programme BLAST/PSI-BLAST, FASTA (s. 2.17.19.3.) sowie direkte Sequenzvergleiche mittels Pileup, GAP (NEEDLEMAN und WUNSCH, 1970; GCG®-Wisconsin Package 10.1) und ClustalW zeigten entgegen den Erwartungen, daß ausgeprägte Homologien zu bereits bekannten extrazellulären dPHA-Depolymerasen bestanden. Im direkten paarweisen Alignment konnten jedoch keine signifikanten Homologien zu den als intrazelluläre nPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen beschrieben und zu *phaZl* aus *R. eutropha* H16 (SAEGUSA et al., 2001) homologen intrazellulären Proteinen nachgewiesen werden. Die ausgeprägtesten Homologien bestanden zu dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *Lepthotrix* sp. (TAKEDA et al., 2000; = *Caldimonas manganoxidans*, TAKEDA et al., 2002), *Streptomyces exfoliatus* K10 (KLINGBEIL, 1994), *Delftia acidovorans* (KASUYA et al., 1997), *Acidovorax* sp. TP4 (KOBAYASHI, et al., 1999), *Comamonas testosteronii* (SHINOMYIA et al., 1997) und *Comamonas* sp. (JENDROSSEK et al., 1995a) (Abb. 95). Für diese Enzyme war die Abfolge der katalytisch aktiven Aminosäuren Serin, Aspartat, Histidin und Oxyaniontasche vom N- zum C-Terminus in der Primärstruktur charakteristisch [PHAS<sub>SCL</sub> Depolymerasen Typ 2, siehe 4., Abb. 103]. Homologe Bereiche erstreckten sich mit 31 bis 35 % Identität bei 47 bis 51 % Ähnlichkeit vom Bereich der Signalsequenz bis zum Ende von PhaZRr. Auch ein Vergleich mit dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen des Typs 1 [Oxyaniontasche vor Serin, Histidin und Aspartat] zeigte begrenzte signifikante Homologie zwischen Position 30 und 75 (Bereich der Lipasebox) zu PhaZ2, PhaZ1 und PhaZ3 aus *P. lemoignei* (Abb. 96). Die Homologien zu weiteren extrazellulären PHA-Depolymerasen waren überwiegend auf offenbar stark konservierte Bereiche der katalytischen Triadeaminosäuren sowie die Oxyaniontasche beschränkt. Auf DNA-Ebene waren weder für das Strukturgen noch für den in Abb. 89 dargestellten Gesamtsequenzbereich signifikante Homologien zu anderen DNA-Sequenzen nachweisbar, was als Hinweis auf eine konvergente Entwicklung der Depolymerasen in der Evolution gewertet werden könnte.

```

PhaZAspTP4 : MAF-NFIRAAAAGAAIALCGVASVHAAVNLP---ALKIDKTQTVSGLSSGGFMAVOLHVAYSATFAKGVGVVAGGPFY : 75
PhaZDac   : MAF-NFIRAAAAGAAALCGVSVHAAVNLPE---ALKIDKTQTVSGLSSGGFMAVOLHVAYSATFAKGVGVVAGGPFY : 75
PhaZCsp   : MRV-QSWRSGVAALALWGGVNLAAAGAVPLG---QYNLATDQISVGLSSGGFMANOLGNAYSASFPMG-VGTFAGGPFY : 74
PhaZCte   : MRV-QSWRSGVAALALWGGVNLAAAGAVPLG---QYNLATDQISVGLSSGGFMANOLGNAYSASFPMG-VGTFAGGPFY : 74
PhaZLsphS : MKT-RMLVWAAAALVLAAGP---AWAVQSLP---RLNIDKSQISVGLSSGGFMANOLGVAHSSSTFPMG-VGVFAAGPFY : 71
PhaZSex   : MKIRQLLVAALTAAGTAATTVGGATAAVPAPTGGSLQOYNIGSTYVSGLSSGGFMANOLHVAYSADVPEG-AGIFSAAGPYD : 79
PhaZRr    : ---MRAFCRFVGAALLLVGLAGPAWADSLP---KLAIDADHVIVSGLSSGAYMANQFHVHARSARVDG-AGLVAGGLYG : 71
Konsensus : m          6          aa 1          i          VSG6SSGg5MA Q  A S f  G a Gp5

PhaZAspTP4 : CAEGSVVNA TGRCMAS *-----PTGIPSTSLVNTTN-TWAGQGVDPVANLQNSKVYLFSGTLDVSVKTVGMDALR- : 144
PhaZDac   : CAEGSIVNATGRCMAS *-----PTGIPSTSLVSTTN-TWASQGVDPVANLQNSKVYLFSGTLDVSVKTVGMDALR- : 144
PhaZCsp   : CAGLNNTAC-MYNAS *-----ISSAQLNAMQSSID-SYSSAASIDAKSRITAAQKIYIFTGHSDDYTVGPNTDALQT : 143
PhaZCte   : CAGLNNTAC-MYNAS *-----ISSAQLNAMQSSID-SYSSAASIDAKSRITAAQKIYIFTGHSDDYTVGPNTDALQT : 143
PhaZLsphS : CAGHYNNTAC-MYNAT *-----ISDGLQSTMQSSIN-HWS-GSQIDDKAGIAKQKIYLFVGSDDSTIGPNPMDALRK : 139
PhaZSex   : CAQNSVNTAQYACMDT *-----FMARKTPAQLEQLTRDRATAGKVDPVANLSGDKVWLFHGLNDSTVKAANNDIAT : 150
PhaZRr    : CAVSTVVNDKVMATSRALAHCMRQSAFLSADRFVGIARQLERAGATDALAGLRGDRVVLETGEADTVGAKVVRTAAE : 151
Konsensus : CA          a          a3          6D 6 4656F Gt D 6 d 1

```



**Abb. 95:** Primärstrukturalignment der nPHASCL-Depolymerase PhaZRr aus *R. rubrum* mit extrazellulären dPHA-Depolymerasen des Typs 2 (katalytische Triade vor der Oxyaniontasche) mittels Clustalw 1.7 (Thompson et al., 1994). Als Matrix diente die „Gonnet Serie“. Homologe Aminosäuren wurden mit steigendem Grad der Homologie dunkler schattiert. Potentielle katalytische Reste (S, D, H, HG-Motiv) wurden durch Fettdruck hervorgehoben. Verwendete Kurzbezeichnungen (PhaZ = PHA-Depolymerase): PhaZAspTP4: *Acidovorax* sp., PhaZDac: *Delftia acidovorans*, PhaZCsp: *Comamonas* sp., PhaZCte: *Comamonas testosteronii*, PhaZLspHS: *Leptothrix* sp. Stamm HS, PhaZSex: *Streptomyces exfoliatus*, PhaZRr: *Rhodospirillum rubrum*.

Allen bisher untersuchten extrazellulären dPHASCL- und PHAMCL-Depolymerasen besaßen die charakteristische Lipase-Consensus-Sequenz. Das Pentapeptidmotiv G-x<sub>1</sub>-S-x<sub>2</sub>-G war hoch konserviert, wobei x<sub>1</sub> in Falle der dPHASCL-Depolymerasen offenbar in Form eines Leucin ebenfalls konserviert vorlag. In Lipasen und anderen zu den Serinhydrolasen gehörenden hydrolytischen Enzymen bildet das zentrale Serin des als Lipasebox bezeichneten konservierten Sequenzmotives gemeinsam mit einer sauren Aminosäure (Aspartat, wie in allen bekannten dPHA-Depolymerasen oder Glutamat) und einem ebenfalls konservierten Histidin in der Tertiärstruktur das aktive Zentrum dieser Hydrolasen. Die funktionelle Einheit aus Serin, Histidin und Aspartat wird als katalytische Triade bezeichnet (PERSSON et al., 1989; OLLIS et al., 1992; JAEGER et al., 1994; JAEGER, 1999). Für dPHA-Depolymerasen wurde gezeigt, daß das aktive Zentrum einer solchen katalytischen Triade entspricht (HUISMAN, 1991; JENDROSSEK et al., 1995b; SCHIRMER et al., 1995; SHINOHE et

al., 1997). Das in PhaZRr vorhandene Motiv wich mit einer Substitution des Lysin durch Isoleucin<sub>18</sub> (reifes Protein) in Position x<sub>1</sub> des Konsensus der PHA-Depolymerasen ab (Abb. 96).

			*		20		*		40																																									
PhaZ3	131:	S	I	D	A	N	R	V	Y	V	T	G	L	S	A	G	A	F	M	T	A	V	M	A	A	T	P	D	V	F	A	G	A	A	P	I	A	G	G	P	Y	K	C	A	T	S	M	I	:178	
PhaZ1	142:	S	I	D	P	S	R	V	Y	V	T	G	L	S	A	G	A	F	M	T	T	V	M	A	A	T	P	D	V	F	A	G	A	A	P	I	A	G	G	P	Y	K	C	A	T	S	--	:187		
PhaZ2	142:	S	I	D	T	N	R	V	Y	V	T	G	L	S	A	G	G	Y	M	V	N	V	M	L	A	T	P	D	V	F	A	G	G	A	P	F	S	G	G	P	Y	N	C	A	T	S	--	:187		
PhaZRr	30:	A	I	D	A	D	H	V	T	V	S	G	I	S	S	G	A	Y	M	A	N	Q	F	H	V	A	H	S	A	R	V	D	G	A	G	L	V	A	G	G	L	Y	G	C	A	V	S	T	V	: 77
		s	I	D	r	V	y	V	3	G	6	S	a	G	a	5	M	vm	atypdvfa	G	a	a	p	a	G	G	p	Y	C	A	t	S																		

**Abb. 96:** Homologien der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *phaZRr* zur katalytischen Lipaseboxregion extrazellulärer dPHA-Depolymerasen des Typs 1 aus *P. lemoignei* (PhaZ1, 2 und 3). Die angegebenen Positionen beziehen sich auf das Gesamtprotein.

Eine weitere Region etwas geringerer Homologie befand sich im Bereich von D<sub>115</sub>. Der Bereich entsprach der Konsensussequenz GxxDxxV um das an der katalytischen Triade beteiligte Aspartat extrazellulärer dPHA<sub>SCL</sub>- und PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen. Die Umgebung von Histidin<sub>155</sub> als potentieller dritter Komponente der katalytischen Triade entsprach mit seiner Umgebung der minimalen Konsensussequenz der PHA-Depolymerasen H\*\*\*t (\*hydrophobe/ungeladene Aminosäure). Die Ähnlichkeiten der Umgebung des Histidin<sub>250</sub> („HG-Motiv“) mit dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen (Konsensus: \*\*\*\*HGC-Q) stützte die vorgenommene Zuordnung des Enzyms PhaZRr zur Serinhydrolase-Proteinfamilie.

Alle gefundenen Homologien waren überwiegend auf die N-terminalen Bereiche der dPHA-Depolymerasen beschränkt. Mit 329 Aminosäuren für das reife Protein war PhaZRr deutlich kürzer als die in der Homologiesuche gefundenen Depolymerasen (Abb. 95). Dem Enzym fehlte offenbar ein Abschnitt, dem als Substratbindedomäne in extrazellulären dPHA-Depolymerasen essentielle Bedeutung bei der Erkennung des parakristallinen Substrates zugeschrieben wurde (JENDROSSEK, 2001b). Die Sequenz von PhaZRr endete mit dem Motiv AGR, welches auch im Bereich der Substratbindedomänen extrazellulärer Depolymerasen vorlag und dessen Umgebung hoch konserviert schien.

Eine Zuordnung der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase zur Gruppe der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen [pfam00561] (OLLIS et al., 1992) mit Hilfe des „CD (conserved domain)-Search“-Programmes (s. 2.17.19.3.) war aufgrund gering ausgeprägter Homologien zu Proteinen bekannter Sequenz nicht möglich.

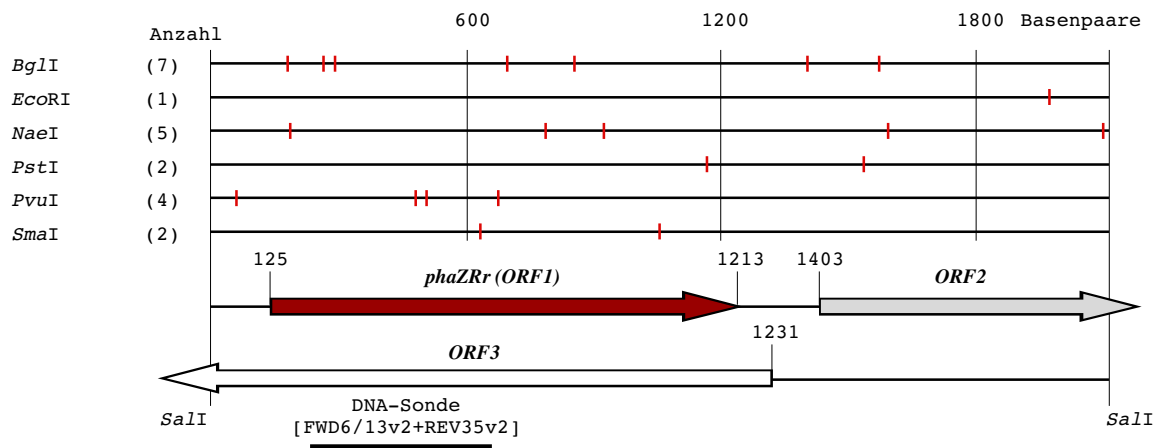
Erst die Ermittlung der potentiellen Sekundärstruktur (Abb. 89) und ein Abgleich gegen die SCOP [structural classification of proteins]-Datenbank mit dem 3D-PSSM-Programm (KELLEY et al., 2000; FISCHER et al., 1999; Kelley et al., 1999) bestätigte die Zugehörigkeit zur Superfamilie der  $\alpha/\beta$ -Hydrolasen. Es wurde eine sehr geringe Ähnlichkeit zur N-terminalen katalytischen d1sat2-Domäne einer „Zinkfinger“-Metalloprotease aus *Serratia marcescens* und der d1kapp2-ebenfalls Zinkfinger-ähnlichen Domäne einer alkalischen Protease aus *Pseudomonas aeruginosa* ermittelt. PhaZRr unterschied sich jedoch deutlich von entsprechenden Proteinen.

Alle katalytisch aktiven Reste von PhaZRr lagen in den von OLLIS et al. (1992) geforderten potentiellen Loop-Regionen. Im Bereich des katalytisch aktiven Serins besaß PhaZRr offenbar eine Coil-Struktur aus drei Aminosäuren inklusive S<sub>19</sub> und wich wie PhaZ7 und alle anderen dPHA-Depolymerase-

Isoenzyme aus *P. lemoignei* von vielen Lipasen (deren funktionelles Serin den direkten Loop zwischen vorangehendem  $\beta$ -Faltblatt und unmittelbar nachfolgender Helixstruktur bildete) ab. Weder die für dPHA-Depolymerasen postulierte Substratbindedomäne (FUKUI et al., 1988; BEHRENDTS et al., 1996; NOJIRI und SAITO, 1997; OHURA et al., 1999) noch entsprechende Linker-Regionen, welche charakteristischerweise zwischen katalytischer- und Substratbindedomäne von dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen vorkommen (Threonin-reichen Regionen im Falle von PhaZ1, PhaZ2, PhaZ3, PhaZ5 und PhaZ6; oder die Fibronectin Typ III (Fn3) Domäne der Chitinase aus *Bacillus circulans* (WATANABE et al., 1992), PhaZ4 aus *P. lemoignei*, oder PhaZ aus *Alkaligenes faecalis* waren über die Homologiesuche nachweisbar. Ein Cadherin-ähnlicher Linker, wie bei der dPHB-Depolymerase aus *P. stutzeri* (OHURA, 1999) war offenbar ebenfalls nicht vorhanden. Das Fehlen dieser für dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen charakteristischer Merkmale bestätigte die bereits aus den biochemischen Daten ersichtliche Abgrenzung der nPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZRr von anderen bekannten PHA-Depolymerasen.

### 3.14.3.1. Charakterisierung der potentiellen offenen Leserahmen ORF 2 und ORF 3

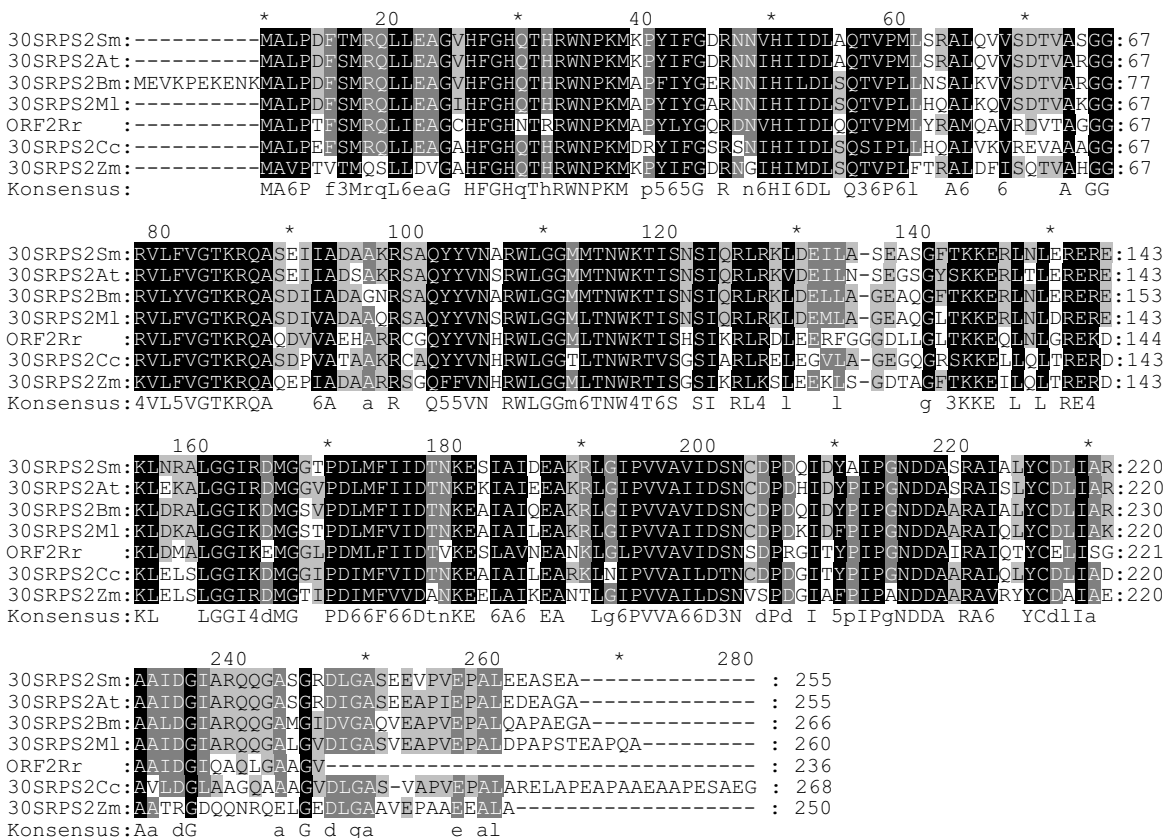
Der potentielle ORF 2 lag nur 190 Nukleotide stromabwärts von *phaZRr* in gleicher Orientierung. Eine mögliche Ribosomenbindestelle wurde –10 Basen Abstand vor dem potentiellen ATG-Startcodon lokalisiert (Abb. 91, 92). Das Stopcodon befand sich, wie auch das des hypothetischen ORF 3, welcher antiparallel zu *phaZRr* und ORF 2 orientiert vorlag, außerhalb des klonierten Genfragmentes (Abb. 97).



Fehlende Schnittstellen: PvuII BamHI SacI BglII ScaI EcoRV XbaI HindIII KpnI NdeI

**Abb. 97:** Restriktionskarte sowie Lage und Orientierung offener Leserahmen des für *phaZ7* kodierenden genomischen 2,1 kbp DNA-Fragmentes aus *R. rubrum*. Die Analyse der Restriktionsendonuklease-Schnittstellen der DNA-Sequenz bestätigte die Richtigkeit der unter 3.13. (Abb.87; 88) gefundenen Restriktionsmuster.

Auf die Übereinstimmung mit der Codonusage in *R. rubrum* wurde bereits eingegangen. Die Befunde gemeinsam mit dem Fehlen eines signifikanten Terminationssignales und dem Vorhandensein einer potentiellen  $\sigma^{70}$ -Promotorstruktur vor *phaZRr* wiesen darauf hin, daß beide Gene möglicherweise Bestandteil eines Operons sein könnten. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte bis zu 67 % Identität zu Proteinen in GenBank bei 80 % Ähnlichkeit. In allen Fällen handelte es sich um das 30S ribosomale Protein S2 der Proteinfamilie pfam00318. Der höchste Grad an Homologie bestand zu S2 aus *Mesorhizobium loti*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Shinorhizobium meliloti* und *Caulobacter crescentus* (Abb. 98). Für diese Organismen wurden im Verlaufe der durchgeführten Arbeiten aus der Genomsequenzierung auch abgeleitete Strukturgene für intrazelluläre nPHA-Depolymerasen bekannt, welche untereinander und zu einer potentiellen PHA-Depolymerase aus *R. eutropha* H16 hohe Homologien aufwiesen (4., Abb.105), jedoch keine signifikante Übereinstimmung mit PhaZRr erkennen ließen. Der hohe Grad an Homologie zu Proteinen der Datenbanken stützte die Annahme, daß es sich bei dem potentiellen ORF 2 um ein Strukturgen handeln könnte. Das mögliche Genprodukt von ORF 3 zeigte hingegen im Datenbankgleich keine signifikanten Homologien.

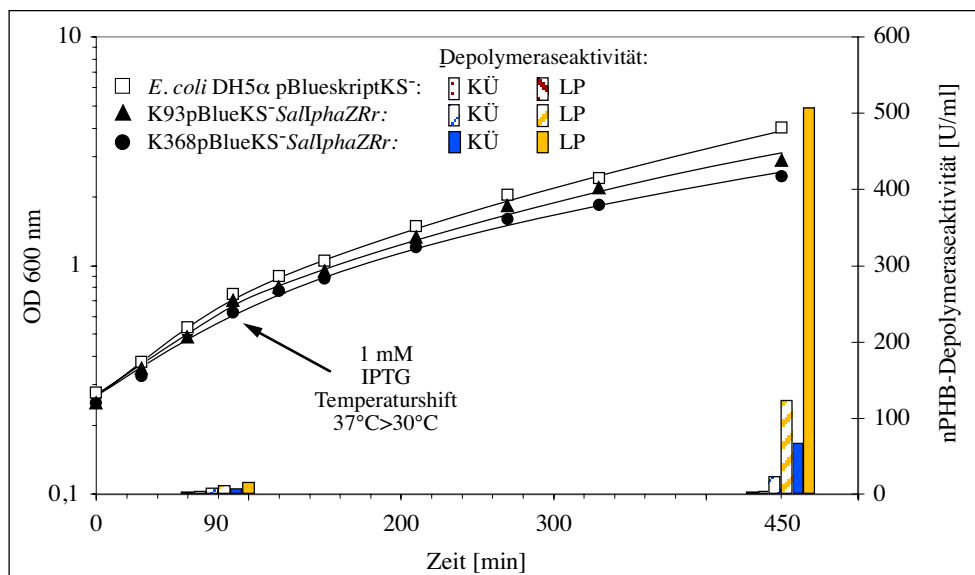


**Abb. 98:** Primärstrukturalignment der aus ORF 2 abgeleiteten Aminosäuresequenz mittels ClustalX 1.8 (THOMPSON et al., 1997). Als Matrix diente die „Gonnet Serie“. Homologe Aminosäuren wurden mit steigendem Grad der Homologie dunkler schattiert. Verwendete Kurzbezeichnungen (30SRPS2 = 30S ribosomales Protein 2); 30SRPS2M1: *Mesorhizobium loti* (KANEKO et al., 2000); 30SRPS2Sm: *Sinorhizobium meliloti*. (GALIBERT et al., 2001); 30SRPS2At: *Agrobacterium tumefaciens* C58 (WOOD et al., 2001); 30SRPS2Bm: *Brucella melitensis* (Del VECCHIO et al., 2002); 30SRPS2Cc: *Caulobacter crescentus* CB15 (NIERMAN et al., 2001); 30SRPS2Zm: *Zymomonas mobilis* (Q). Es handelt sich um hypothetische Proteine.



### 3.15. Heterologe Expression von *phaZRr* in *E. coli* DH5 $\alpha$

Mit den unter 3.13. gewonnenen Klonen K93pBlueKS-SalIphaZRr und K368pBlueKS-SalIphaZRr wurden Versuche zur heterologen Expression der rekombinanten nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* durchgeführt. Beide Klone enthielten das genomische 2,1 kbp Fragment aus *R. rubrum*, welches das komplette Strukturgen *phaZRr* sowie potentielle Promotorbereiche und flankierende Regionen umfaßte. Wie aus Abb. 88 erkennbar, sollten sich die Fragmente jedoch hinsichtlich ihrer Orientierung zum lac-Promotor des pBluescript-KS(-)-Vektors unterscheiden. Infolge der unterschiedlichen Insertorientierung stand *phaZRr* in K368 unter Kontrolle des lac-Promotors und in K93 möglicherweise unter Kontrolle des eigenen Promotors, was durch die Bildung von PhaZRr in beiden Klonen bestätigt wurde. K93 zeigte jedoch verglichen mit K368 nur 23 % der Aktivität. Ob nur eine eingeschränkten Erkennung des für *phaZRr* postulierten Promotors in *E. coli* erfolgte, oder ob die schwache Expression auf einen weiter entfernten Vektor-codierten Promotor zurückzuführen war, konnte nicht unterschieden werden. Das Muster der Aktivitätsverteilung war in beiden Klonen vergleichbar. Etwa 11 % der Gesamtaktivität fanden sich im Kulturüberstand, der dominierende Anteil konnte im Rohextrakt nachgewiesen werden. Morphologischen Unterschiede zur Kontrolle ohne *phaZRr* waren nicht zu beobachten. Die Ergebnisse belegten die Funktionalität des klonierten Gens und zeigten, daß *phaZRr* allein offenbar für die Bildung von nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymeraseaktivität hinreichend war. Die entgegengesetzten Orientierungen von *phaZRr* in K93 und K368 wurde in der DNA-Sequenzierung bestätigt.



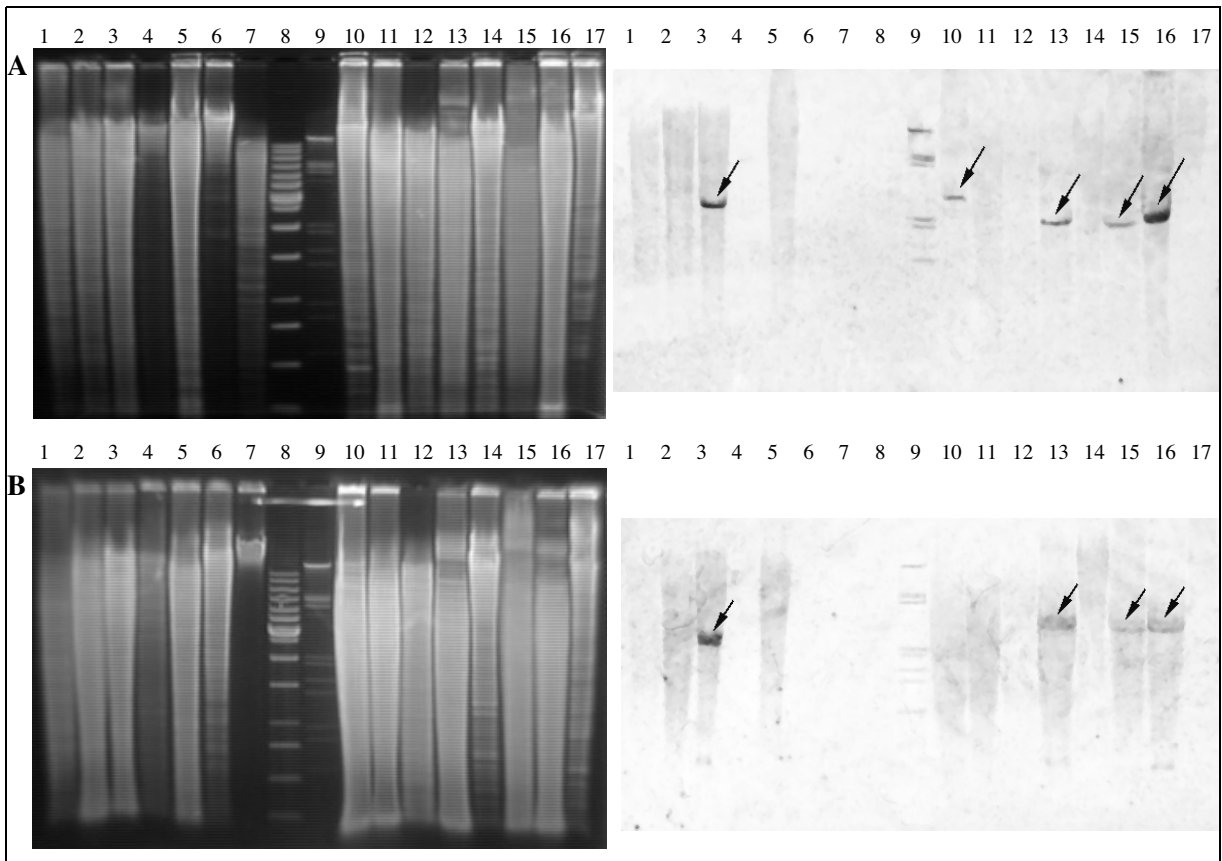
**Abb. 99:** Bildung von nPHB-Depolymeraseaktivität in rekombinanten *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Ausgehend von einer über Nacht inkubierten LB-Ampicillin-Kultur wurden je 50 ml frisches Komplexmedium mit einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,25 beimpft und bei 37°C kultiviert. Mit Erreichen einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,8 erfolgte die Induktion (1 mM IPTG) und ein Temperaturshift auf 30°C. Nach 90 und 450 min wurden je 7 ml Probe entnommen, abzentrifugiert, die Zellpellets in 7 ml Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert, durch 2-minütige Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und lösliches Rohextraktprotein (LP) durch eine zweite Zentrifugation (15 min, 5000 x g, 4°C) von Zelltrümmern abgetrennt. Je 10 µl Kulturüberstand (KÜ) oder lösliche Proteinfraktion (LP) wurden im Trübungstest mit Trypsin/Ovomucoid-behandelten nPHB-Granula (s. 2.10.1.3.) auf hydrolytische Aktivität untersucht. Aufgrund der Normierung auf das Ausgangsvolumen stellen die Werte die Aktivitätsverteilung für den jeweiligen Klon dar.

### 3.16. Untersuchungen zur Verbreitung von nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase Genen

Zur Untersuchung des Vorkommens von nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase-Strukturgenen wurden Hybridisierungsexperimente mit restriktionsverdauter chromosomaler DNA verschiedener Mikroorganismen und *phaZ7*-, *phaZRr*- sowie *phaZRe*- spezifischen Nukleotid-Sonden nach Southern-Blot bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (*phaZRe*: intrazelluläre nPHB-Depolymerase aus *R. eutropha* H16, SAEGUSA et al., 2001). Mit *phaZ7* und *phaZRr* ergaben nur die jeweiligen Kontrollen ein positives Hybridisierungssignal. Im Temperaturbereich von 30 bis 60°C konnte keine heterologe Hybridisierung der Struktursonden mit *PstI* oder *SalI* verdauter GesamtdNA aus *Pseudomonas oleovorans*, *Chromobacterium violaceum*, *R. eutropha* H16, *B. subtilis*, *Rhodobacter sphaeroides*, *B. megaterium*, *Comamonas sp.*, *Pseudomonas mendocina*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Paracoccus denitrificans*, *Alkaligenes faecalis* T1, *Alkaligenes faecalis*, *E. coli* DH5a, *R. rubrum* (*phaZ7*-Sonde) oder *P. lemoignei* (*phaZRr*-Sonde) nachgewiesen werden. Das Fehlen positiver Hybridisierungssignale mit *phaZ7*- und *phaZRr*-spezifischen Sonden steht im Einklang mit dem Fehlen signifikanter Homologien zu bekannten PHA-Depolymerasegenen und Sequenzen aus Datenbanken (Das Genome von *B. subtilis* und *E. coli* war zum Zeitpunkt der Untersuchungen vollständig, von *C. violaceum* und *R. sphaeroides* z. T. bekannt.)

Die *phaZRe*-spezifische Sonde hingegen zeigte bis 53°C neben dem Kontrollsignal bei etwa 2,5 kbp (*PstI* und *SalI*) positive Signale mit genomischen DNA-Fragmenten aus *H. pseudoflava* (3 kbp *PstI*- und 2 kbp *SalI*-Fragment), *Comamonas sp.* (2,7 kbp *SalI*-Fragment), *A. faecalis* Stamm T1 (2,9 kbp *PstI*- und 2 kbp *SalI*-Fragment) und *A. faecalis* (2,9 kbp *PstI*- und 2,1 kbp *SalI*-Fragment) (Abb. 100). Bisher sind keine nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *Comamonas sp.*, *H. pseudoflava* und *A. faecalis* Stämmen publiziert. Möglicherweise handelt es sich bei den *phaZRe*-positiven Signalen um neue nPHA-Depolymerasegene. Für *H. pseudoflava* ist aufgrund kinetischer Studien zur Synthese und Mobilisierung von PHB, P(3-HB-co-3-HV) sowie 3-HB/4-HB-Polymerblenden die Existenz mindestens einer intrazellulären nPHA-Depolymerase mit hoher Spezifität für 3-HA<sub>SCL</sub> postuliert worden (CHOI et al., 1999; YOON et al., 1999).



**Abb. 100:** Southern Hybridisierungsexperiment mit *SallI*- (A) und *PstI*- (B) verdauter Gesamt-DNA verschiedener Mikroorganismen. Links ist jeweils das 0,8 % Agarosegel, rechts der zugehörige Southern-Blot nach Hybridisierung (53°C) mit der zu *phaZRr* aus *R. eutropha* H16 homologen Sonde dargestellt. Spuren: **1**, *Pseudomonas oleovorans*; **2**, *Chromobacterium violaceum*; **3**, *Ralstonia eutropha* H16 (Positivkontrolle); **4**, *Bacillus subtilis*; **5**, *Rhodobacter sphaeroides*; **6**, *Bacillus megaterium*; **7**, *Rhodospirillum rubrum*; **8**, 1 kbp DNA-Ladder Standard; **9**, DIG III-Nukleotidstandard; **10**, *Comamonas* sp.; **11**, *Pseudomonas mendocina*; **12**, *Pseudomonas lemoignei*; **13**, *Hydrogenophaga pseudoflava*, **14**, *Paracoccus denitrificans*; **15**, *Alkaligenes faecalis* T1; **16**, *Alkaligenes faecalis*; **17**, *E. coli* DH5α.

#### 4. DISKUSSION

Biogene Polyhydroxyalkanoate (PHA) kommen in der Natur nach bisherigem Kenntnisstand in vier physikochemisch unterschiedlichen Formen vor: (1) **amorphes PHA** in sogenannten nativen PHA-Granula [**nPHA**]; (2) extrazelluläres **parakristallines** (denaturiertes) **dPHA** sowie (3) in Form transmembraner Kanäle als „**complexing/channel**“-**PHB** [**cPHB**] im Verbund mit Polyphosphat und  $\text{Ca}^{2+}$  und (4) als bisher nicht näher charakterisierte, möglicherweise kovalent an **Proteine gebundene kurzkettige Oligomere** [**OHA**] vor.

In Bakterien werden PHA bei Überschuß an Kohlenstoffquelle unter Mangel eines essentiellen Nährstoffes wie z. B. Stickstoff oder Phosphat in Form granulärer Einschlußkörperchen synthetisiert, welche PHA in amorpher Form - umgeben von einer Hülle aus **Phospholipiden**, strukturellen **Phasinproteinen** sowie funktionellen Proteinen (**PHA-Synthasen**, **intrazellulären Depolymerasen**) enthalten (LUNDGREN et al., 1965; STEINBÜCHEL et al., 1995; MAYER et al., 1996; siehe auch Einleitung, Abb. 1). Die strukturelle Integrität der PHA-Granula ist hierbei entscheidend für die Aufrechterhaltung der amorphen Struktur des Polyesters (LUNDGREN et al., 1965; GRIEBEL et al., 1968; BARNARD und SANDERS 1989; AMOR et al., 1991). Für eine Mobilisierung des intrazellulär vorliegenden osmotisch inerten energiereichen Speicherstoffes wurde die Existenz intrazellulärer nPHA-Depolymerasen postuliert, welche zum Zeitpunkt der PHA-Hydrolyse Granula-assoziiert vorliegen sollten (MERRICK und DOUDOROFF, 1961, 1964; SAITO et al., 1992, 1995; HANDRICK und JENDROSSEK, 1998; HANDRICK et al., 2000).

Gelangen nPHA-Granula nach Zelltod durch Lyse in die Umwelt, kommt es im Zuge eines Verlustes oder der Beschädigung der Hülle infolge der Einwirkung von Detergentien, Phospholipasen oder Proteasen sowie physikalischem Streß (Einfrieren, Auftauen in wässriger Umgebung) zur kinetisch bestimmten Kristallisation des Polymers (MERRICK et al., 1965; GRIEBEL und MERRICK 1971; CORNIBERT und MARCHESSAULT, 1975; DE KONING und LEMSTRA, 1992). Das extrazellulär vorliegende parakristalline hydrophobe und wasserunlösliche PHA wird durch eine Gruppe von sekretorischen Hydrolasen, die **extrazellulären PHA-Depolymerasen** ( $\text{dPHA}_{\text{SCL}}$ -Depolymerasen, E.C. 3.1.1.75;  $\text{dPHA}_{\text{MCL}}$ -Depolymerasen E.C. 3.1.1.76), in Mono- und/oder kurzkettige Oligomere hydrolysiert. Die Hydrolyseprodukte können anschließend von den Zellen aufgenommen und metabolisiert werden. Durch eine Natriumhypochloritbehandlung aus ganzen Zellen gewonnene PHA zeigen infolge der Aufbereitung ebenfalls eine parakristalline Struktur (die Kristallinität liegt bei ca. 60-70 %). Für bakterielles kristallines PHB wurde von CORNIBERT und MARCHESSAULT (1972) und PAZUR et al. (1998a; 1998b) eine linksgängige  $2_1$ -Helix mit einer Identitätsperiode von 0,6 nm bei nahezu senkrecht zur Estercarbonylebene orientierten Helixachse nachgewiesen. Die Struktur konnte in lamellaren und gestreckt fibrillären Bereichen des Polymers mittels Röntgenbeugungsanalysen gezeigt werden. Die Fähigkeit zum Abbau von parakristalliner dPHA ist ähnlich der Fähigkeit zur PHA-Synthese unter Mikroorganismen offenbar weit verbreitet und findet sich neben Gram-negativen (*P. lemoignei*, *Comamonas* sp., *A. faecalis*, *Ralstonia pickettii*)

und Gram-positiven Bakterien (*Streptomyces exfoliatus* K10, *B. megaterium*) auch in Pilzen (*Aspergillus fumigatus*; *Penicillium funiculosum*) (Für eine Übersicht s. 1. sowie BRANDL et al., 1995; JENDROSSEK, 2001b; JENDROSSEK, 2001c).

Über die Synthese und den Abbau von cPHB ist bisher nur wenig bekannt. cPHB scheint unabhängig vom evolutiven Entwicklungsstand sowohl in Pro- als auch Eukaryonten nahezu ubiquitär verbreitet vorzukommen. In *E. coli* wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von cPHB-Transmembrankanälen und der  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelten Kompetenz beschrieben (HUANG und REUSCH, 1995; DAS und REUSCH, 2001; DAS et al., 1997; 2002). Vergleichende Untersuchungen mit Kanälen aus synthetischem Polymer (cPHB/PP<sub>i</sub>), welche bei Temperaturen oberhalb von 40°C im Gegensatz zu anderen Ionenkanälen eine Leitfähigkeitsabnahme zeigten, weisen auf eine Proteinassoziation der Polymere *in vivo* hin (DAS et al., 2002). Auch in *Streptomyces lividans* konnten cPHB/Polyphosphat-enhaltende Kaliumkanäle nachgewiesen werden (REUSCH, 1997).

Während 3-HB in natürlichen Systemen (so auch in nPHA-Granula) ausschließlich in der *R*-Konfiguration vorliegt, konnte unlängst in BSA möglicherweise kovalent gebundenes *R*- und *S*-3-HV neben *R*-3-HB nachgewiesen werden (SEEBACH und FRITZ, 1999). Die Autoren vermuten neben den bekannten posttranslationalen Aminosäuremodifikationen (z.B. Farnesylierung und Palmitoylierung an Cys; Phosphorylierung an Ser, Thr, His, Asp, Tyr; Biotinylierung an Lys; Glykosylierung an Ser, Thr; Übersicht in LOTTSPREICH und ZORBAS, 1998) eine mögliche Hydroxyalkanoylierung von Aminosäureseitenketten mit 3-HB- oder 3-HV-Oligomeren. Zur Funktion, Synthese oder Depolymerisation des Protein-assoziierten PHA ist bisher jedoch nichts bekannt.

#### 4.1. PhaZ7 - eine neuartige extrazelluläre nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *P. lemoignei*

*P. lemoignei*, unlängst reklassifiziert und aufgrund von 16S rRNA-Analysen der Burkholderiagruppe der  $\beta$ -Proteobakterien zugeordnet (JENDROSSEK, 2001a), nimmt mit mindestens sechs extrazellulären dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen (JENDROSSEK et al., 1997) und der ebenfalls ins Kulturmedium sekretierten nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 (HANDRICK et al., 2001) bei zugleich sehr eng begrenzten metabolischen Fähigkeiten (auf wenige organische Säuren beschränktes Substratspektrum, s. 1.4.2.1.) eine besondere Stellung unter allen bisher charakterisierten PHA-abbauenden Mikroorganismen ein. Wie mittels nativer Gelelektrophorese beobachtet werden konnte, sekretierte der Organismus neben dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen und PhaZ7 mindestens drei weitere Enzyme mit signifikanter nPHA-hydrolytischer Aktivität ins Medium, so daß möglicherweise insgesamt eine noch größere Zahl bisher nicht charakterisierter PHA-hydrolysierender Enzyme vorhanden sein könnte, über deren Struktur bisher nichts bekannt ist. Die in den Vorversuchen mit partiell gereinigten Fraktionen der dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ2 beobachtete Aktivität mit ataktischem (statistisch *R,S*-konfiguriertem und daher amorphem) PHB waren eindeutig auf die extrazelluläre PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei* zurückzuführen. PhaZ7 konnte aus dem

Kulturüberstand auf Succinat gewachsener Kulturen mittels der unter 3.3. beschriebenen Kombination von Fällung und Ionenaustauschchromatographie sowie isoelektrischer Fokussierung bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden. Die Methode ermöglichte zugleich die parallele Gewinnung der dPHA-Depolymerase-Isoenzyme PhaZ2 und PhaZ5 in höherer Reinheit im Vergleich zu MÜLLER (1992) und BRIESE (1997) mit guten Ausbeuten (PhaZ5 33,8 % *versus* 14 %). Die offenbar geringere Ausbeute bei der Gewinnung von PhaZ2 ging einher mit einer stärkeren Aufreinigung des Enzyms, was insbesondere für eine Diskriminierung zwischen dPHASCL- und nPHASCL-Depolymeraseaktivität unbedingt erforderlich war. Der für PhaZ7 beobachtete scheinbare Anstieg der nPHASCL-Depolymeraseaktivität mit nPHB-Granula aus *R. eutropha* H16 nach Fällung und Ionenaustauschchromatographie an CM-CL6B-Separose um 30 % kann möglicherweise auf die hemmende Wirkung der Gegenwart hoher Fremdproteinkonzentrationen oder auch möglicher hoher PHA-Depolymerase-Isoenzymkonzentrationen zurückgeführt werden.

Für dPHB-Depolymerasen aus *A. faecalis*, *C. testosteroni*, *P. stutzeri* und *R. pickettii* beschrieben MUKAI et al., 1993; 1994 eine Abnahme der Aktivität oberhalb von 3 µg Enzym/ml und erklärten den Befund mit einer zunehmenden Abdeckung der Polymersubstratoberfläche durch das Enzym. Oberhalb einer Grenzkonzentration führt möglicherweise die Bindung weiterer Enzymmoleküle über die postulierte Substratbindedomäne zu einer sterischen Hinderung, so daß die Substratesterbindung nicht mehr vom katalytischen Zentrum erkannt wird. Im Falle von PhaZ2 erreichte die dPHB-Depolymeraseaktivität bei einer Proteinkonzentration von 3 µg/ml ermittelt in Form des normierten Massenverlustes definierter PHA-Filme (pro cm<sup>2</sup>-Filmoberfläche) ein Plateau (TOMASI et al., 1986). Bei Verwendung von im Verlaufe der vorliegenden Arbeiten für die Bestimmung der dPHB-Depolymeraseaktivitäten von dPHASCL-Depolymerasen eingesetzten dPHB-Suspensionen kam es im Standardtest (2.10.1.2.) bei Enzymkonzentrationen oberhalb von 4 µg/ml zu einem Aktivitätsabfall. Bei Versuchen zur Enzymkinetik der Hydrolyse von nPHA durch gereinigte PhaZ7 konnte ein ähnlicher Effekt in Titrationsexperimenten mit aus *R. eutropha* H16 und aus rekombinanten *E. coli* präparierten nPHB-Granula beobachtet werden. Beim enzymatischen Abbau von nPHB durch PhaZ7 handelt es sich offenbar, wie für den Abbau denaturierter PHB-Filme beschrieben, um eine signifikant oberflächenabhängige Reaktion, welche nicht durch klassische Michaelis-Menten-Kinetik erklärt werden kann. In einem von TIMMINS et al. (1997) vorgeschlagenen Modell wird neben der Enzymkonzentration auch die Konzentration des Polymersubstrates und die von MUKAI et al. (1993) vorgeschlagene Adsorptionsgleichgewichtskonstante einbezogen. Dem Modell folgend, sollte bei niedrigen Enzymkonzentrationen die Zunahme der Hydrolysegeschwindigkeit linear zur Zunahme der Enzymkonzentration verlaufen. Übersteigt die Enzymkonzentration die Summe aus Adsorptionsgleichgewichtskonstante und Polymeranfangskonzentration verhält sich die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  genau umgekehrt proportional zur Enzymkonzentration. Die Autoren überprüften das Modell erfolgreich am Beispiel einer dPHB-Depolymerase aus *Aspergillus fumigatus* M2A. Ausgehend von den Erfahrungen mit verschiedenen

PHA-Präparationen (dPHA, nPHA, artifizielle PHA-Granula) erwies sich jedoch auch das diskutierte Kinetikmodell zur Beschreibung der nPHA<sub>SCL</sub>-Hydrolyse nur bedingt geeignet. In Abhängigkeit von der jeweiligen PHA-Granulapräparation schwankten die mittleren Durchmesser der nPHB-Granula bereits innerhalb einer Donorspezies in Abhängigkeit von den individuellen Bedingungen im einzelnen Kulturkolben. PHA-Granula aus rekombinanten *E. coli*, welche die Gene *phaCAB* mit oder ohne *phaP* (Phasinprotein) des PHB-Operons aus *R. eutropha* (KIDWELL et al., 1995; ZHANG et al., 1994) trugen, wiesen bei Fehlen der Phasinproteine oft nur wenige Polymergranula bis 1 µm Durchmesser auf. Die verfügbare Granulaoberfläche variierte selbst bei vergleichbarer Polymermenge somit erheblich. Aus diesem Grunde wurden unter 3. durchgeführte Meßreihen zur Enzymcharakterisierung nach Möglichkeit mit einer Polymergranulapräparation bei optimalem Enzym-Substrat-Verhältnis von 2,5 bis 25 ng PhaZ7 zu 100 mg nPHB aus *R. eutropha* H16 oder *E. coli* (*phaCABP*) gearbeitet.

Nach einer Chromatofokussierung an Mono P in einigen Fällen beobachtete Doppelbanden könnten trotz identischer N-Termini mögliche Isoformen von PhaZ7, mit leicht divergierenden pI-Werten repräsentieren, für die keine quantitative Trennung erreicht wurde. Für dPHA-Depolymerase PhaZ5 aus *P. lemoignei* konnte das Auftreten von Isoenzymen (NAKAYAMA et al., 1985) durch isoelektrische Fokussierung im Gel oder 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die pI-Werte der Isozyme unterschieden sich um 0,15 pH-Einheiten (BRIESE et al., 1994b; BEHRENDTS et al., 1996). Auch der Einbau alternativer Aminosäuren in Folge einer „nonsense/missense“ Suppression, wie für *E. coli* beschrieben, wäre denkbar (LEWIN, 1995; VOET und VOET, 1995). Unter Anzuchtbedingungen in Batchkulturen mit Succinat, welche für die Expression/Sekretion großer PHA-Depolymerasemengen optimiert wurden, kam es infolge eines Anstiegs des pH-Wertes durch Substratverbrauch zur Alkalisierung des Mediums. Oberhalb pH 7,0 trat infolge des Fehlens eines effektiven Transportsystems für deprotoniertes Succinat<sup>2-</sup> Substratmangel ein, was zum Wachstumsstop und Derepression der Depolymerasebildung infolge des Kohlenstoffmangels führte (STINSON und MERRIK, 1974; NAKAYAMA et al., 1985; TERPE et al., 1999) und zugleich Ursache der bei „nonsense/missense“-Suppressionen typischen Mangelversorgung mit einzelnen t-RNAs sein könnte.

#### **4.1.1. Spezifität der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 – Einfluß des Kristallinitätsgrades des Polyester-Substrates auf die Hydrolysierbarkeit**

Das Substratspektrum der extrazellulären nPHA-Depolymerase PhaZ7 zeigte erstaunlicherweise ein von allen bisher bekannten extrazellulären PHA-Depolymerasen deutlich abweichendes Muster. Während die für extrazelluläre dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen typischen Substrate dPHB oder dPHV sowie das Copolymer 3-HB-co-3-HV (BRIESE et al., 1994) nicht hydrolysiert wurden, besaß PhaZ7 offenbar eine bemerkenswerte Präferenz für amorphe PHA, welche zur Entdeckung des Enzymes führte. Die prinzipielle Hydrolysierbarkeit von nPHA<sub>SCL</sub> war offenbar unabhängig von der Art des PHA-Donororganismus und der Spezies-spezifischen Zusammensetzung der Hüllmembran nativer

Granula. Sowohl nPHB aus *R. eutropha* H16, rekombinaten *E. coli* (*phaCAB*, mit und ohne *phaP*) als auch aus *B. megaterium* zeigten in Gegenwart von PhaZ7 eine deutliche Trübungsabnahme der PHA-Suspension. Die Befunde korrelierten mit einer signifikanten enzymabhängigen Säurefreisetzung in Titrationsexperimenten, was die Annahme einer Ester-hydrolytischen Reaktion rechtfertigt. Im Gegensatz zu nPHAS<sub>CL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum*, war weder eine Vorbehandlung der Granula mit Proteasen noch mit einer in *R. rubrum* postulierten Aktivatorkomponente erforderlich. Daß tatsächlich die amorphe Konformation des Polymers das entscheidende Kriterium für die Hydrolysierbarkeit von PHAS<sub>CL</sub> durch PhaZ7 darstellte, stützen die Ergebnisse mit nach HOROWITZ und SANDERS (1994; 1995) hergestellten artifiziellen PHB- und PHV-Granula. Wurde die *in vivo* vorliegende Hüllmembran von nPHA in artifiziellen Granula durch die Detergentien Natriumcholat oder SDS ersetzt, führte der Zusatz von PhaZ7 zur enzymabhängigen Säurefreisetzung bei pH 7,5 und 9,0. Die Substitution der Granulahülle durch N-Ketyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid (CTAB) hingegen schien das PHA vor einem Angriff durch PhaZ7 zu schützen. Da die physikalische Konformation des Polymers in artifiziellen PHA-Granula sich unter den genannten Bedingungen, wie durch Weitwinkel-Röntgenbeugungs(WAXS)-Analyse und 100-MHz <sup>13</sup>C-NMR-Spektren gezeigt, identisch zum amorphen Polymer *in vivo* verhält (BARNARD und SANDERS, 1989; KAWAGUCHI und DOI., 1990; HOROWITZ und SANDERS, 1994, 1995), sollte die unterschiedliche Hydrolysierbarkeit in der individuellen Detergenz-abhängigen Oberflächenstruktur begründet sein. Während Cholat und SDS typische anionische Detergentien darstellen, handelt es sich im Falle von CTAB um ein kationisches Detergenz, dessen Verwendung als Suspensionsstabilisator zu einer positiven Ladung der Granulaoberfläche führt. Möglicherweise basiert die gefundene Inaktivität von PhaZ7 mit CTAB-stabilisierten PHB/PHV-Granula auf einer schlechten physikalischen Interaktion von Protein und artifiziell PHA unter den beschriebenen Versuchsbedingungen. Die Oberflächenladung nativer PHA-Granula aus Mikroorganismen wurde bisher nicht untersucht. Bei Analysen der Zusammensetzung der nativen Granulamembran fanden sich neben organismenspezifischen Phasinproteinen und Granula-assoziierten PHA-Synthasen (STEINBÜCHEL et al., 1995; MAYER et al., 1996) auch eine Minorität von Phospholipiden (im Falle nativer PHB-Granula aus *R. eutrophus* H16: Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol, Diphosphatidylglycerol) (HOROWITZ und SANDERS, 1994). Nach GRIEBEL et al. (1968) bestehen PHB-Granula aus *B. megaterium* aus 97,5 % (w/w) PHB, 2 % (w/w) Protein und nur 0,5 % Phospholipiden. Aus biochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen resultierende Modelle der Granulastruktur (STEINBÜCHEL et al., 1995; MAYER et al., 1996; MAYER und HOPPERT, 1997; s. 1.3.) zeigen eine mögliche Orientierung hydrophoberer Reste zum Polymer im Granulainneren und die Lokalisation polarer (möglicherweise ebenfalls netto negativ geladener) Reste, wie z. B. der Phosphatgruppen der Phospholipide, exponiert auf der Granulaoberfläche. Die hydrolytische Aktivität von PhaZ7 mit artifiziellen durch Cholat- bzw. SDS-Stabilisierung negativ geladenen PHAS<sub>CL</sub>-Granula korreliert mit dem beobachteten Verhalten des Enzymes an Ionentauschersäulen sowie in der



Chromato- (Mono P) und Flüssig- (Rotofor®) Fokussierung. Die Daten lassen unter Aktivitätstestbedingungen (pH 7,5 bis 9,0) auf ungeladenes bis schwach positiv geladenes Enzym schließen (Bindung an Mono P oder DEAE erst ab pH 10,5).

Der wesentliche Unterschied zwischen dPHB und nPHB besteht in der Konformation der Polyester. Während in dPHB amorphe Bereiche der Polymerkette neben geordneten helikalen Abschnitten vorliegen und die Kettenelemente eine typische lamellare Struktur ausbilden, zeigen PHB-Ketten im nPHB eine charakteristische ungeordnete Beschaffenheit. Im Falle des partiell kristallinen dPHB (Kristallinitätsgrad  $\approx$  60%) liegt ein amorpher Anteil mit nPHB vergleichbaren Eigenschaften ( $T_g = 0$  bis  $2^\circ\text{C}$ ) neben der kristallinen Fraktion mit einem Schmelzpunkt von  $170^\circ\text{C}$  vor (SCANDOLA et al., 1988). Ist PhaZ7 zur Unterscheidung zwischen parakristallinem und amorphem Polyester in der Lage, so sollte das Fehlen einer Hydrolyseaktivität mit dPHB entweder durch eine fehlende Substraterkennung oder durch die physikalische Beschaffenheit des Polymers (Vorhandensein einer kristallinen Phase) erklärt werden können. Um das Vorhandensein parakristalliner Bereiche im Substrat zweifelsfrei ausschließen zu können und die Bedeutung des Kristallisationsgrades zu klären, wurde durch Polymerisierung racemischen 3-Hydroxybutyrolactons ein vollständig Protein- und Oberflächenstruktur-freies ataktisches PHB (aPHB) hergestellt. Dieses Polymer ist aufgrund des statistischen Einbaues beider 3-HB-Enantiomere (*R*-3-HB und *S*-3-HB) vollständig amorph. Eine zeitabhängige Kristallisation, wie sie für nPHB aus Mikroorganismen in wässrigem Milieu unter Berücksichtigung einer möglichen Beschädigung der Granulähülle nicht vollständig auszuschließen ist (MERRICK et al., 1965; LUNDGREN et al., 1964), wurde für ataktisches PHB nicht beobachtet (KURCOK et al., 1992; JEDLINSKI et al., 1995). Das synthetische Polymer wurde in Form definierter Polymerfilme in Abbaubersuchen eingesetzt. PhaZ7 zeigte eine im Vergleich mit zu Kontrollzwecken mitgeführten dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen (PhaZ2, PhaZ5) achtfach höhere spezifische Aktivität. Das Aktivitätsverhältnis kehrte sich auf dPHB-Filmen um. Die Hydrolyse entsprach den mit PHA der entsprechenden physikalischen Konformation beobachteten Aktivitäten. Die gefundene Aktivität von PhaZ7 mit aPHB, nPHB und nPHV sowie amorphen artifiziellen PHAS<sub>SCL</sub>-Granula korreliert unabhängig von der An- oder Abwesenheit bestimmter Membranstrukturen mit dem amorphen Zustand des Polymers. Waren kristalline Bereiche vorhanden, fand kein hydrolytischer Angriff statt, was auch entsprechende Titrationsexperimente bestätigten. Die gefundene Hydrolyse von aPHB legte gemeinsam mit in späteren Versuchen zum Hydrolysemechanismus gewonnenen und nachfolgend diskutierten Ergebnissen nahe, daß das Enzym zur *endo*-Hydrolyse des Polyesters in der Lage sein sollte, da eine Spaltung der Esterbindung nur im Falle zweier benachbarter *R*-Enantiomere, nicht jedoch zwischen *S*-*S* oder *R*-*S*-Bindungen beobachtet werden konnte. Da *S*-Enantiomere statistisch über die Polymerkette verteilt vorlagen, hätte die Reaktion im Falle eines strikt exohydrolytischen Mechanismus mit Erreichen einer *R*-*S* oder *S*-*S* Bindung zum Erliegen kommen müssen. Das Spektrum oligomerer Hydrolyseprodukte in der ESI-MS bis hin zum Nonamer nach Behandlung ataktischer PHB-Filme mit PhaZ7 korreliert mit dem

erwarteten statistischen Vorkommen von *S*-Untereinheiten in synthetischem *a*PHB (KOWALCZUK, persönliche Mitteilung).

PhaZ7 ist möglicherweise die Ursache einer von MERRICK et al., 1999 im Zuge eines Kontrollexperimentes zur Wirkung einer intrazellulären PHA-Depolymerase-Aktivator-Komponente aus *R. rubrum* beobachteten Hydrolyse artifizieller PHB-Granula durch partiell gereinigte Kulturüberstände aus *P. lemoignei*. Die Autoren beschreiben eine Rate des Abbaues artifizieller PHB, die der Hydrolyse nativer PHB-Granula aus *B. megaterium* vergleichbar ist.

Die Behandlung von *n*PHB mit nichtionischen Detergentien (3.7.10.) hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Aktivität von PhaZ7. Wurden native Granula hingegen mit SDS behandelt, kam es offenbar zu einer Erhöhung der Abbaubarkeit. Diese Beobachtung könnte ihre Ursache in der Überlagerung mehrerer Effekte haben. Die erfolgreiche Substitution der *n*PHA-Hülle nativer Granula durch ionische Detergentien (Cholat, SDS), die eine negative Oberflächenladung in artifiziellen Granula bewirken, unter Erhalt der Hydrolysierbarkeit stützt die Annahme einer möglicherweise verbesserten Enzymbindung an die Granuloberfläche. Zudem zeigten GRIEBEL et al. (1968), GRIEBEL und MERRICK (1971), daß es infolge der Behandlung von *n*PHB-Granula mit SDS zur teilweisen Zerstörung der Oberflächenstruktur kommt, verursacht durch eine Störung der Integrität struktureller und funktioneller Granula-assoziiierter (PHA-affiner) Proteine, sowie dem Rearrangement der Phospholipidbestandteile der Granulamembran, so daß ein Angriff auf die Polymerketten erleichtert werden könnte.

Wie unter 3.7.6. gezeigt, wurde *n*PHA aus *R. eutropha* H16 auch durch die *d*PHASCL-Depolymerase PhaZ5 aus *P. lemoignei* mit etwa dreifacher Rate bezogen auf parakristallines *d*PHB abgebaut, jedoch nur, wenn zuvor eine teilweise Zerstörung der Granulamembran durch Vorbehandlung mit Protease erfolgte. Diese Beobachtung wurde mit *d*PHASCL-Depolymerase PhaZ2 bestätigt und stützt die von TOMASI et al. (1996) für PhaZ5 aus *P. lemoignei* sowie für PHB-Depolymerase aus *A. faecalis* T1 (KOYOMA und DOI, 1997) veröffentlichten Befunde, einer Zunahme der Hydrolyseraten bei Abnahme der Kristallinität des Polymers. Von DOI et al. (1995); TOMASI et al. (1996) sowie KOYOMA und DOI (1997) konnte eine bevorzugte Hydrolyse in amorphen Bereichen parakristalliner PHA nachgewiesen werden. Bei vergleichbarem Kristallinitätsgrad des Gesamtpolymers ist die Hydrolyserate offenbar von der Größe der Sphärolite und Kristalle abhängig. Entsprechend einer Abnahme der Kristallinität wird in Copolymeren eine Zunahme der Hydrolyseraten [P(3-HB-*co*-4-HB) > PHB > P(3-HB-*co*-3-HV)] beobachtet (MUKAI et al., 1992; YAMADA et al., 1993). Bei Verwendung von Copolymeren aus 3-Hydroxybutyrat und 3-Hydroxypropionat (3-HB-*co*-3-HP) steigt die Hydrolysierbarkeit des Polyesters durch PhaZ aus *Alcaligenes faecalis* T1 bis zu einem 3-HP-Anteil von 30 % mit abnehmendem Kristallinitätsgrad (PHB-Kristalltyp) und sinkender „glass to rubber transition“ Temperatur (CAO et al., 1999). Bei Unterschreiten von 20 % Kristallanteil (>30 mol% 3-HP) im Copolymer sinkt die Hydrolyserate

wieder. Dieser Effekt beruht offenbar auf dem sensiblen Gleichgewicht zwischen der mit abnehmender Kristallinität zunehmenden Abbaurrate und einer Verminderung der Adsorptionsrate der dPHB-Depolymerase bei Erhöhung des amorphen Polymeranteils (ABE et al., 1998; SCANDOLA et al., 1997; CAO et al., 1998, 1999). ABE und DOI (2002) beschrieben eine Zunahme der Hydrolyserate für statistische Copolymere aus 3-HB und 3-Hydroxyalkanoaten (C8-C12), welche mit steigender Kohlenstoffatomzahl der Seitenketten korrelierte. Der Einbau längerer 3-HA stört offenbar die Ausbildung der 3-HB-typischen Kristallstrukturen und führt zu einer Verringerung der Dicke lamellarer Strukturbereiche. Eine Zunahme der enzymatischen Hydrolyserate mit aufgrund steigenden 3-HP Anteils in 3-HB-co-3-HP zunehmend amorphem Charakter des Copolymers ist unlängst auch für PhaZ aus *Acidovorax* sp. nachgewiesen worden (WANG et al., 2002). Das Enzym zeigt maximale Aktivität mit Copolyestern eines Kristallinitätsgrades unter 5 %. Ein über 84 mol% liegender 3-HP-Anteil des Copolymers (3-HB-co-3-HP) führt schließlich wieder zur Zunahme der Kristallinität (3-HP-Kristalltyp) und zur Abnahme der Hydrolyserate. Für eine Bindung der dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen wurde die Notwendigkeit eines „kristallinen Supports“ postuliert, welcher der Substratbindedomäne der Depolymerase als Erkennungsstelle dient (DOI et al., 1992). Modelle zum Mechanismus *endo*-hydrolytischer dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen gehen von einer bevorzugten Enzymbindung in kristallinen Bereichen des Polymers aus, wobei die Substraterkennung über die Substrat-bindende Domäne (C-Terminus bei PHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen; N-Terminus der PHO-Depolymerase aus *P. fluorescens*) mit gewisser Spezifität erfolgen sollte, da - wie von verschiedenen Autoren für dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen gezeigt - eine Anlagerung weder an Chitin noch an kristalline Zellulose nachweisbar war (BEHRENDTS et al., 1996; OHURA et al., 1999; KASUYA et al., 1999). Aus den vorliegenden Daten kann das Vorhandensein mikrokristalliner Bereiche in mit Trypsin behandelten nativen nPHA-Granulpräparationen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Hierfür wären zeitabhängige direkte Kristallinitätsbestimmungen mittels WAXS, <sup>13</sup>C-NMR oder Schmelzpunktbestimmungen nötig (amorphes Polymer besitzt keinen Schmelzpunkt, erst mit dem Auftreten kristalliner Bereiche sollten entsprechende DSC-Signale sichtbar sein). Die unerwartet hohen Hydrolyseraten der dPHA-Depolymerasen in Titrationsexperimenten mit oligomeren PHA (3 bis 8 Monomereinheiten pro Kette) zeigten, daß der geforderte Support möglicherweise für die unmittelbare hydrolytische Aktivität nicht zwingend erforderlich sein könnte. Diese Annahme wird durch Beobachtungen anderer Autoren gestützt, welche bei Deletion der potentiellen Substratbindedomäne von dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen keinen oder nur geringen Einfluß auf die *p*-Nitrophenylacylesterase- und Oligomerhydrolaseaktivität beschrieben (FUKUI et al., 1988; NOJIRI und SAITO, 1997; BRIESE und JENDROSSEK, 1998; HIRAISHI et al., 2000). Für die Hydrolyse der Polymerester durch dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen hingegen scheint die Gegenwart kristalliner Bereiche essentiell. Unlängst wurde aufgrund von Ergebnissen aus der Untersuchung des Abbaues von PHB-Einkristallen infolge einer beobachteten partiellen Auflösung der Kristallstruktur durch katalytisch inaktive PhaZ<sub>Afa</sub> aus *A. faecalis*, aufbauend auf den Erkenntnissen von DOI et al. (1994) und

KASUYA et al. (1995), ein neuer Dreistufenmechanismus für den Abbau von dPHB vorgeschlagen. Offenbar kommt es nach (1) initialer Anlagerung der Depolymerase zu einer (2) Enzym-vermittelten Lösung von van der Waals Bindungen zwischen PHB-Ketten innerhalb hochgeordneter Strukturbereiche und erst im nachfolgenden Schritt (3) werden die „ausgelösten“ Polymerketten hydrolytisch gespalten (MURASE et al., 2002). NOJIRI und SAITO (1997) schlugen vor, daß (im Falle einer räumlich nahen Orientierung) die in der Primärstruktur der katalytischen Domäne folgende Fibronectin Typ III (Fn3) Linkerdomäne von PhaZAfa an einer Lösung kristalliner Strukturen auf der Polymeroberfläche direkt beteiligt sein könnte. Eine Deletion der Domäne führte zum Verlust der Hydrolyseaktivität mit dPHB. Fn3-Domänen kommen in einer Reihe extrazellulärer Polymerhydrolasen aus Prokaryoten darunter Cellulasen, Chitinasen und Glycoamylasen vor (LITTLE et al., 1994). Die erwähnten Enzyme zeigen wie dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen einen klassischen Aufbau aus Signalpeptid, katalytischer Domäne (mit Lipaseboxmotiv), Linkerdomäne (Fn3-, Thr- oder Cadherin-Typ) sowie einer Substratbindedomäne (1., Abb. 2). Von Cellulasen ist bekannt, daß die Substratbindedomänen dieser Enzyme zur raschen Auflösung von Cellulosefasern und der Freisetzung feinerer Polymerfaserstrukturen führen (TOMME et al., 1995, 1996). Interessant erscheint an dieser Stelle eine genauere Betrachtung der für PhaZ1, PhaZ2, PhaZ3, PhaZ5 und PhaZ6 aus *P. lemoignei* beschriebenen etwa 40 Aminosäuren langen Threonin-reichen Linkerdomäne. Innerhalb der Struktur treten gehäuft Cluster von zwei bis sechs repetitiven Threoninresten auf. Auch in PhaZ7 finden sich innerhalb der letzten 50 Aminosäuren 10 Threoninreste, jedoch offensichtlich weniger geklustert als in den Thr-Regionen extrazellulärer dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen. Die Hydroxylgruppen-tragende Seitenkette des Threonin erinnert an die Struktur des Hydroxyterminus von Poly(3-Hydroxybutyrat) und könnte neben einer reinen Linker-Funktion als Bindeglied zwischen substratbindender und katalytischer Domäne der dPHA-Depolymerasen direkt an einer Interaktion mit dem Polymer in der von NOJIRI und SAITO (1997) beschriebenen Weise beteiligt sein. Eine Substitution der Fn3 Domäne in PhaZAfa durch die Threonin-reiche Region von PhaZ5 ergab ein funktionell offenbar nicht beeinträchtigtes Hybridprotein.

Die fehlende oder nur sehr geringe ( $< 3 \text{ mg Polymer} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$  pro mg Protein) Aktivität der dPHA-Depolymerasen PhaZ2 und PhaZ5 mit amorphem ataktischen Polymer stützt die postulierte Notwendigkeit eines „kristallinen Support“ für diese Enzymgruppe. Unlängst wurde von HE et al. (2001) am Beispiel von PHB-Depolymerasen aus *A. faecalis* T1 und *P. stutzeri* gezeigt, daß bereits die Bindung der dPHA-Depolymerasen an ataktisches PHB limitierend sein könnte. Zur näheren Spezifizierung der Befunde wurden sogenannte „Blends“ aus aPHB ( $T_g = 5^\circ\text{C}$ ; „glass to rubber transition temperature“) mit einem ebenfalls ataktischen Polymethylmethacrylat (PMMA;  $T_g = 115^\circ\text{C}$ ) sowie ataktischem Poly-(*R,S*-Lactid) (aPLA;  $T_g = 58^\circ\text{C}$ ) hergestellt. Resultierende Polymerfilme wiesen in Abhängigkeit vom relativen Verhältnis der Polymere einen verglichen mit aPHB deutlich erhöhten und verbreiterten  $T_g$  – Bereich (29 bis  $63^\circ\text{C}$ ) auf. Die dPHB-Depolymerasen banden bei  $37^\circ\text{C}$  sowohl an reines PMMA und PLA als auch an entsprechende Blends mit aPHB. An

aPHB konnte bei 37°C keine Bindung festgestellt werden. Der von den Autoren beobachteten Massenverlust definierter Blend-Filme in Gegenwart von Enzym lag mit  $0,027 \text{ mg cm}^{-1} \text{ h}^{-1}$  im Bereich der von SCANDOLA et al. (1997) mit aPHB/Poly(*R,S*- $\beta$ -Butyrolacton-co-pivalolacton) und FOCARETE et al. (1998) mit aPHB/Polycaprolacton beschriebenen Freisetzungsraten wasserlöslicher Hydrolyseprodukte. Offenbar konnte in diesen Fällen die Gegenwart amorpher Blendmaterialien eine Enzymbindung vermitteln. Die Hydrolysetemperatur hatte entscheidenden Einfluß auf die Abbaubarkeit der Blends. Eine Temperaturerhöhung oberhalb der Tg-Werte führte zum signifikanten Abfall der Hydrolyseraten, wohingegen die enzymatische Hydrolyse der parakristallinen dPHB-Kontrollen entsprechend dem Temperaturverhalten der Enzyme stieg.

Da im Gegensatz hierzu PhaZ7 eindeutig zur Depolymerisation von aPHB und nPHA<sub>SCL</sub> ohne Gegenwart eines kristallinen Supports in der Lage ist und folglich an das Polymer auch bei den im Experiment verwendeten Temperaturen 37°C binden muß, könnte die Ursache einer fehlenden Aktivität mit dPHA im Umkehrschluß auch in einer schlechten oder fehlenden Bindekapazität für parakristallines dPHB vermutet werden. Zur Klärung dieser Frage wurden unter 3.7.8. entsprechende Bindeversuche durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, daß PhaZ7 wie dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ2 zur Bindung an dPHB in der Lage ist und somit die amorphe Konformation des Polymersubstrates und nicht eine möglicherweise ineffektive Bindung die Hydrolysierbarkeit entscheidend beeinflussen sollte.

Im Rahmen der Bindeversuche konnte gezeigt werden, daß die Aktivitäten der dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen PhaZ2 und PhaZ5 mit dPHB in Gegenwart von PhaZ7 signifikant sanken, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen relativ zum dPHB-Substrat eingesetzter nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasemenge und Reduktion der dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase-abhängigen dPHB-Hydrolyserate bestand. MUKAI et al. (1992) beschrieben für *P. lemoignei* die Bildung eines PHB-Depolymerase-Inhibitors (PDI) bei Wachstum auf Succinat. Aus einem beobachteten Fehlen des PDI bei Anzucht auf PHB und in der Annahme, daß es in Abwesenheit des Polymersubstrates für *P. lemoignei* wenig sinnvoll erscheinen sollte, größere Mengen Depolymerase bei Wachstum auf löslichen Kohlenstoffquellen zu bilden, schlossen die Autoren, daß die physiologische Funktion des PDI-Proteins in einer Inhibierung der katalytischen Reste von dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen bestehen könnte. Postuliert wurde eine mögliche Hemmung durch reversible Bindung an das nukleophile Serin der Depolymerasen, um letztere in Abwesenheit des Polymers (auf Succinat) zu stabilisieren. Vergleichbar mit den Ergebnissen während der Reinigungsexperimente unter 3.3 beobachteten die Autoren eine signifikante Zunahme der Gesamt-dPHB-Depolymeraseaktivität mit fortschreitender Reinigung und schlußfolgerten hieraus auf eine Abtrennung der Inhibitorkomponente. Das angegebene apparente Molekulargewicht des zugeordneten Proteins von 35 kDa (SDS-PAGE) und das beschriebene Verhalten an Kationentauschersäulen (Elutionsreihenfolge: PhaZ5, PhaZ2, PhaZ7) sowie die konzentrationsabhängige Hemmung der dPHB-Hydrolyse stimmen mit den Beobachtungen für PhaZ7 überein. Wie unter 3.7.9. gezeigt, hemmen jedoch neben PhaZ7 auch komplexe Medien (LB;

NB, Super-Rich-Medium) und andere Proteine (BSA) die dPHB-Depolymeraseaktivitäten von PhaZ2 und PhaZ5. Daß es sich möglicherweise um eine vollkommen unspezifische Hemmung infolge der „Maskierung“ des Polymersubstrates handeln könnte, wird durch die Beobachtung gestützt, daß unter identischen Versuchsbedingungen bei einer Substitution des Polymersubstrates durch löslichen *p*-Nitrophenylbutyratester (PhaZ7 besitzt geringe Aktivität mit *p*-Nitrophenyloctanoat, während *p*-Nitrophenylbutyrat offenbar nicht hydrolysiert wird) die Esteraseaktivität von PhaZ2 und PhaZ5 auch Gegenwart anderer Peptide oder Proteine inklusive PhaZ7 unverändert blieb. Auch in Abbauversuchen mit Produkten der nPHA<sub>SCL</sub>-Hydrolyse durch PhaZ7 und löslichen 3-HB-Oligomeren konnte trotz Gegenwart der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase keine Hemmung der Oligomer-Hydrolyseaktivitäten von PhaZ2 und PhaZ5 beobachtet werden. Eine von MUKAI et al. (1992) postulierte Inhibierung des katalytischen Zentrums von PhaZ2 und PhaZ5 kann somit ausgeschlossen werden. Basierend auf diesen Ergebnissen erscheint die von den Autoren angenommene Funktion einer Inhibierung der dPHA-Depolymeraseaktivität auf Succinat unwahrscheinlich. Wie unter 3.4. durch Aktivitätsbestimmung und SDS-PAGE eindeutig nachgewiesen wird PhaZ7 sowohl bei Wachstum mit organischen Säuren (Pyruvat, Succinat, Acetat, 3-Hydroxybutyrat, Valerat) als auch in Gegenwart von dPHA<sub>SCL</sub> (dPHB, dPHV) gebildet. Dieser Befund widersprach den Ergebnissen von MUKAI et al. (1992). Das von den Autoren beschriebene scheinbare Fehlen des Proteins im Kulturüberstand von Polymersubstrat-Medien ist aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse jedoch eher auf die gezeigte Bindung von PhaZ7 an parakristalline PHB zurückzuführen. Infolge der von MUKAI et al. durchgeführten Abzentrifugation des verbliebenen Polymers wurde (bei größerer Restpolymermenge) PhaZ7 offenbar quantitativ gemeinsam mit dPHB aus dem Kulturüberstand abgetrennt. Entgegen der Annahme der Autoren erscheint das gefundene Expressionsmuster für PhaZ7 und dPHA-Depolymerasen aus *P. lemoignei* durchaus sinnvoll. In Gegenwart löslicher Kohlenstoffquellen ist die Bildung extrazellulärer PHA-Depolymerasen offenbar reprimiert (SCHIRMER et al., 1993; JENDROSSEK, 2001b). Die Bildung von extrazellulärer PHA-Hydrolyseaktivität wird in den meisten Fällen mit einhergehender Verlangsamung des Kulturwachstums unter Substrat (Kohlenstoff)-mangelbedingungen dereprimiert (DELAFIELD et al., 1965a, 1965b; STINSON und MERRICK, 1974; NAKAYAMA et al., 1985; JENDROSSEK et al., 1993b). Von TERPE et al. (1999) konnte gezeigt werden, daß auch die ungewöhnlich starke Expression von dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen durch *P. lemoignei* bei Wachstum mit Succinat in Abwesenheit der Substratpolyester auf Kohlenstoffmangel beruht. *P. lemoignei* besitzt demnach ein Carriersystem für einfach protoniertes Succinat. Eine typisch Wachstumsphasen-abhängige Bildung ist für eine Reihe sekretorischer Proteine beschrieben (PRIEST, 1992). *P. aeruginosa* zeigt bezüglich LipA/H ein ähnliches Wachstumsphasen-abhängiges Sekretionsmuster (STUER et al., 1986), wie *P. lemoignei* für dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen. Wie in einer Reihe weiterer pathogener Mikroorganismen (*Staphylococcus aureus*, HEINRICHS et al., 1996, McNAMARA und IANDOLO, 1998; *Xenorhabdus neatophilus*: DUNPHY et al., 1997) sind offenbar stets Derivate der als Autoinduktoren

des Biolumineszenzsystemes bekannten Homoserinlactone sowie zur LuxR-Familie verwandte Proteine an der Regulation beteiligt. Für die Expressionsregulation wird ein dem „quorum sensing“ in *Vibrio harveyi* (CAO und MEIGHEN, 1993) ähnlicher Mechanismus angenommen. Die Regulation erfolgt auf der Ebene der Transkription. Für dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* war die Beteiligung eines Autoinduktionsmechanismus bisher nicht nachweisbar (HANDRICK, unveröffentlicht). Untersuchungen zum potentiellen Transkriptionsaktivator *phaR* stromabwärts von *phaZ5* zeigten bei Wachstum auf Succinat eine hohe pH/Kohlenstoffverfügbarkeits-Abhängigkeit der PhaR-Expression, wobei die Ergebnisse auf eine positive Autoregulation schließen lassen (TERPE, 1999). Die von *phaR* abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte nur im Bereich der potentiell DNA-bindenden C-terminalen Domäne Ähnlichkeiten mit typischen „quorum sensing“-Transkriptionsregulatoren. Für den N-Terminus, welcher in LuxR homologen Proteinen für die Bindung acylierter Homoserinlactonderivate verantwortlich ist (FUQUA et al., 1996; FUQUA und GREENBERG, 1998), konnten keine Homologien nachgewiesen werden.

Die Bildung von PhaZ7 verlief auf Acetat, Pyruvat, Valerat, Succinat und dPHA<sub>SCL</sub> analog der Sekretion von PhaZ2 und PhaZ5. Die von anderen Autoren beschriebene Repression der dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasebildung auf 3-HB (DELAFIELD et al., 1965a; 1965b) war für PhaZ7 nicht nachweisbar. Die Bildung der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase schien auf organischen Säuren stets strikt von der Wachstumsphase abhängig zu sein. Die substratunabhängige Expression von PhaZ7 auf parakristallinen dPHA<sub>SCL</sub> (welche kein Substrat für das Enzym darstellen) zeigt zudem, daß kein direkter Zusammenhang zwischen pH und Enzyymbildung besteht, sondern offenbar der Mangel an verfügbarem löslichem Substrat zur verstärkten Bildung von PhaZ7 wie auch von dPHA-Depolymerasen führt. Über die molekularbiologische Regulation der PhaZ7-Expression ist bisher nichts bekannt.

PhaZ7 ist offenbar die erste isolierte extrazelluläre PHA-Depolymerase, die nicht in der Lage ist, parakristalline extrazellulär vorliegende dPHB und/oder dPHV zu hydrolysieren und widerspricht der bisher vereinfachend angenommenen Hypothese, daß die Hydrolyse amorpher nPHA in biochemisch intakten nativen PHA-Granula eine auf intrazelluläre nPHA-Depolymerasen beschränkte Fähigkeit darstellen sollte.

Für die enzymatische Hydrolyse amorpher Poly-(3-Hydroxyalkansäureester), bestehend aus Monomeren kurzer Kettenlängen (C4 und C5; nPHA<sub>SCL</sub>) durch PhaZ7 konnte eine begünstigende Wirkung alkalischer Milieubedingungen beobachtet werden. Im Neutralbereich und mit weiter abnehmendem pH kam die Reaktion offenbar zum Erliegen. Diese für PHA-Depolymerasen typische Eigenschaft wurde bereits für eine Reihe dPHA-hydrolysierender Enzyme nachgewiesen. So besitzen dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase-Isoenzyme aus *P. lemoignei* ihre maximale Aktivität im Bereich von pH 8,0 (NAKAYAMA et al., 1985; MÜLLER und JENDROSSEK, 1993; BRIESE et al., 1994b). Für dPHA-Depolymerasen aus *Comamonas* sp. (JENDROSSEK et al., 1993a, 1995a), *C. acidovorans* YM1609 (KASUYA et al., 1997) sowie *C. testosteroni* Stamm YM1004 (MUKAI et al., 1993) und Stamm

ATSU (KASUYA et al., 1994) lagen die pH Optima stets zwischen pH 8,5 bis 10,0. Bisher sind nur wenige Ausnahmen bekannt, wobei es sich insbesondere im Falle der dPHA-Depolymerasen aus Pilzen um eine Art der Anpassung an das natürliche Habitat handeln könnte (pH 5,5 bis 7,0 für PhaZ aus *R. pickettii*, YAMADA et al., 1993; SHIRAKI et al., 1995; *Penicillium funiculosum*, BRUCATO und WONG 1991; *Paecilomyces lilacinus* D218, ODA et al., 1997). Die Optima der Polymerhydrolyse durch PhaZ7 lagen mit pH 9,5-10 im oberen Drittel des aus der Literatur bekannten Bereiches. Zugleich zeigte das Enzym bei pH Werten oberhalb pH 8,0 bis pH 12,0 eine bemerkenswerte Stabilität, wie sie insbesondere charakteristisch für lipolytische Enzyme ist (JAEGER et al., 1999). Esterasen der Gruppe Lip2 (LipA-Typ, Pfam01674) zeigen wie im Falle von LipA und LipB aus *Bacillus subtilis* 168 mit einer maximale Aktivität bei pH 10 und Stabilität der Enzyme bis pH 12 ein ähnliches Verhalten (LESUISSE et al., 1993). EGGERT et al. (2000) zeigten für LipA und LipB bei Lagerung in Glycin/NaOH eine Erhöhung der Stabilität bei Raumtemperatur um Faktor 10. Die hohe pH-Stabilität von PhaZ7 ging einher mit einem für PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen relativ hohen Temperaturoptimum von 65°C. Für die Mehrheit der daraufhin untersuchten PHA-Depolymerasen lag das Optimum der Polymerhydrolyse im Bereich von 37°C (*R. pickettii*, YAMADA et al., 1993; *C. acidovorans*; KASUYA et al., 1997; *Marinobacter* sp.; KASUYA et al., 2000) bis 55°C (*P. stutzeri* YM 1414, MUKAI et al., 1994). Von Kasuya et al. (1994) wurde in *C. testosteroni* ATSU die PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase mit dem bisher höchsten Temperaturoptimum beschrieben. Das Enzym war wie PhaZ7 jedoch bei optimaler Hydrolysetemperatur (70°C) instabil. Verglichen mit den bekannten dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* stellt PhaZ7 das Enzym mit dem höchsten Temperaturoptimum dar. Der von MÜLLER und JENDROSSEK (1993) angegebene Wert von 65°C für PhaZ5 konnte in Kontrollexperimenten nicht bestätigt werden. Das Wildtypenzym besaß ein mit rekombinanter PhaZ5 (JENDROSSEK et al., 1995b) vergleichbares Temperaturoptimum von 55°C. Die optimale Hydrolysetemperatur dürfte jedoch unter physiologischen Bedingungen kaum relevant sein, da *P. lemoignei* bei Temperaturen oberhalb von 41°C kein Wachstum mehr zeigt.

Das beobachtete Molekulargewicht von 36,2 kDa für PhaZ7 lag im unteren Größenbereich bisher beschriebener dPHA<sub>SCL</sub> Depolymerasen, welche typischerweise als Monomere einer Größe zwischen 40 und 70 kDa vorliegen (JENDROSSEK, 2001b) Die kleinste beschriebene extrazelluläre dPHA<sub>SCL</sub> Depolymerase aus *P. funiculosum* zeigte unter reduzierenden Bedingungen ein Mw von 37 kDa (BRUCATO und WONG, 1991), wobei es sich jedoch um eine offenbar glycosylierte Form des Enzyms handelte. Nur PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerase aus *P. fluorescens* ist mit nur 25 kDa signifikant kleiner als PhaZ7.

Anders als für die dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen PhaZ2 und PhaZ5 aus *P. lemoignei* (JENDROSSEK et al., 1995b; BRIESE et al., 1994b) konnte für PhaZ7-Wildtypenzym im Antikörpertest keine Glycosylierung nachgewiesen werden. Auch die für PhaZ2, PhaZ4, PhaZ5 und PhaZ6 beschriebene bis zu 40 %-ige Diskrepanz zwischen apparentem (SDS-PAGE) und aus der Gensequenz abgeleitetem Molekulargewicht war für PhaZ7 nicht zu beobachten. Von BRIESE et al.



(1994) und JENDROSSEK et al. (1995b) konnte anhand der rekombinanten dPHA-Depolymerasen gezeigt werden, daß ein Kohlenhydratanteil für die PHA-Hydrolyseaktivität der Enzyme nicht erforderlich ist. Die Autoren vermuten eine ähnlich stabilisierende Wirkung der Glykokomponenten hinsichtlich Proteolyse und Temperatur, wie sie mittlerweile für  $\beta$ -1,4-Glycanase aus *Cellulomonas fimi* (ONG et al., 1994) und Lipase Lip4 aus *Candida rugosa* (TANG et al., 2001) nachgewiesen wurde.

Anders als bei den zu Beginn der vorliegenden Arbeit bekannten dPHA-Depolymerasen handelt es sich bei PhaZ7 offenbar um einen neuen Typus einer thermoalkalophilen Hydrolase mit hoher Spezifität für amorphe PHA<sub>SCL</sub>. Das Enzym besaß weder signifikante Protease- noch Nuklease-, Lipase- (Olivenöl, polare und unpolare Lipidfraktionen aus Bakterien und Eigelb), Cutinase-, Amidase/Nitrilase- oder Polycaprolactonaseaktivität und schien ausschließlich zur Hydrolyse von nPHA in der Lage.

#### 4.1.2. PhaZ7 – eine Hydrolase des Serinhydrolase-Typs

Bisher untersuchte extrazelluläre dPHA-Depolymerasen gehören der Familie der Serinhydrolasen an (JENDROSSEK, 2001b). Ein Charakteristikum dieser Enzymfamilie, zu der neben dPHA-Depolymerasen weitere Esterasen wie Lipasen, Cutinasen, Chitinasen und Proteasen zählen, ist die spezifische Hemmbarkeit durch Substratanaloga, welche die betreffenden Enzyme durch kovalente Bindung an das nukleophile Serin im katalytischen Zentrum irreversibel inhibieren (OLLIS et al., 1992; JAEGER et al., 1994).

Während PMSF im Falle von PhaZ7, wie für die überwiegende Zahl der PHA-Depolymerasen (MÜLLER und JENDROSSEK, 1993; SCHIRMER et al., 1995, SHIRAKI et al., 1995), offenbar zu den weniger effektiven Hemmstoffverbindungen zählt, trat mit DFP ab 0,11 mM/ nmol Enzym eine 50 %ige irreversible Inhibierung der nPHB-Hydrolyse durch PhaZ7 auf. Auch dPHA Depolymerase aus *C. testosteroni* (Hemmung bei 1  $\mu$ M DFP; MUKAI et al., 1993b), PhaZ2 (Hemmung oberhalb 19  $\mu$ M DFP) und PhaZ5 (Hemmung oberhalb 62 nM DFP) aus *P. lemoignei* sowie PhaZAfa (Hemmung bei >60 nM DFP) (MUKAI et al., 1992) besitzen hohe Sensitivität gegenüber DFP. BRUCATO und WONG (1991) zeigten für dPHB-Depolymerase aus *Penicillium funiculosum* die Inhibierung ab 0,5  $\mu$ M DFP. Verglichen mit den halbmaximalen Hemmkonzentrationen für dPHA-Depolymerasen erscheint die notwendige DFP Konzentration für PhaZ7 relativ hoch, jedoch wurden von anderen Autoren keine Angaben zum DFP/Enzym-Verhältnis publiziert. Selbst mit DFP lag das wirksame Verhältnis Inhibitor zu Enzym bei PhaZ7 weit oberhalb einer stöchiometrischen Äquivalenz, was auf eine (unter beschriebenen Bedingungen) möglicherweise schlechte Zugänglichkeit oder höhere sterische Spezifität des katalytischen Zentrums deutet. In Hemmversuchen mit PHB-Depolymerase aus *C. testosteroni* wurden auch bei 1000-facher PMSF-Konzentration verglichen mit der inhibitorischen DFP-Menge noch signifikante Restaktivitäten beobachtet (MUKAI et al., 1993b). Die geringe Wirksamkeit von PMSF könnte ebenfalls auf einer schlechten

Zugänglichkeit des aktiven Serin in der Tertiärstruktur der katalytischen Tasche für den im Vergleich zu DFP weitaus „sperrigeren“ Inhibitor beruhen. Von BRIESE et al. (1998) wurde eine nahezu vollständige Hemmung von PhaZ5 aus *P. lemoignei* durch 10  $\mu$ M Dodecansulfonylchlorid (DDSC) beschrieben. Dieser bereits erfolgreich in der Strukturaufklärung einer Lipase aus *Candida rugosa* eingesetzte Hemmstoff (GROCHULSKI et al., 1994) besitzt eine aliphatische Seitenkette, welche neben einer spezifischen Interaktion mit dem katalytischen Zentrum von PHA-Depolymerasen allerdings auch zu einer Hemmung der dPHB-Hydrolyse infolge einer unspezifischen Anlagerung an hydrophobe Enzymdomänen führen könnte (BRIESE, 1997). Die nPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZ7 wurde durch DDSC nicht signifikant beeinflusst.

Der mit einer vollständigen Inaktivierung der Esterase-/Depolymeraseaktivität verbundene Aminosäureaustausch S<sub>136</sub> gegen Alanin (BRAAZ, persönliche Mitteilung) zeigt zweifelsfrei eine Beteiligung des betreffenden Serinrestes an der Hydrolysereaktion durch PhaZ7 und bestätigt das im Hemmtest beobachtete Verhalten. Entsprechende Substitution von D<sub>242</sub> und H<sub>306</sub> führten in den mutierten Enzymen ebenfalls zum vollständigen Aktivitätsverlust, was die Beteiligung einer katalytischen Triade (bestehend aus S<sub>136</sub>, H<sub>306</sub> und D<sub>242</sub>) an der beschriebenen Hydrolyse von nPHB nahelegt. Bei PhaZ7 handelt es sich offenbar eindeutig um eine Serinhydrolase.

#### 4.1.3. PhaZ7, dPHA-Depolymerasen und Lipasen – Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Trotz eines deutlich abweichenden, offenbar eng auf nPHAS<sub>SCL</sub> spezialisierten Substratspektrums, zeigt PhaZ7 begrenzte signifikante Sequenzhomologien zu Lip2-Esterasen (PF 01674) und Lipasen der Lipasefamilien 1.4 und 1.5 (ARPIGNY und JAEGER, 1999). Neben aus der Genomsequenz abgeleiteten Proteinen aus *Caenorhabditis elegans*, über deren Natur und Funktion bisher nichts bekannt ist, finden sich in weiterer Verwandtschaft Lipasen aus der Gattung *Bacillus*. Erstaunlicherweise besitzt PhaZ7 keinerlei signifikante Ähnlichkeit zu bekannten PHA-Depolymerasen einschließlich der im Verlauf dieser Arbeit ebenfalls charakterisierten nPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* und den unlängst veröffentlichten untereinander deutlich homologen nPHB-Depolymerase-Sequenzen aus *R. eutropha* H16 (SAEGUSA et al., 2001), *Methylobacterium extorquens* AM1 (KOROTKOVA und LINDSTROM, 2001) und *Paracoccus denitrificans* (GAO et al., 2001). Bis auf die Gegenwart der für die katalytische Aktivität essentiellen Aminosäuren unterscheiden sich dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen und PhaZ7 offenbar grundlegend, was abweichende biochemischen Eigenschaften und Substratspezifitäten erklären könnte. Die Ähnlichkeit zu LipA und LipB aus *B. subtilis* (obgleich weniger ausgeprägt als zu hypothetischen Proteinen aus *Caenorhabditis*) überrascht, da PhaZ7 weder mit Triolein (1,2,3-Tris-[cis]-9-octadecenoylglycerol), einem typischen Substrat der Triacylglycerol-Lipasen (E.C. 3.1.1.3.), noch mit Tributyrin (Substrat von Esterasen, Lipasen mit Präferenz für Acyl-C  $\leq$  10) hydrolytische Aktivität zeigt. Besonders auffällig ist die Homologie im Bereich der potentiellen Oxyaniontasche und der Umgebung des katalytisch aktiven Serins. Die Abfolge A-H-S<sub>136</sub>-M-G wich von dem allen dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen

gemeinsamen Motiv G-L-S- $X_{aa2}$ -G (mit  $X_{aa2}$  = S oder A) (JENDROSSEK und HANDRICK, 2001) und dem Lipasebox-Konsensusmotiv G- $X_{aa1}$ -S- $X_{aa2}$ -G (OLLIS et al., 1992; JAEGER et al., 1994) ab und entsprach der Konsensussequenz A- $X_{aa1}$ -S- $X_{aa2}$ -G für *Bacillus*-Lipasen der Subfamilien 1.4 und 1.5 (ARPIGNY und JAEGER, 1999). Dieser Austausch des Glycins der katalytischen Triade durch ein Alanin stellt offenbar ein *Bacillus*-Lipase spezifisches Charakteristikum dar. Die für nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei* gefundene Sequenz entsprach exakt dem Motiv von Lipasen der Gruppe 1.4. Alle zugehörigen Enzyme besitzen die charakteristische  $\alpha/\beta$ -Hydrolasestruktur (NARDINI und DIJKSTRA, 1999; VAN POUDEROYEN et al., 2001). Wie für LipA und LipB aus *B. subtilis* 168 bereits erwähnt, zeichnen sich *Bacillus*-Lipasen durch hohe pH-Optima im Bereich pH 8,0 bis 10,0 und entsprechende Alkalistabilität bis pH 12,0 aus.

**Tab. 27:** Alignment der Umgebung katalytisch aktiver Aminosäuren in Phaz7 mit verwandten Serinhydrolasen.

Enzym	Pos. (S)	Serin	Pos. (D)	Asparat	Pos. (H)	Histidin	Pos. (H)	Oxyaniontasche	Referenz/Accession Nr. (GenBank)	
nPHA <sub>SC1</sub> -Depolymerase Phaz7 aus <i>P. lemoignei</i>	136	TGKSQVDIVAHSMGVMSL	242	TLSAGFKDQVGCATP	306	TNGVGHFRTRKTNT	47	PVIFIHGNGDNAI	HANDRICK et al., 2001; AY026355	
<b>Lipasefamilie 1.4:</b>										
<i>B. subtilis</i> 168 LipA	78	TGAKKVDIVAHSMGGANTL	133	TSTYSSADMLVMNYL	156	IHGVGHIIGLLYSS	a) 10	PVVMVHGIIGGASF	DARTOIS et al., 1992; M74010	
<i>B. subtilis</i> 168 LipB (Esterase)	78	TGAKKVDIVAHSMGGANTL	134	TSTYSLNDQIVNSL	157	LYGIGHIIGLLSNS	11	PVVLVHGISSGASY	KUNST et al., 1997; EGGERT et al., 2000; G69652	
<i>B. licheniformis</i> Esterase	77	TGAKKVDIVAHSMGGANTL	133	TSVYSSADLLIVNSL	155	IHGVGHIIGLLTSS	10	PVVMVHGIIGGASY	ALVAREZ-MACARIE et al., 1999; U35855	
<i>B. pumilis</i> Lipase	77	TGAKKVDIVAHSMGGANTL	133	TSVYSSADLLIVNSL	155	IHGVGHIIGLLTSS	10	PVVMVHGIIGGASY	A34992	
<b>Lipasefamilie 1.5:</b>										
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	112	KRGRIRIHIIAHSQGGQTAR	316	TTLVNMVDFTRDFD	357	TYNVDHLEIIGVD	13	PVILLHGFRTGWR	CHO et al., 2000; AF134840	
<i>G. stearothermophilus</i>	113	KRGRVHIIAHSQGGQTAR	317	TTLVNMVDFTRDFD	358	TYNVDHLEVIGVD	14	PVILLHGFRTGWR	KIM et al., 1998; U78785	
<i>G. thermocatenuatus</i>	113	KRGRVHIIAHSQGGQTAR	317	TTLVNMVDFTRDFD	358	TCNVDDHLEVIGVD	14	PVILLHGFRTGWR	SCHMIDT-DANNER et al., 1996; X95309	
<b>PF01674 (Lip2)</b>										
<b>zugeordnete Proteine<sup>b)</sup></b>										
<i>C. elegans</i> F45E6.4	157	TKAKQINIVVAHSMGVSIAR			c)			74	PVFIHGNSSDAL	NM_077695
<i>C. elegans</i> C04B4.3	157	TGARHIDIIVAHSMGVSIAR			c)			74	PVFIHGNSSDAL	NM_077648
<i>C. elegans</i> F10F2.3	135	TGAKKVDIVAHSVGVPLMR			c)			49	PVIFIHGSSGDAL	NM_065540
<b>Konsensus:</b>		T-----VDIVAHSxG-----		T-----D-xV----		--gvgHx-----		P*xv*xHG-g---		
<b>Konsensus E.C. 3.1.1.3.</b> (Triacylglycerol-Lipasen mit Spezifität für Acylesterseitenketten-C ≥ 12)		-V-x*xGhSxG-		-D-xV		-H*-		-x*xHG*-		
<b>Konsensus dPHA<sub>SC1</sub>-Depolymerasen</b>		Id-q*-V-GISxG-		** -g--D*xTV		g-H-xP---g		L*x*xHGc-Q	JENDROSSEK, 2001; JENDROSSEK und HANDRICK, 2001;	

a) VAN POUDEROYEN et al. (2001) zeigten durch Röntgenstrukturanalyse, daß die Amidgruppen von Ile12 and Met78 an der Ausbildung der Oxyaniontasche beteiligt sind.

b) Aus der Genomsequenz von *C. elegans* abgeleitete und aufgrund von Sequenzhomologien mit Typ 2 Lipasen in der PFAM01674 zusammengefaßt. Bisher ist kein Nachweis zur Substratspezifität erfolgt.

c) Aufgrund geringerer C-terminaler Homologien zu bekannten Serinhydrolasen nicht vorhergesagt.

Das Substratspektrum insbesondere der Enzyme aus der Lipaseunterfamilie 1.4 unterscheidet sich von „klassischen“ Lipasen und entspricht eher einem Esterase-ähnlichen Muster. Während Triolein (C18:1) von LipA nur mit geringer Rate und von LipB nicht hydrolysiert wird, zeigen beide Enzyme signifikante Aktivität für Triacylglyceride kürzerer Kettenlänge ( $C \leq 10$ ) mit maximaler Aktivität für Tricaprylin (C8:0) (EGGERT et al., 2000; 2001). Auch Tributyrin (C4:0), Tricaproin (C6:0) und Tricaprin (C10:0) werden mit spezifischen Aktivitäten  $> 200$  U/mg umgesetzt. Entsprechende *p*-Nitrophenylester mit Acylseitenketten von C6 bis C18 wurden von beiden Enzymen ohne eindeutige Präferenz mit  $> 150$  U/mg hydrolysiert. Lipase aus *B. licheniformis* besitzt eine hohe Spezifität für *p*-Nitrophenylcaproat (C6) (ALVAREZ-MACARIE, 1999). Wie erwähnt, zeigt PhaZ7 weder mit Triolein noch mit Tributyrin signifikante Aktivität. *p*-Nitrophenylester hingegen werden in Abwesenheit von Lösungsvermittlern mit der höchsten Aktivität für *p*-Nitrophenyloctanoat (C8;  $< 0,4$  U/mg) umgesetzt. Die absoluten Werte liegen jedoch um mehr als vier Größenordnungen unter der ermittelten enzymatischen Säurefreisetzung aus nPHB und somit deutlich niedriger als für LipA und LipB beschrieben. Mit zunehmender Länge des Acylrestes sinkt die Aktivität wieder. Andere daraufhin getestete PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen wie PhaZ5 aus *P. lemoignei* hydrolysierten *p*-Nitrophenylester mit C2 oder C4-Seitenketten mit vergleichbarer Rate (0,50-0,58 U/mg). Für *p*-Nitrophenylcaprylat sinkt die spezifische Aktivität um Faktor 10 (MÜLLER, 1992), was mit der strikten Spezifität für PHA<sub>SCL</sub> korreliert. Für die PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerase aus *P. fluorescens* hingegen steigt die Hydrolyserate, wie für PhaZ7 beobachtet, über *p*-Nitrophenylhexanoat zum *p*-Nitrophenyloctanoat kontinuierlich an, bleibt aber danach (im Gegensatz zu PhaZ7) auch mit *p*-Nitrophenyldecanoat und *p*-Nitrophenylpalmitat auf mit dem C8-Acylester vergleichbarem Niveau (SCHIRMER, 1994).

Im Gegensatz zu Lipasen und extrazellulären dPHA-Depolymerasen wurde die nPHB-Depolymeraseaktivität von PhaZ7 auch in Gegenwart hoher Konzentrationen (20 %) ionischer und nichtionischer Detergentien nicht vermindert (3.7.10.). Zwar sind aus der Literatur Beispiele einer Aktivierung von Lipasen durch nichtionische Detergentien bekannt (HERMOSO et al., 1996; JAEGER et al., 1999), wobei die Anwesenheit von nichtionischen Detergentien zur Stabilisierung der „offenen“ Konformation der Lipase führt, eine Resistenz gegenüber ionischen Detergentien oder wie im Falle von PhaZ7 eine Aktivierung in Gegenwart von SDS ist jedoch nicht beschrieben. Die Mehrzahl der Lipasen ist, soweit daraufhin untersucht, äußerst sensitiv gegenüber ionischen Detergentien (STUER et al., 1986; GILBERT, 1993; SVENDSEN et al., 1995; LEE et al., 1999). SCHMIDT-DANNERT et al. (1996) fanden für Lipase aus *Geobacillus thermocatenulatus* eine vollständige Inaktivierung in Gegenwart von 1 % (v/v) Tween 80 oder Triton X-100. Auch die dPHB-Hydrolyse durch PhaZ5 wird durch Gegenwart sehr geringer Konzentrationen (0,02 % v/v) Tween oder Triton X-100 nahezu vollständig unterbunden. Ähnliche Effekte sind für dPHB-Depolymerasen aus *C. testosteroni*, *P. funiculosum*, *A. faecalis*, *Acidovorax* sp. TP4 und PHO-Depolymerase aus *P. fluorescens* GK13 beschrieben (MUKAI et al., 1993b; SHIRAKURA et al., 1986; KOBAYASHI et

al., 1999; SCHIRMER, 1994). Im Falle von PhaZAfa hemmte Gegenwart von Triton X100 zwar die Depolymerase Aktivität, nicht jedoch die Dimer-Hydrolaseaktivität. Offenbar verhindern Detergentien eine Polymerbindung an das Enzym, jedoch nicht die Aktivität mit löslichen Estersubstraten. Es kann spekuliert werden, daß PHA-Depolymerasen möglicherweise keine Lipase-typische „Lid“-struktur besitzen. Gestützt durch weitere Befunde führten die Ergebnisse zur Erstellung eines einfachen Strukturmodells für PHA-Depolymerasen basierend auf räumlichen Trennung von katalytischer und Polymer-bindender Domäne (FUKUI et al., 1988; SAITO et al., 1993, 1997; BEHRENDTS et al., 1996; SHINOMIYA et al., 1997; BRIESE und JENDROSSEK, 1998; OHURA et al., 1999; Zur Primärstruktur extrazellulärer dPHA-Depolymerasen siehe Einleitung., Abb. 2).

Ein weiterer genereller Unterschied zwischen dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen und PhaZ7 besteht in der Resistenz der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase gegenüber reduzierenden, oxidierenden und alkylierenden Agentien. dPHB-Depolymerasen aus *R. pickettii*, *A. faecalis* und *P. lemoignei* zeigen bereits ab 0,3 mM DTT verminderte Hydrolyseaktivität (YAMADA et al., 1993; BRIESE et al., 1994b). PHO-Depolymerase verhält sich hingegen ähnlich wie PhaZ7 und wird auch durch 4 mM DTT nicht signifikant gehemmt (SCHIRMER et al., 1993). In der Primärstruktur von PhaZ7 finden sich insgesamt 10 Cysteinreste, jedoch erscheint eine Beteiligung essentieller Cysteine an der Katalyse oder Substratbindung und das Vorhandensein essentieller Disulfidbrücken unwahrscheinlich, obgleich nicht vollständig ausgeschlossen. Für Lipase aus *P. aeruginosa* wurde eine intramolekulare Disulfidbrücke nachgewiesen (NARDINI et al., 2000), die offenbar erst nach Entfaltung des Enzyms reduziert werden kann. Die Bindung ist weder für die korrekte Faltung noch die intermolekulare Interaktion der Lipase mit Chaperonen notwendig, trägt jedoch zur Temperatur- und Proteasestabilität des Enzyms bei (JAEGER et al., 1993; LIEBETON et al., 2001). Ein hochkonserviertes (für die Aktivität jedoch nicht essentielles) Cystein, wie unmittelbar vor dem C-Terminus von dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen nachgewiesen (JENDROSSEK et al., 1995b; JENDROSSEK, 2001c), findet sich in der Primärsequenz von PhaZ7 nicht.

Das offenbar unabhängig von der Art des eingesetzten PHA-Substrates (dPHA<sub>SCL</sub>, nPHA<sub>SCL</sub>, aPHB und artifizielle amorphe PHA<sub>SCL</sub>-Granula) beobachtete Fehlen jeglicher PHA-Hydrolyseaktivität bei getesteten Lipasen (Pankreaslipase, Lipase aus Schweineleber sowie *P. aeruginosa* Lipase) und Esterasen (z. B. aus *P. fluorescens*, PFE1, KREBSFÄNGER et al., 1998; oder *Streptomyces diastachochromogenes*, SDE1, KAHLMEYER und BORNSCHEUER, 1999) stützte Ergebnisse mit Esterase Est1 aus *Sulfolobus acidocaldarius* DSM639 (ARPIGNY et al., 1998; keine Aktivitäten mit nPHA, dPHA). JAEGER et al. (1995) beschrieben für Lipasen aus *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas alcaligenes*, *B. subtilis* und *Burkholderia cepacia* ebenfalls das Fehlen hydrolytischer Aktivität mit Poly(3-Hydroxybutyrat) und Poly(3-Hydroxyvalerat). Die Enzyme waren in begrenztem Maße zur Hydrolyse von Poly( $\omega$ -hydroxyalkanoaten) wie Poly(6-hydroxyhexanoat), Poly(4-hydroxybutyrat) in der Lage und besaßen hohe Aktivität mit Triolein. Alle Befunde weisen

trotz einer Reihe von ähnlichen Eigenschaften auf eine klare Abgrenzung der PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen und insbesondere PhaZ7 von der Gruppe der Lipasen/Esterasen hin.

Die Spezifität von PhaZ7 war überraschenderweise offenbar strikt auf amorphe Polyester, bestehend aus 3-HA-Monomeren kurzer Kettenlänge (C4 bis C5; nPHA<sub>SCL</sub>), beschränkt, was die allen bisher charakterisierten PHA-Depolymerasen gemeinsame Präferenz für entweder PHA<sub>SCL</sub> oder PHA<sub>MCL</sub> (C6 bis C12) bestätigt. PhaZ7 war in der Lage, auch nPHV zu hydrolysieren, wobei die Rate des Abbaues etwa um ein Drittel unter den mit bis zu 9800 U/mg außergewöhnlich hohen spezifischen Aktivitäten mit nPHB lag. Dieses Verhältnis wurde qualitativ auch bei Verwendung artifizierender nPHA<sub>SCL</sub>-Granula bestätigt. Einige Mikroorganismen, wie *Streptomyces exfoliatus* K10 (SCHIRMER et al., 1993; KLINGBEIL et al., 1996), *Aspergillus fumigatus* (SCHERER et al., 2000; IYER et al., 2001) oder *Comamonas* sp. (QUINTEROS et al., 1999) sind zur Bildung von PHA<sub>MCL</sub>- und PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen in der Lage. Die hohe Spezifität für jeweils PHA<sub>SCL</sub> oder PHA<sub>MCL</sub> findet ihre Entsprechung in deutlich ausgeprägten Homologien der abgeleiteten Proteine innerhalb der jeweiligen Spezifitätsgruppe (Abb 103). DOI et al. (1995) konnten unter Verwendung eines Copolymers aus 3-Hydroxybuttersäure und 3-Hydroxyhexansäure mit dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *A. faecalis* T1 nachweisen, daß eine Hydrolyse durch die dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase ausschließlich zwischen 3-HB-Untereinheiten des Copolymers erfolgt. Für *P. lemoignei* scheint das Spektrum depolymerisierbarer PHA strikt auf PHA<sub>SCL</sub> in parakristalliner (PhaZ1 bis 6) und amorpher Konformation (PhaZ7) beschränkt. Mit cPHB zeigte PhaZ7 keinerlei Aktivität. Zur Erklärung muß kurz auf die Konformation des Polymers eingegangen werden. Basierend auf GPC, NMR und Röntgenstrukturdaten wurden Strukturmodelle der cPHB-Kanäle entworfen. cPHB bildet demnach in Gegenwart des makromolekularen PP<sub>i</sub>-Calciumsalzes eine, die Polyphosphathelix einschließende und letztere über Ca<sup>2+</sup> komplexierende äußere Helix (17 Monomereinheiten je Windung bei 0,4 nm Steigung). Durch eine Anordnung aller Methylreste außerhalb und aller C=O Gruppen innerhalb der PHB-Helix entsteht (im Gegensatz zu der für dPHB beschriebenen lamellaren kristallinen Struktur mit 0,6 nm Helixsteigung) eine ideal in eine hydrophobe Membranumgebung passende exolipophile Struktur (DAS et al., 1997). Das Polymer ist in dieser Form offenbar äußerst stabil und möglicherweise durch die besondere Orientierung der C=O Gruppen zusätzlich vor einem Depolymeraseangriff geschützt (die Esterbindung ist sterisch nur bedingt zugänglich). Vor einer Hydrolyse müßte der PP<sub>i</sub>-Ca<sup>2+</sup>-PHB-Komplex gelöst werden. Hierzu ist PhaZ7 jedoch offenbar nicht in der Lage.

Anders als dPHA-Depolymerasen zeigte PhaZ7 keine hydrolytische Aktivität mit parakristallinen PHA<sub>SCL</sub> und kann unter Berücksichtigung fehlender Sequenzhomologien nicht der Klasse der dPHA-Depolymerasen zugeordnet werden. Basierend auf diesen Ergebnissen und in Anlehnung an das Klassifizierungssystem von Arpigny und Jäger (1999) wurde die Schaffung einer neuen Enzymfamilie (Familie 9 „extrazelluläre PHA-Depolymerasen“) mit der Subfamilie 9.1 („extrazelluläre nPHA Depolymerasen“) innerhalb der Gruppe der Serin-Esterasen vorgeschlagen (HANDRICK et al., 2001).

#### 4.1.4. *Bacillus subtilis* – ein alternatives System zur heterologen Expression von PhaZ7

PhaZ7 wurde in *B. subtilis* WB800, einer achtfach Protease-negativen Mutante (WU, 1991), erfolgreich kloniert. Die Verwendung der Leaderpeptidsequenz des SacB-Proteins (Laevansucrase) führte zur Sekretion des Enzyms über das Sec-System von *B. subtilis*. Die unmittelbare Schnittstelle der Signalpeptidase aus *P. lemoignei* (Ala-Leu) wurde durch die *Bacillus*-eigene Signalpeptidase erkannt und das Protein während des Sekretionsvorganges offenbar korrekt prozessiert. Während bisher in *E. coli* klonierte dPHA-Depolymerasen aus *P. lemoignei* nur mit geringer Ausbeute und aufgrund des ineffektiven Transportes über die äußere Membran überwiegend aus der Periplasmafraktion des Gram-negativen Stammes gewonnen wurden (JENDROSSEK et al., 1995b), stellt die Expression in Gram-positiven Organismen wie *B. subtilis* für die Klonierung und Expression sekretorischer Proteine offenbar eine geeignete Alternative dar. Anders als während der heterologen Expression der dPHA-Depolymerase PhaZ5 aus *P. lemoignei* beobachtet (BRAAZ et al., 2002), kam es in dem verwendeten Stamm nicht zur Bildung von Inklusionbodies. Die auf Super-Rich-Medium um etwa eine Größenordnung höhere Volumenaktivität ( $10 \times 10^4$  bis  $19 \times 10^4$  U/ml) verglichen mit auf Succinat-Mineralmedium inkubierten *P. lemoignei*-Kulturen prädestinieren das System zur Gewinnung Isoenzym-freier, im Falle von PhaZ7 dPHB-Depolymerase-freier Aktivität. *B. subtilis* wurde bereits erfolgreich zur Produktion von rekombinanten Proteinen wie Antikörperfragmenten (WONG et al., 1994), Streptokinase (WONG, 1995) und Staphylokinase, einem medizinisch relevanten Protein zur Behandlung des Herzinfarktes (YE, 1999), als auch zur Überproduktion von Metaboliten und Biochemikalien (z.B. Riboflavin, STAHMANN et al., 2000) eingesetzt. MURASHIMA et al. (2002) gelang die heterologe Expression rekombinanter Cellulosomen aus *Clostridium cellulovorans* ebenfalls in *B. subtilis* WB800. Aufgrund der Verwendung des Protease-negativen Stammes gelang es den Autoren, nicht prozessiertes EngB (Endo-1,4-beta-glucanase) zu gewinnen. In *E. coli* hingegen erfolgte zwischen der „dockherin“ (Cellulosomen-Bindedomäne) und der katalytischen Domäne eine unerwünschte Prozessierung des Enzyms.



#### 4.2. Enantioselektivität und Mechanismus der PHA<sub>SCL</sub>-Hydrolyse

Hinsichtlich des Hydrolysemechanismus einer durch die Hydroxyl- und Carboxyl-Endgruppen der Monomeruntereinheiten asymmetrischen Polymerkette bestehen prinzipiell mehrere Möglichkeiten. Neben dem *exo*-hydrolytischen Angriff von den Kettenenden ist ein *endo*-hydrolytischer Abbau als auch eine Kombination beider Wege denkbar. Sowohl die Aktivitäten von PhaZ7 bezüglich ataktischer Polymere, definierter löslicher linearer und zyklischer 3-HB-Oligomere, als auch das Spektrum löslicher Hydrolyseprodukte weisen offensichtlich auf eine Zugehörigkeit des Enzyms zu Polymerhydrolasen mit einem präferentiellen *endo*-Mechanismus der Polyesterhydrolyse hin. Während lineare 3-HB-Oligomere mit bis zu 5 Monomeruntereinheiten (R2-R5) für PhaZ7 offenbar kein geeignetes Substrat darstellen, werden 3-HB-Oktamere (R8) gegenüber Hexameren (R6) mit um über eine Größenordnung, und native PHB-Granula mit nochmals um über das Zwanzigfache erhöhter Rate hydrolysiert. Die geringe Aktivität mit 3-HB-Hexamer und das Fehlen signifikanter Hydrolyseaktivitäten mit kürzerkettigen 3-HB-Oligomeren werden durch die Akkumulation des 3-HB-Pentamers im Zuge der nPHB-Hydrolyse bestätigt. Das Produktspektrum der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase korreliert gut mit dem titrimetrisch ermittelten Verlauf der nPHB-Hydrolysereaktion. Die sich aus den Werten der Titrationsexperimente ergebende mittlere Spaltungshäufigkeit der einzelnen Esterbindung nach vollständiger Hydrolyse durch PhaZ7 liegt unabhängig von der Art der verwendeten nPHB-Granula bei 19 bis 22 mol%, was einer Spaltung durchschnittlich jeder fünften Esterbindung im Polymer entspricht. Im Gegensatz zu bisher daraufhin untersuchten extrazellulären PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen finden sich im Produktspektrum der nPHB- oder nPHV-Hydrolyse durch PhaZ7 kaum signifikante Mengen 3-HB-Monomer und unter 7 mol% Di- oder Trimere. Das Auftreten von Pentameren als Hauptprodukte einer Hydrolyse von nPHA<sub>SCL</sub> und die um mehr als das 20000-fache geringere spezifische Aktivität mit löslichen *p*-Nitrophenylestern stützen die Annahme, daß die physiologische Funktion von PhaZ7 tatsächlich in der Hydrolyse von Polymerestern (nPHB, nPHV) besteht. Das von dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen stark abweichende Produktspektrum unterstreicht die besondere Stellung der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 innerhalb der Gruppe der PHA-Depolymerasen.

Berücksichtigt man, daß isotaktisches Oligomer aus *S*-konfigurierten Monomeren sowie syndiotaktisches Oktamer ([RS]<sub>4</sub>) nicht abgebaut, d. h. *S-S* und *R-S* –Esterbindungen offenbar nicht hydrolysiert werden können, so stellt der beobachtete Abbau von ataktischem (statistisch *R,S*-konfiguriertem, amorphem) PHB ebenfalls einen Hinweis auf *endo*-hydrolytische Aktivität von PhaZ7 dar. Die Hydrolyse zyklischer Oligomere (Oligolide) bestätigt zweifelsfrei das Vorhandensein signifikanter *endo*-Aktivität. Aufgrund der Oligolid-Hydrolyse und des Abbaues vollgeschützter (hydroxyterminale Benzoyl- und carboxyterminale *tert.*-Butyl-Gruppen tragender) Oligomere ist anzunehmen, daß es für die Polyesterspaltung weder der freien Hydroxyl- noch der Carboxylgruppe bedarf. Für PhaZ aus *P. stutzeri*, einer dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase mit Dimerhydrolaseaktivität, konnte

unlängst nach Untersuchung des Abbaues methylierter 3-HB-Di-, Tri- und Tetramere von OHURA et al. (1999) gezeigt werden, daß die enzymatische Hydrolyserate für Dimere mit Methyldgruppen sogar höher liegt als für das unmethylierte 3-HB-Dimer. Diese Beobachtung stützt die Annahme, daß keine polaren Endgruppen für eine Substraterkennung und Hydrolyse nötig sind. Die Autoren schlußfolgerten aus diesem Befund und einem drastischen Aktivitätsanstieg bei Verwendung von 3-HB-Trimer oder in vergleichbarer Rate von 3-HB-Tetramer, daß es sich bei der kleinsten hydrolysierbaren Einheit zwar um 3-HB-Dimer handelt, die vom aktiven Zentrum präferierte Kettenlänge jedoch bei 3 Monomereinheiten liegen sollte.

Die nicht signifikante Aktivität der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase mit Oligomeren aus weniger als sechs 3-HB-Monomeren, der Aktivitätsanstieg vom Hexa- zum Oktamer um über eine Größenordnung und die durch ESI-Massenspektrometrie nachgewiesene Bildung von 3-HB-Pentameren als Hauptprodukte der nPHA<sub>SCL</sub>-Hydrolyse durch PhaZ7 sowie ein sich bei extensiver Inkubation nicht signifikant veränderndes Produktspektrum lassen den Schluß zu, daß es sich bei der kleinsten hydrolysierbaren Einheit um Hexamere handeln sollte. Die präferentiell erkannte Substrateinheit dürfte jedoch, wie der beobachtete nochmals starke Anstieg der Hydrolyserate bei Verwendung von nPHB (mittleres Molekulargewicht > 10<sup>5</sup>) zeigt, vermutlich bei noch größeren Kettenlängen liegen. Ob beim Abbau von nPHA<sub>SCL</sub> Grenzflächenaktivierungseffekte, wie sie für einige Lipasen beschrieben wurden, eine Rolle spielen (BRZOZOWSKI et al., 1991; 2000), ist nicht bekannt. Lipasen, die in unmittelbarer Nähe von Lipid-Wasser-Grenzschichten einen starken Anstieg der Hydrolyseaktivität zeigen, besitzen eine charakteristische „Lid“-Struktur. Dieses entweder aus ein (*P. aeruginosa*, NARDINI et al., 2000) bzw. zwei  $\alpha$ -Helixmotiven (*Pseudomonas cepacia*, KIM et al., 1997) oder einer „Loop“-Region (*Candida rugosa*, CYGLER und SCHRAG, 1999) bestehende Tertiärstrukturelement interagiert über hydrophobe Wechselwirkung mit dem Lipidsubstrat und reguliert durch Konformationsänderungen die Exposition der katalytisch aktiven Aminosäuren. Den PhaZ7 am nächsten verwandten Lipasen aus *B. subtilis* fehlt jedoch (LESUISSE et al., 1993; EGGERT et al., 2000, 2001) ebenso wie der Cutinase aus *Fusarium solani* (MARTINEZ et al., 1992) eine solcher „Lid“ und damit die Eigenschaft der Aktivierung an Lipid-Wasser-Grenzschichten. Diese Enzyme kennzeichnet ein eher „Esterase-artiges“ Verhalten bei permanenter Zugänglichkeit des katalytischen Zentrums.

Interessanterweise zeigte PhaZ7 gegenüber vollgeschütztem (Benzoyl- und *tert.*-Butyl-Endgruppen tragendem) 3-HB-Tetramer signifikante Hydrolyseaktivität, wohingegen das entschützte Tetramer offenbar kein Substrat des Enzyms darstellt (s. 3.7.6.3; Tab. 15). Möglicherweise führen die Endgruppen zu einer „Simulation“ längerer Substratesterketten ähnlich den für *P. stutzeri* geschilderten Beobachtung von OHURA et al. (1999).

Zyklische Oligomere können insbesondere hinsichtlich der dPHA-Depolymerasen als mögliches Modell für PHA-Haarnadelloops lamellarer Kristallite natürlich vorkommender PHA dienen. BRANDL et al. (1995) testeten neben einer Reihe von Oligoliden ebenfalls lineare Oligomere mit verschiedenen Schutzgruppen auf ihre Abbaubarkeit durch extrazelluläre Depolymerasefraktionen

aus *Acidovorax delafieldii*. Die Autoren zeigten die prinzipielle Abbaubarkeit all-*R*-konfigurierter Oligolide vom Tetra- bis zum Heptolid und schlossen auf einen *endo*-hydrolytischen Mechanismus. Polyesterzyklen aus *S*-3-HB Einheiten sowie das Triolid wurden durch Kulturüberstände aus *A. delafieldii* nicht umgesetzt. Hinsichtlich des Abbaues carboxyterminale (*tert.*-Butyl-, Methyl-) und/oder hydroxyterminale (Benzyl-, Crotonyl- oder *S*-Hydroxybutyryl-) Schutzgruppen tragender 3-HB-Oktamere stützen die Daten qualitativ die gezeigten Befunde für PhaZ2, PhaZ5, PhaZ7 und PhaZRr.

PhaZ2 als auch PhaZ5 unterschieden sich hinsichtlich ihrer Spezifität für kurzkettige 3-HB-Oligomere signifikant von PhaZ7. Zwar scheint auch von diesen dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen das Dimer nicht als Substrat erkannt zu werden, jedoch steigt die Hydrolyserate bereits in Gegenwart des Trimers deutlich an. PhaZ2 zeigt das Maximum der hydrolytischen Aktivität für Tetramere (R4) bei leichter Abnahme der Rate mit weiter steigender Oligomerkettenlänge. PhaZ5 hingegen hydrolysiert Oligomere vom Tetra- bis zum Oktamer bei leichter Präferenz für Hexamere (R6) mit annähernd vergleichbarer Rate. PhaZ7 zeigte erst beginnend mit dem Hexamer und deutlich ansteigend für nPHB signifikante Hydrolyse, wobei im Falle des Hexameren die spezifische Aktivität um mindestens zwei Größenordnungen unter den Werten für PhaZ5 lag. Auch nPHV stellt ein verwertbares Substrat für PhaZ7 dar und bestätigt durch das Fehlen jeglicher Aktivität mit PHA<sub>MCL</sub> (Anzahl C-Atome der Monomere  $\geq 6$ ) die generelle Spezifität der PHA Depolymerasen für entweder PHA<sub>SCL</sub> oder PHA<sub>MCL</sub> (JENDROSSEK, 2001b). Während PhaZ2 und PhaZ5 offenbar hohe Spezifität für 3-HB-Oligomere mit  $R > 2$  und hinsichtlich des Polymers für dPHB und besitzen, weisen andere dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* neben PHB-Hydrolyseaktivität auch signifikante Aktivität mit PHV auf (PhaZ6 > PhaZ1 > PhaZ4; SCHÖBER et al., 2000; JENDROSSEK et al., 1993b; JENDROSSEK et al., 1995b). PhaZ2, PhaZ5 und PhaZ7 besitzen neben der jeweiligen Präferenz für entweder parakristalline oder amorphe PHA<sub>SCL</sub> auch divergierende Spezifität für unterschiedliche Oligomerkettenlängen. Die Befunde könnten die Bildung von mindestens sieben extrazellulären PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen durch *P. lemoignei* durchaus als sinnvoll erscheinen lassen. Während PhaZ5 hinsichtlich des Polymersubstrates nur zum Abbau von parakristallinem PHB in der Lage scheint, PhaZ2 ebenfalls parakristallines Polymer bevorzugt und (verglichen mit PhaZ7) in nur äußerst geringem Maße auch die nPHB-Hydrolyse katalysiert, ist das Spektrum der hydrolytischen Aktivität von PhaZ7 offenbar auf amorphes nPHA<sub>SCL</sub> und langkettige 3HA<sub>SCL</sub>-Oligomere beschränkt. Eine auf den unterschiedlichen Spezifitäten für poly- und oligomere Hydroxyalkanoate beruhende kooperative Interaktion der Depolymerasen beim Abbau von PHA<sub>SCL</sub> (dPHB, dPHV, nPHB, nPHV und Copolymeren) sowie die offenbar strikte Begrenzung der durch *P. lemoignei* verwerteten Substrate auf wenige organische Säuren wären eine mögliche Erklärung für die relativ hohe Zahl von Isoenzymen. Das Auftreten mehrerer Polymerhydrolase-Isoenzyme stellt offenbar eine häufig realisierte Form der Sicherung der Substratgewinnung durch Abbau natürlicher Polymere wie Chitin und Cellulose dar. So

sind aus *Aeromonas* sp. 10S-24 sechs (UEDA et al., 1995) und aus *Streptomyces* sp. J-13-3 mindestens zwei Chitinase-Isoenzyme (OKAZAKI et al., 1995) beschrieben. Unlängst wurde von SUZUKI et al. (1999) aus *Serratia marcescens* 2170 die dritte Chitinase ChiC isoliert. Die Autoren postulieren, daß die Bildung mehrerer divergenter Chitinasen durch einen Organismus offenbar für den effizienten synergistischen Abbau von Chitin verschiedener Konformation verantwortlich ist. BRURBERG et al. (1996) zeigten für *S. marcescens* BJL200, daß Chitinase A eine höhere Spezifität für Chitin besaß als die ebenfalls sekretierte Chitinase B und konnten einen synergistischen Effekt in Gegenwart beider Enzyme nachweisen. Ähnliche Effekte werden für *B. circulans* WL-12 Chitinase A1 und D vermutet (ARMAND et al., 1994).

Für die effiziente Hydrolyse von nPHA<sub>SCL</sub> durch *P. lemoignei* ist neben PhaZ7 die Gegenwart weiterer Enzyme zur Gewinnung verwertbarer (für die Zelle aufnehmbarer) Substrate möglicherweise essentiell. Wie unter 3.7.7. (Abb. 33) gezeigt, erfolgt die Oligomerfreisetzung aus nPHB durch PhaZ7 äußerst rasch. Entstandene Oligomere (R4, R5, R6; s. 3.7.7) werden jedoch erst in Gegenwart von PhaZ2 oder PhaZ5 mit hoher Rate zu 3-HB-Mono- und Dimeren umgesetzt, welche von *P. lemoignei* aufgenommen und im Falle des Dimeres durch eine intrazelluläre Dimerhydrolase (DELAFIELD et al., 1965a) ebenfalls zum Monomer hydrolysiert werden. Wie von den Autoren gezeigt, ist die intrazelluläre 3-HB-Dimer-Hydrolase offenbar nicht in der Lage, höherkettige Oligomere zu hydrolysieren und stellt damit im angenommenen Kooperativitätsmodell das abschließende konvergente für eine erfolgreiche PHA-Verwertung durch *P. lemoignei* benötigte Enzym dar. In anderen Bakterien, deren intra- oder extrazelluläre PHA-Depolymerasen ebenfalls nur geringe Di- oder Oligomerhydrolaseaktivitäten aufweisen (s. Tab. 28), konnten sowohl extrazelluläre (*R. pikettii* T1; *R. pikettii* A1., SHIRAKURA et al., 1983; ZHANG et al., 1997) als auch intrazelluläre Oligomerhydrolasen (*Z. ramigera*, *R. rubrum*, *Acidovorax* sp. SA1; TANAKA et al., 1981, MERRICK und YU, 1966, SAITO und KOBAYASHI, 2001) nachgewiesen werden. Auch *R. eutropha* besitzt offenbar neben intrazellulären PHB-Depolymerasen (SAITO et al., 1995; HANDRICK et al., 2000; SAEGUSA et al., 2001) eine intrazelluläre 3-HB-Oligomerhydrolase mit Spezifität für 3-HB-Di- und Trimere (T. SAITO, 2002; pers. Mitteilung). Oligomerhydrolasen zeichnen sich durch die *exo*-Hydrolyse löslicher Oligomerester mittels Abspaltung von Monomeren ausgehend vom Carboxyterminus aus (SHIRAKURA et al., 1983). Die Oligomerhydrolase aus *R. pikettii* T1 besitzt, im Gegensatz zur dPHB-Depolymerase des Stammes, keine Aktivität mit zyklischen 3-HB-Oktameren (SHIRAKURA et al., 1986).

Die Bildung von PHA-Depolymerasen in *P. lemoignei* zur Hydrolyse von PHA<sub>SCL</sub> geht mit dem Verbrauch organischer Substratsäuren in Batchkulturen und einer Alkalisierung der Medien einher. Möglicherweise gewährleistet die Freisetzung von Säuregruppen aus dem Polymer eine Regulierung des pH-Wertes im Bereich des optimalen Wachstums. Die Relevanz im natürlichen Habitat (Gartenerde, Kompost) ist jedoch unbekannt.

**Tab. 28:** Spezifität von PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen und Produkte der PHA-Hydrolyse.

Depolymerase	Depol.-Typ <sup>a)</sup>	Substrat	kleinste hydrolysierbare Substratereinheit	Hauptprodukte der PHA-Hydrolyse	Referenzen
PhaZRpT1	I	dPHA <sub>SCL</sub>	Trimer	(Monomer), Dimer	SHIRAKURA et al., 1986; KASUYA et al., 1997; BACHMANN und SEEBACH, 1999;
PhaZ2Pl	I	dPHA <sub>SCL</sub>	Trimer	Dimer, (Monomer, Trimer)	diese Arbeit; NAKAYAMA et al., 1985; MÜLLER und JENDROSSEK, 1993
PhaZ5Pl	I	dPHA <sub>SCL</sub>	Trimer	Dimer (Monomer, Trimer)	diese Arbeit; NAKAYAMA et al., 1985; MÜLLER und JENDROSSEK, 1993
PhaZ7Pl	I	nPHA <sub>SCL</sub>	Hexamer	Pentamer (Hexamer)	diese Arbeit
PhaZPst	I	dPHA <sub>SCL</sub>	Dimer	Monomer	UEFUJI et al., 1997; OHURA et al., 1999; HIRAIISHI et al., 2000
PhaZAfaAE122	I	dPHA <sub>SCL</sub>	-	Dimer, Trimer	KITA et al., 1995
PhaZAsp	II	dPHA <sub>SCL</sub>	Dimer	Monomer, (Dimer)	WANG et al., 2002
PhaZCac	II	dPHA <sub>SCL</sub>	Trimer	(Monomer), Dimer	KASUYA et al., 1997
PhaZCsp	II	dPHA <sub>SCL</sub>	-	Monomer	JENDROSSEK et al., 1993
PhaZSex	II	dPHA <sub>SCL</sub>	-	Monomer	KLINGBEIL et al., 1996
PhaZCte	II	dPHA <sub>SCL</sub>	-	Dimer	KASUYA et al., 1994
PhaZRr	II	nPHA <sub>SCL</sub>	Trimer	Mono-, Di- und Trimer	diese Arbeit; MERRICK und DOUDOROFF, 1964
PhaZRe		nPHA <sub>SCL</sub>	-	(Monomer), Oligomere	SAEGUSA et al., 2001
PhaZPd		nPHA <sub>SCL</sub>	-	(Monomer), Dimer, Trimere	GAO et al., 2001

<sup>a)</sup>Klassifizierung nach JENDROSSEK (2001b):

Depolymerase Typ I: Lokalisation des HG-Motives der Oxyaniontasche vor Ser, His und Asp.

Depolymerase Typ II: Lokalisation des HG-Motives der Oxyaniontasche nach Ser, His und Asp.  
(Lipasebox in der Nähe des C-Terminus)

**Abkürzungen:** dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *Ralstonia pickettii*, PhaZRpT1; *Pseudomonas lemoignei*, PhaZ1-6Pl; *Pseudomonas stutzeri*, PhaZPst; *Alcaligenes faecalis* AE122, PhaZAfaAE122; *Acidovorax* sp., PhaZAsp; *Comamonas acidovorans* YM1609, PhaZCac; *Comamonas* sp., PhaZCsp; sowie nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *P. lemoignei*, PhaZ7Pl; *Rhodospirillum rubrum*, PhaZRr; *Ralstonia eutropha* H16, PhaZRe; *Paracoccus denitrificans*, PhaZPd.

Produkte in Klammern wurden in geringer Konzentration von den angegebenen Autoren nachgewiesen. Insbesondere im Falle des so gekennzeichneten Monomers handelt es sich oft um Ergebnisse nach exzessiver Hydrolyse in Gegenwart eines deutlichen Überschusses des Enzyms.

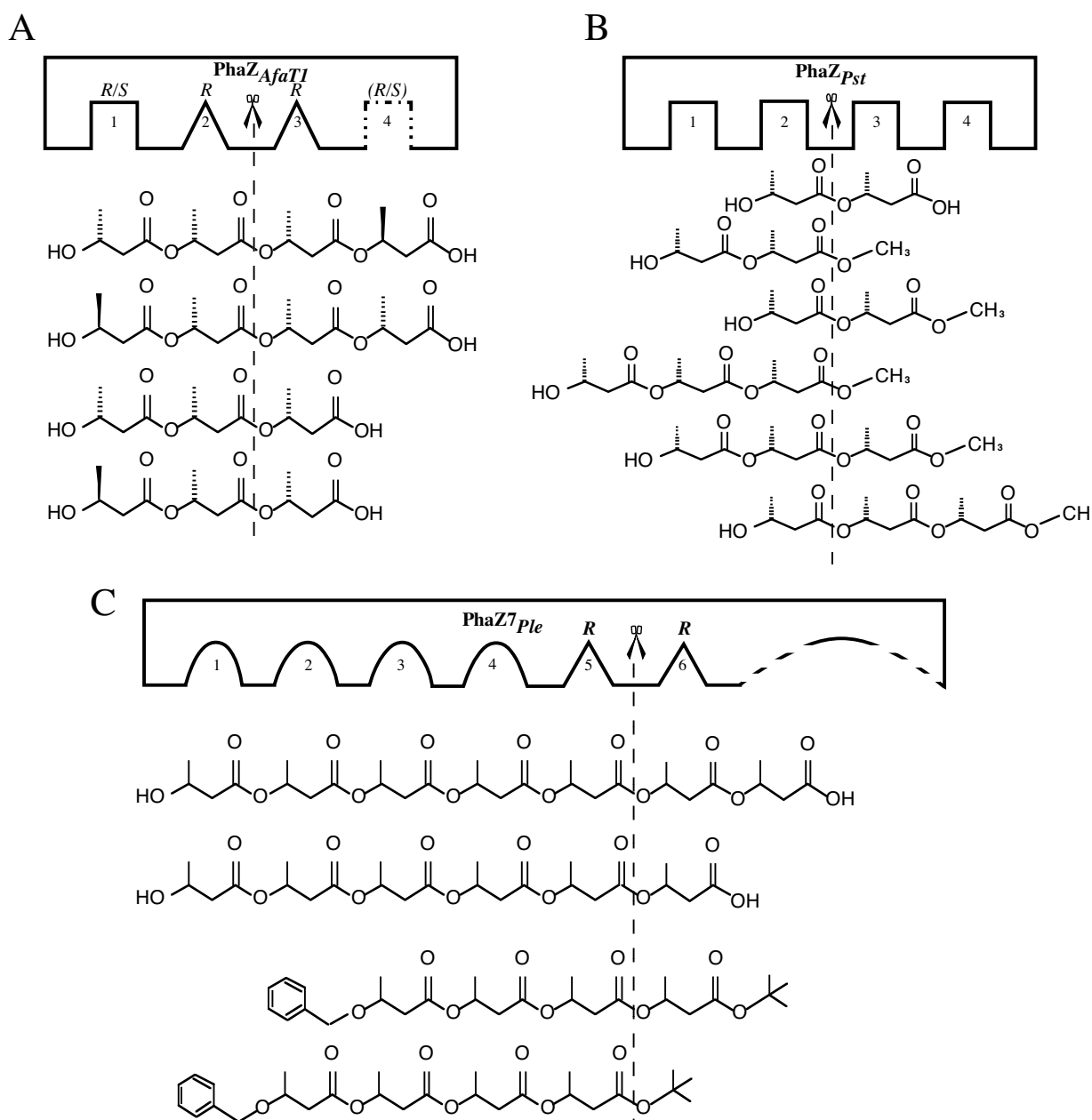
Die Stereospezifität der enzymatischen Hydrolyse für Esterbindungen zwischen *R*-konfigurierten Monomeren ist offenbar eine für PHA-Depolymerasen charakteristische Eigenschaft und findet sich auch in den Ergebnissen der durchgeführten Abbauuntersuchungen mit unterschiedlicher Zahl *R*- und *S*-konfigurierter 3-HB-Untereinheiten mit PhaZ2, PhaZ5, PhaZ7 aus *P. lemoignei* sowie PhaZRr aus *R. rubrum*. Neben überwiegend Mono- und Dimeren (PhaZ2 und PhaZ5) sowie Mono-, Di- und Trimeren (PhaZRr) zeigen Produktspektren nach Abbau entsprechender ataktischer Oktamere stets eine Akkumulation von Oligomeren der Kettenlänge  $[n \text{ S-Untereinheiten} + 1]$  in HPLC-Untersuchungen. Ein Abbau von R4S4 oder S4R4 durch PhaZRr führte neben der für R8 nachweisbaren Freisetzung von Mono-, Di- und Trimer zur Akkumulation von Pentamer  $[= 4 \text{ S} + 1]$ . Entsprechend wurde für R6S2 bzw. S2R6 eine überproportionale 3-HB-Trimer-Akkumulation beobachtet. PhaZ7 hydrolysiert mit gegenüber dem Abbau von R8 geringer, jedoch signifikanter Rate auch R7S1 bzw. S1R7 und R4S4 bzw. S4R4 Oktamere. Offenbar ist die Konfiguration der von der zu spaltenden Esterbindung weiter entfernt liegenden Untereinheiten für die prinzipielle Hydrolysierbarkeit nur von untergeordneter Bedeutung. Die fehlende Aktivität mit syndiotaktischen  $[(R,S)_n]$  und all-*S*-3-HB-Oligomeren legt den Schluß nahe, daß die Substraterkennung im unmittelbaren Bereich der zu spaltenden Esterbindung bei hoher Spezifität für *R-R*-Bindungen erfolgt. Eine derartige Präferenz der nPHA<sub>SCL</sub>- und dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen aus *P. lemoignei* und der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* für *R*-3-Hydroxybuttersäureesterbindungen erscheint in Anbetracht des ausschließlichen Aufbaues der natürlichen 3-HB-Oligo/Polymere aus *R*-Enantiomeren durchaus sinnvoll. Ähnliche Enantioselektivität konnte mittlerweile für PhaZ aus *R. pickettii* T1 (BACHMANN und SEEBACH, 1999) und eine Reihe weiterer daraufhin untersuchter dPHA-Depolymerasen nachgewiesen werden (*A. delafieldii*, BRANDL et al., 1995; *Aspergillus fumigatus*, SCHERER et al., 2000).

Die Fähigkeit zum *endo*- und *exo*-hydrolytischen Angriff der PHA-Ketten ist offenbar eine generelle Eigenschaft sowohl von nPHA<sub>SCL</sub>-, dPHA<sub>SCL</sub>- und möglicherweise auch von PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen [De KONING et al. (1994) konnten für PHO-Depolymerase aus *P. fluorescens* GK13 den vollständige Abbau von gummiartig quervernetztem dPHA<sub>MCL</sub> nachweisen]. PhaZ2, PhaZ5, PhaZ7 aus *P. lemoignei* und PhaZRr aus *R. rubrum* hydrolysieren PHA<sub>SCL</sub> offenbar sowohl durch *endo*- als auch durch *exo*-hydrolytischen Angriff. Über das Ausmaß des parallel zur *endo*-Hydrolyse stattfindenden *exo*-hydrolytischen Abbaues sind aus den vorliegenden Daten nur bedingt Schlußfolgerungen zulässig. Daß eine *exo*-Hydrolyse prinzipiell möglich sein sollte, zeigt die Spaltung von vollständig entschützten linearen 3-HB-Oligomeren. Aufgrund der dargelegten Beobachtungen und außergewöhnlich hohen Hydrolysereaten von > 9000 (PhaZ7) bzw. > 3000 (PhaZRr) [ $\mu\text{mol}$  Esterbindungen/min mg Protein] bei Aktivitäten von > 21000 U/mg im Trübungstest scheint ein deutlicher Anteil der *endo*-Hydrolyse an der Gesamtaktivität wahrscheinlich.

Für PhaZRr, PhaZ2 und PhaZ5 geben die erhaltenen Daten Anhaltspunkte für die zu fordernde Struktur eines modellhaften katalytischen Zentrums dieser Depolymerasen. Da die Enzyme keine

Dimerhydrolaseaktivität besitzen, geringe Aktivität mit 3-HB-Trimer und einen signifikanten Aktivitätsanstieg mit 3-HB-Tetramer zeigen, sollte die Erkennungsstelle im katalytischen Zentrum für vier Untereinheiten spezifisch sein, wobei für die Hydrolyse eine Belegung von mindestens 3 potentiellen Bindestellen zu fordern wäre. Die Stereospezifität beschränkt sich hierbei auf die beiden die zu spaltende Esterbindung flankierenden 3-HB-Untereinheiten, welche in der *R*-Konfiguration vorliegen müssen. Dies entspricht den von BACHMANN und SEEBACH (1999) postulierten Anforderungen an ein für PhaZ aus *A. faecalis* T1 aufgestelltes Modell. Die Autoren vereinigen Befunde aus dem Abbau von linearen PHB-Oligomeren, Beobachtungen zur Stereoselektivität und die von SHIRAKURA et al. (1986) postulierte Erkennung der Substratorientierung relativ zum aktiven Zentrum in einem schlüssigen Modell des Mechanismus der PHB-Hydrolyse. Untersuchungen zur Hydrolyse von hydroxyterminal <sup>14</sup>C-markierten 3-HB-Oligomeren durch dPHB-Depolymerase aus *A. faecalis* T1 zeigen eine Präferenz des Enzyms für die ausgehend vom Hydroxyterminus zweite Esterbindung in 3-HB-Tri- und Tetramer, während 3-HB-Dimer offenbar kein Substrat des Enzyms darstellt (SHIRAKURA et al., 1986). 3-HB-Pentamere werden an Position zwei und drei hydrolysiert. Höherkettige Oligomere werden (mit Ausnahme der hydroxyterminalen Esterbindung!) an allen Positionen, jedoch mit unterschiedlicher Präferenz, hydrolysiert. Trotz signifikanter *endo*-Aktivität mit zyklischen 3-HB-Oligomeren wurde mit radioaktiv endmarkiertem PHB ein bevorzugter Abbau hydroxyterminaler Gruppen beschrieben (SHIRAKURA et al., 1986). Nach BACHMANN und SEEBACH (1999; s. Abb. 101) müssen ausgehend vom Hydroxyterminus der entsprechenden Polymerkette mindestens drei Erkennungsstellen im katalytischen Zentrum belegt sein, um eine Hydrolyse zwischen der zweiten und dritten Monomeruntereinheit zu ermöglichen, wohingegen die Belegung der vierten carboxyterminalen Erkennungsstelle nicht zwingend erforderlich ist, jedoch bei Bindung von Substrat zur maximalen Hydrolyserate führt. Einem solchen theoretischen Mechanismus entsprechen auch von SCHERER et al. (2000) für *A. fumigatus* gefundenen Abbaumuster zyklischer und linearer PHB-Oligomere. Ähnlich PhaZ2 aus *P. lemoignei* hydrolysiert dieses Enzym offenbar 3-HB-Tetramer nicht nur schneller als 3-HB-Trimer sondern auch mit höherer Rate als das 3-HB-Oktamer. Depolymerase aus *A. faecalis* T1 und PhaZ2, PhaZ5 sowie PhaZRr spalten 3-HB-Trimer und 3-HB-Tetramer offenbar nur einmal (im Falle von PhaZ aus *A. faecalis* T1 an der zweiten Esterbindung vom Hydroxyterminus) und führen zur Freisetzung von äquimolaren Mengen 3-HB und 3-HB-Dimer (aus R3) bzw. 3-HB-Dimer (aus R4). Im Falle des Modells von BACHMANN und SEEBACH (1999) ist die Forderung nach *R*- oder *S*-konfigurierten Monomeruntereinheiten für die äußeren Positionen der Bindestelle (R1 und R4; Abb. 101A) möglicherweise gleichbedeutend mit der Unspezifität dieser postulierten „3-HB-Bindetaschen“. Für PhaZ7 erbrachten die Ergebnisse der Titrationsversuche Hinweise darauf, daß möglicherweise der hydrophobe/hydrophile Charakter und sterische Aspekte der von einer zu spaltenden Esterbindung entfernt gelegenen Substratbereiche entscheidend für die Hydrolysierbarkeit sind. Während das Enzym mit 3-HB-Tetramer nahezu völlig inaktiv war, konnte mit dem hydrophobe Schutzgruppen tragenden 3-HB-Tetramer eine signifikante

Esterhydrolyse nachgewiesen werden. Es sollte sich bei den von der Erkennungsstelle für die zu hydrolysierende Esterbindung (*R*-3-HB-spezifisch) weiter entfernt liegenden Bereichen um einen eher unspezifischen Bereich handeln. Da erst die Gegenwart hydrophober Substituenten eine Hydrolysierbarkeit sonst nicht hydrolysierter kurzkettiger 3-HB-Oligomer bewirkt, wäre eine durch Substratbindung vermittelte Konformationsänderung des Enzyms, welche zur Bildung einer aktiven Form führt, vorstellbar (Abb. 101 C). PHB-Depolymerase aus *P. stutzeri* ist offenbar zur Hydrolyse aller Esterbindungen in der Lage. Als Hydrolyseprodukt wird überwiegend 3-HB gebildet (HIRAISHI et al., 2000). Die Autoren schlagen deshalb einen von PhaZ<sub>AfaT1</sub> abweichenden Mechanismus vor, der nur die Belegung der Erkennungsstellen 2 und 3 in Abb. 101 B voraussetzt.



**Abb. 101:** Schematisches Modell des aktiven Zentrums der PHB-Depolymerase aus *A. faecalis* T1 (**A**) unter Berücksichtigung der Stereospezifität nach BACHMANN und SEEBACH (1999) sowie der PHB-Depolymerase aus *P. stutzeri* (**B**) nach HIRAISHI et al. (2000); modifiziert; und ein auf Ergebnissen der 3-HB-Oligomerhydrolyse durch PhaZ7 basierendes Arbeitsmodell für die mögliche Funktionsweise dieser nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase (**C**). Erläuterungen siehe Text.



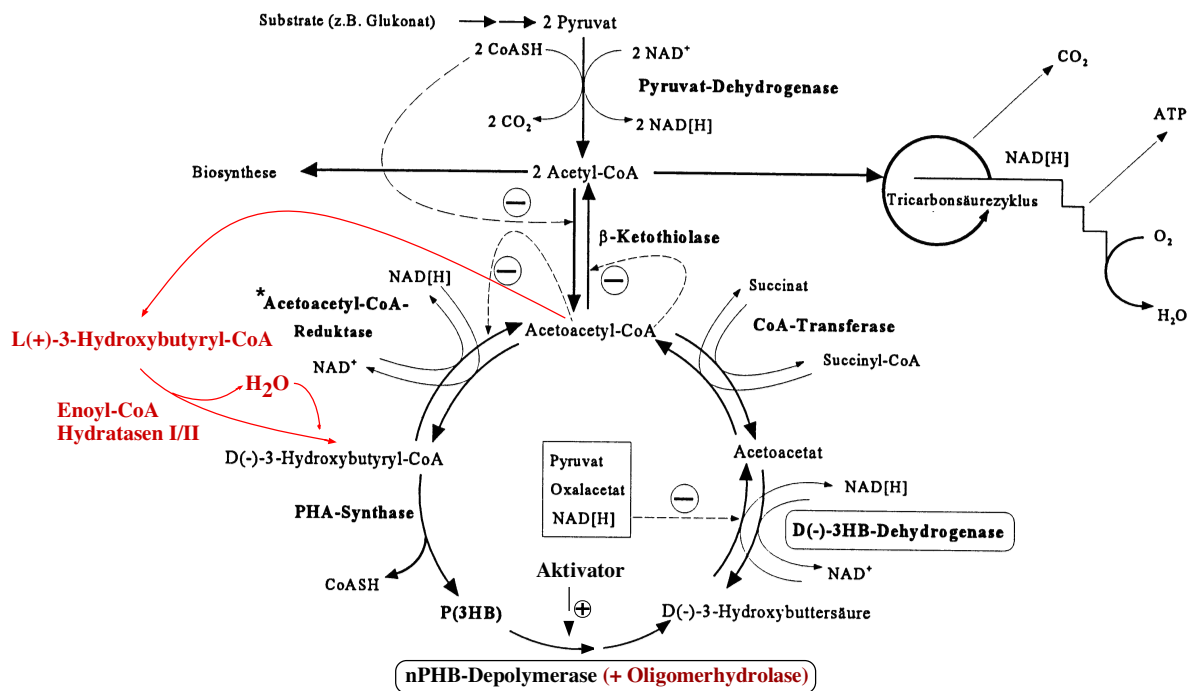
### 4.3. Das Schlüsselenzym des PHA-Metabolismus in *R. rubrum* - PhaZRr

In einer Vielzahl von Mikroorganismen ist die Funktion intrazellulärer PHA in Form nativer PHA-Einschlußkörperchen als endogener Kohlenstoff- und Energiespeicher mittlerweile unumstritten. Die beschriebenen PHA-Gehalte variieren abhängig vom Organismus und den Wachstumsbedingungen (verwendete Substrate) zwischen 30 und > 90 % (w/Zelltrockenmasse) (STEINBÜCHEL und HEIN, 2001; KIM und LENZ, 2001 und Abschnitt 1. dieser Arbeit). Der PHA-Gehalt in *R. rubrum* ist offenbar wie in einer Reihe weiterer daraufhin untersuchter Mikroorganismen (*B. megaterium*, MACRAE und WILKINSON, 1958; *R. eutropha* H16, HIPPE, 1967, HIPPE und SCHLEGEL, 1967, SAITO et al., 1995; HANDRICK et al., 2000; *Spirillum*-, *Rhizobium*-, *Pseudomonas*-Arten, HAYWARD et al., 1959; *Legionella pneumophila* (JAMES et al., 1999); *Hydrogenophaga pseudovlava* (CHOI et al., 1999) von der Wachstumsphase abhängig. Der nach 20 h in der stationären Wachstumsphase unter photoheterotrophen Bedingungen (Acetat-Mineralmedium) beobachtete PHB-Gehalt von maximal 60 % (w/ZTM) lag im oberen Bereich der für *R. rubrum* beschriebenen PHA-Akkumulation (HUSTEDE et al., 1992). Mit fortschreitender Inkubation erfolgt nach Verbrauch extrazellulärer Kohlenstoffquelle eine Mobilisierung des Speicherpolymers. Interessanterweise zeigte die PHA-Depolymeraseaktivität bereits beginnend in der zweiten Hälfte der exponentiellen Wachstumsphase einen unmittelbar mit dem PHB-Gehalt korrelierten Zeitverlauf. Konstitutiv gebildete Mengen an Depolymerase waren auch während des exponentiellen Wachstums vorhanden.

Es handelt es sich hierbei offenbar um ein verbreitetes Phänomen. DOI et al. (1990a) beobachteten bei Inkubation PHB-reicher Zellen von *R. eutropha* H16 auf Pentanoat als einziger Kohlenstoffquelle eine Abnahme des PHB-Gehaltes, welche direkt mit der Zunahme des Gehaltes an (3-HB-co-3-HV)-Copolymer einherging. Bei Inkubation (3-HB-co-3-HV)-reicher Zellen auf 3-HB als alleiniger Kohlenstoffquelle wurde eine Abnahme des Copolymergehaltes bei gleichzeitigem Anstieg der PHB-Menge nachgewiesen. Die Autoren schlußfolgerten auf eine zyklische Natur des PHA-Stoffwechsels und einen kooperativen Effekt zwischen PHA-Synthasen und Depolymerasen. Die in kinetischen Untersuchungen beobachtete simultan zur Abnahme des Polymergehaltes gleichbleibende allmähliche Abnahme der mittleren Molekulargewichte bei gleichbleibender Polydispersität, legt in *R. eutropha* H16 einen überwiegend *exo*-hydrolytischen Mechanismus der PHB-Depolymerisation *in vivo* nahe (KAWAGUCHI und DOI, 1992; DOI et al., 1992b). Fütterungsversuche mit <sup>14</sup>C-markierter Glukose gegen Ende der PHA-Speicherung zeigten bei nahezu konstantem Polymergehalt eine deutliche Zunahme der ins Polymer inkorporierten Radioaktivität um 30 % (TAIDI et al., 1995). Der konstante Gesamtpolymergehalt stützt die Annahme eines Austausches von ungelabeltem 3-HB aus dem Polymer (Depolymeraseaktivität) gegen radioaktiv markierte 3-HB Monomere (Synthaseaktivität). In Batch-Kultur wurde bereits zu Beginn der PHA-Speicherphase das Absinken der PHA-Molekulargewichte beobachtet, was ebenfalls auf zeitgleiche Aktivitäten der Hydrolase und der PHA-Synthase deutet (TAIDI et al., 1995).

Aus einer in *H. pseudovlava* mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR *in vivo* beobachteten PHA-Abbaukinetik erster Ordnung (bezogen auf das Polymersubstrat) bei Inkubation PHA-reicher Zellen in Mineralmedium mit Ammoniumsulfat schlossen YOON und CHOI (1999) auf eine nahezu konstante Depolymerasekonzentration an den Granula *in vivo*. Diese Annahme folgend, hätte die Bildung zusätzlicher Depolymerase unter Mobilisierungsbedingungen (C-Mangel) nur eine partielle Erhöhung der Hydrolyseraten *in vivo* zur Folge. Die resultierende Abbaurate würde überwiegend durch die bereits im Verlaufe der Polymersynthese gebundene Depolymerase bestimmt. Folglich wäre eine Regulation der Depolymeraseaktivität (und/oder PHA-Syntheseaktivität) auf Proteinebene oder indirekt über die Zugänglichkeit des Polymers erforderlich, welche das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau des Polymers wachstumsphasenabhängig jeweils zugunsten der Synthese oder der Hydrolyse von PHA verschiebt.

Für *R. rubrum* wäre eine mögliche gleichzeitige Aktivität von PHA-Synthase und PHA-Depolymerase bei jeweiligem Überwiegen der einen oder der anderen Gesamtaktivität des Gleichgewichtes in einer Netto-Bilanz durchaus eine sinnvolle Option im Sinne einer raschen Reaktion des Organismus auf sich ändernde Umweltbedingungen, insbesondere wechselnde Lichtverhältnisse und damit verbundene Auswirkungen auf die Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten. PHB könnte neben der Funktion als reine Kohlenstoff- und Energiequelle auch eine Art physiologischen Redox-Puffer für Reduktionsäquivalente ( $\text{NADH}+\text{H}^+$ ) in phototrophen Mikroorganismen darstellen (MERRICK, 1978; HUSTEDE et al., 1992). In *Rhodospseudomonas palustris* wurde von DE PHILLIPS et al. (1992) bereits nachgewiesen, daß PHA während des Überganges vom photoheterotrophen Wachstum zur Photoproduktion von Wasserstoff als Akzeptor für überschüssige Reduktionsäquivalente dient. Eine Nutzung endogener C-Quelle hätte den Vorteil einer durch lokale Bergrenzung auf das äußerst energiereiche endogene Speicherpolymer möglicherweise effektiveren und rascheren Reaktion, z. B. auf sich ändernde Beleuchtung. Zur Veranschaulichung soll kurz auf den vermuteten PHA-Kreislauf *in vivo* eingegangen werden (Abb. 102).



\* *Zoogloea ramigera*: Acetoacetyl-CoA-Synthetase (FUKUI et al., 1982)

*R. rubrum*: Bildung von L(+)-3-Hydroxybutyryl-CoA und Isomerisierung mittels Enoyl-CoA-Hydratase I und II (MOSKOWITZ und MERRICK, 1969)

**Abb. 102:** Modell des PHA-Metabolismus basierend auf Angaben von MERRICK und YU, 1966, MOSKOWITZ und MERRICK, 1969, OEDING und SCHLEGEL, 1973; SENIOR und DAWES, 1973; PREIS, 1989, LIEBERGESELL et al., 1991; HUSTEDE et al., 1992; STEINBÜCHEL und HEIN, 2001) sowie der vorliegenden Arbeit. (+) kennzeichnet aktivierende, (-) inhibierende Effekte.

Eine Synthese von PHB in Gegenwart einer verwertbaren Kohlenstoffquelle erfolgt ausgehend von Acetyl-CoA über Acetoacetyl-CoA zu D-3-Hydroxybutyryl-CoA, wobei der letzte Schritt in *R. rubrum* durch eine dreistufige Reaktion vermittelt wird. Eine NADH-abhängige Acetyl-CoA-Reduktase führt zur Entstehung von L-3-Hydroxybutyryl-CoA. Aufgrund der Enantioselektivität der PHA-Synthase (PhaC) aus *R. rubrum* für das R-Isomer (PIEPER und STEINBÜCHEL, 1992) ist jedoch vor der Polymerisation eine Isomerisierung zu D-3-Hydroxybutyryl-CoA durch Enoyl-CoA-Hydratase I und II (MOSKOWITZ und MERRICK, 1969) erforderlich. Der Abbau von PHB wird durch den Angriff der in der vorliegenden Arbeit charakterisierten nPHB-Depolymerase (PhaZRr) initiiert, gefolgt von der Hydrolyse entstandener löslicher Oligomerprodukte (im Falle von *R. rubrum* 3-HB-Dimer und Trimer) durch eine Oligomerhydrolase (MERRICK und YU, 1966). Unter Reduktion von  $\text{NAD}^+$  wird durch eine D(-)3-HB-Dehydrogenase (SHUSTER und DOUDOROFF, 1962; OEDING und SCHLEGEL, 1973) aus 3-Hydroxybuttersäure Acetoacetat gebildet. Eine CoA-Transferase sorgt für die anschließende Aktivierung von Acetoacetat. Die Regulation von PHB-Synthese und Abbau erfolgt offenbar über die jeweiligen zellulären Gehalte an Coenzym A, Acetyl-CoA,  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  und damit über den jeweiligen Energiezustand der Zelle. Fehlen der Zelle verwertbare exogene Kohlenstoffquellen so führt ein verstärktes Absinken der  $\text{NADH}$ -Konzentration zur Erhöhung der Aktivität des Tricarbonsäurezyklus. Das damit verbundene Absinken des Acetyl-

CoA-Levels führt zur Hemmung der 3-Ketothiolase und einem Netto-Abfluss von Kohlenstoff aus dem PHB-Kreislauf in den Tricarbonsäurezyklus. In diesem Fall wäre eine deutliches Überwiegen der Depolymeraseaktivität erforderlich. Die detaillierte Regulation der PHA-Depolymeraseaktivität ist bisher aufgrund des Fehlens entsprechender Informationen zu den Enzymen selbst und zur Lokalisation der Gene ungeklärt. Wie später näher erläutert, könnte neben einer Expressionsregulation auch eine direkte oder indirekte posttranslationale Regulation/Kontrolle der Depolymeraseaktivität vorliegen (s. Anmerkungen zur AktivatorKomponente).

#### 4.3.1. PhaZRr – die Minimalform einer Typ 2-PHA-Depolymerase

PhaZRr aus *R. rubrum* besitzt hohe Spezifität für nPHB und vermag denaturierte parakristalline PHA nicht zu hydrolysieren. Wie alle bisher bekannten PHA-Depolymerasen (PhaZ7 aus *P. lemoignei* eingeschlossen), konnte PhaZRr aufgrund fehlender Aktivität mit Tributyrin, Triolein, Olivenöl und Poly- $\epsilon$ -caprolacton und *p*-Nitrophenylacylestern klar von der Gruppe der Lipasen (JAEGER et al., 1995; ARPIGNY et al., 1998) abgegrenzt werden. Die enzymatische Aktivität von PhaZRr unterscheidet sich hinsichtlich des Oligomersubstrat- und Produktspektrums auch deutlich von der ebenfalls in der vorliegenden Arbeit charakterisierten extrazellulären nPHA-Depolymerase, PhaZ7.

Wie bereits für partiell angereicherte Fraktionen beobachtet (MERRIK und DOUDOROFF, 1964) und mit gereinigtem Enzym bestätigt (diese Arbeit), erforderte die Hydrolyse von nPHB offenbar eine „Aktivierung“ der nPHB-Substratgranula durch eine im Zuge der Proteinreinigung aus der löslichen Proteinfraction von *R. rubrum* abgetrennte Komponente, nachfolgend als „Aktivator“ bezeichnet. In Abwesenheit dieser Komponente zeigte PhaZRr im titrimetrischen Test nur maximal 20 % der Aktivität nach Aktivator-Vorbehandlung der Substratgranula. Dies gilt sowohl für nPHB als auch nPHV unabhängig vom entsprechenden Donororganismus. Auch nPHB-Granula aus rekombinanten, die PHB-Biosynthesegene aus *R. eutropha* H16 tragenden *E. coli* HMS174 (pJM9238::*phaCAB* ± pBluescript::*phaP*; KIDWELL et al., 1995; je ein Stamm mit und ohne *phaP*) erfordern eine Behandlung mit Aktivator. Die AktivatorKomponente selbst besitzt jedoch offenbar keinerlei hydrolytische Aktivität.

Gereinigte PhaZRr war im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersuchten extrazellulären PHB-Depolymerasen aus *P. lemoignei* in gepufferter wässriger Lösung instabil. Anders als nPHB-Depolymerase aus PhaZ7 zeigte das Enzym sich äußerst sensitiv gegenüber einer Behandlung mit reduzierenden Agentien, was unter Berücksichtigung der nachgewiesenen 8 Cysteine in der abgeleiteten Aminosäuresequenz (reifes Protein) auf das Vorhandensein von möglicherweise strukturell erforderlichen Disulfidbrücken schließen läßt. Für sechs Cysteinpositionen wird basierend auf CysPred-Analysen die Ausbildung von Disulfidbrücken vorgeschlagen. Sensitivität gegenüber DTT und Mercaptoethanol und eine hieraus abgeleitete mögliche Beteiligung von Cysteinen an intramolekularen Disulfidbrücken oder eine Funktion bei der Substraterkennung ist auch für extrazelluläre dPHB-Depolymerasen beschrieben (BRUCATO und WONG, 19991; JENDROSSEK, 1996; 2001c). SHINOMIYA et al. (1997) wiesen mittels ortsspezifischer Mutagenese eine für die

katalytische Aktivität (nicht die Substratbindung) essentielle Disulfidbrücke zwischen einem C-terminalen Cystein und einem Cystein der postulierten Substratbindedomäne von PhaZ aus *A. faecalis* T1 nach. Lipase aus *P. aeruginosa* besitzt ebenfalls eine für die Stabilität des Enzyms erforderliche Disulfidbrücke, welche wie im Falle der Lipase aus *Aeromonas hydrophila* (BRUMLIK et al., 1997) erst nach SDS-Behandlung des Enzyms durch DTT reduziert werden kann (LIEBETON et al., 2001). Interessanterweise ist diese Disulfidbrücke oberflächenexponiert (NARDINI et al., 2000), was die Autoren zu der Annahme führt, daß möglicherweise Protein-assoziierte Komponenten der Lipopolysaccharidschicht aus *P. aeruginosa* einen Schutz vor dem Angriff durch DTT bieten könnten. An dieser Stelle sei auf die beobachtete leicht verminderte Temperaturstabilität heterolog (*E. coli*, *B. subtilis* WB800) exprimierter dPHB-Depolymerase PhaZ5 aus *P. lemoignei* verwiesen (BRAAZ et al., 2002), deren Ursache die Autoren in der fehlenden Glykosylierung des rekombinanten Proteins vermuten.

Die Untersuchungen zur Ionenabhängigkeit ergaben Hinweise auf eine mögliche Stabilisierung des Enzyms in Gegenwart geringer Konzentrationen einwertiger ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ; 1-10 mM) und zweiwertiger ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ; 1 mM) Ionen, wobei sich die Rate der Hydrolyse jedoch gegenüber der Kontrolle nur geringfügig erhöht. Zusatz von EDTA bewirkt konzentrationsabhängig ein Absinken der Aktivität. Vollständige Inaktivierung des Enzyms durch Chelatkomplexbildner wurde jedoch nicht beobachtet. Es besteht offenbar eine gewisse Abhängigkeit der nPHB-Hydrolyse von  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ . Für Granula-gebundene Depolymerase aus *R. eutropha* H16 ist die Zunahme der Hydrolyse in Gegenwart von  $\text{MgCl}_2$  (SAITO et al., 1995) beschrieben. In Gegenwart von EDTA konnte ebenfalls eine Verringerung der hydrolytischen Aktivität beobachtet werden (JENDROSSEK et al., 1997; HANDRICK und JENDROSSEK, 1998). Die Abnahme der Hydrolyserate für intrazelluläre nPHB-Depolymerase aus *P. denitrificans* in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$  bei Einsatz gereinigten Enzyms (GAO et al., 2001) muß möglicherweise als Artefakt des Testsystems gewertet werden. Auch im Falle von PhaZRr oder PhaZ7 führten Konzentrationen zweiwertiger Ionen  $>25$  mM zur scheinbaren Verringerung der Hydrolyseraten, jedoch war klar eine makroskopische Aggregation der nPHB-Granula und eine Ausfällung flockiger Niederschläge in entsprechenden Kontrollen ohne Enzym zu erkennen. Nur für PhaZ aus *P. denitrificans* (GAO et al., 2001) konnte bisher keine Inhibierung der Depolymeraseaktivität durch EDTA nachgewiesen werden. Eine Reihe von Lipasen zeigen ebenfalls Sensitivität gegenüber reduzierenden Agentien und Chelatkomplexbildnern (JAEGER et al., 1999). In vielen Fällen ist für eine effektive Hemmung jedoch die Gegenwart denaturierender Substanzen (Harnstoff, SDS) erforderlich. Anhand der unlängst aufgeklärten Kristallstruktur der Lipase aus *P. aeruginosa* wurde pro Molekül ein gebundenes  $\text{Ca}^{2+}$  nachgewiesen (NARDINI et al., 2000). Die Bindung erfolgte über in Lipasen der Familien 1.1 und 1.2 hoch konservierte saure Aminosäuren (Asp209 und Asp253), sowie die Carbonyl-O-Atome von Gln257 und Leu261 und zwei Wassermoleküle im oktaedrischen Komplex. Das gebundene Ion stabilisiert die Lage eines Loops, der das katalytisch aktive His251 trägt, und ist durch seine Lage im Innern des Proteins vor einem Angriff

durch EDTA partiell geschützt. Eine Einlagerung in das Proteinmolekül erfolgt offenbar bereits während der Proteinfaltung. Die Struktur der Bindestelle zeigt hohe Homologien zu den entsprechenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen in *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia glumae* und *Chromobacterium viscosum* (KIM et al., 1997; SCHRAG et al., 1997). Möglicherweise besitzt PhaZRr ebenfalls enzymgebundenes, unter den beschriebenen Bedingungen zur Untersuchung der EDTA-Wirkung jedoch im Protein-Inneren partiell geschützt vorliegendes  $\text{Ca}^{2+}$ .

PhaZRr war, im Unterschied zu PhaZ7, äußerst sensitiv gegenüber Detergentien, eine Eigenschaft, die für die extrazellulären dPHB-Depolymerasen PhaZ5 und PhaZ2 ebenfalls gezeigt werden konnte. Die Ursachen könnten jedoch möglicherweise unterschiedlicher Natur sein, da PhaZRr offenbar keine typische PHA-Substratbindedomäne besitzt. Eine Maskierung der Granula durch SDS (gemischte SDS-PHB-Micellen) ist aufgrund der gefundenen Aktivität mit SDS oder Cholat stabilisierten artifiziellen amorphen Granula als Ursache der fehlenden Aktivität unwahrscheinlich. Möglicherweise findet unter den beschriebenen Bedingungen auch eine Anlagerung von Detergenz direkt an das Protein statt. Die intrazellulären nPHB-Depolymerasen aus *R. eutropha* und *P. denitrificans* sind vergleichbar sensitiv gegen Triton X-100 und SDS-Behandlung (HANDRICK und JENDROSSEK, 1998; GAO et al., 2001).

Wie die Mehrheit der bisher untersuchten PHA-Depolymerasen zeigt PhaZRr höchste katalytische Aktivität im alkalischen pH-Bereich. Lösliche intrazelluläre PHB-Depolymerase-Fractionen aus *Z. ramigera* I-16-M (SAITO et al., 1992) sowie *R. eutropha* H16 (SAITO et al., 1995; SAEGUSA et al., 2001) zeigen ebenfalls Hydrolyseoptima im pH-Intervall 8,5-10. *R. eutropha* H16 besitzt offenbar mindestens zwei intrazelluläre nPHB-Depolymerasen. Mit cytoplasmatischen Proteinfractionen aus *R. eutropha* konnte, unter Verwendung von Protease-behandelten oder artifiziellen amorphen PHA-Granula, Aktivitäten einer löslichen nPHB-Depolymerase mit alkalischem pH-Optimum bestimmt werden (SAITO et al., 1995). Aus chromosomalen „knock-out“-Mutanten des Enzyms isolierte nPHB-Granula zeigten eine verminderte, jedoch nicht völlig eliminierte nPHB-Depolymeraseaktivität (HANDRICK et al., 2000; SAEGUSA et al., 2001). Da durch die Konstruktion der Mutanten mittels Deletion und Einfügen von Rasterschubmutationen das Protein vollständig inaktiviert vorlag, sprechen die Ergebnisse für die Existenz mindestens eines Granula-gebundenen Depolymerase-Isoenzymes (HANDRICK et al., 2000). Granula-gebundene Depolymerase besitzt ein vom pH-Optimum der löslichen Depolymerase abweichendes pH-Optimum im Bereich von 7,0 (HANDRICK und JENDROSSEK, 1998, HANDRICK et al., 2001). Nach Ergebnissen immunologischer Untersuchungen zur Lokalisation des Enzyms in *R. eutropha* H16 lag die von SAEGUSA et al. (2001) klonierte Depolymerase offenbar nPHB-assoziiert vor.

Für den Nachweis einer katalytischen Aktivität aller mittlerweile bekannten, aus der löslichen Proteinfraction isolierten nPHB-Depolymerasen ist die Verwendung artifizieller PHB-Granula oder Protease-behandelter nPHB-Granula als Substrat erforderlich. Auch die Enzyme aus *P. denitrificans* (GAO et al., 2001) und *R. eutropha* H16 (SAEGUSA et al., 2001) zeigen keine signifikante Aktivität

mit intakten nPHB-Granula. Denkbar wäre die Beteiligung einer dem Aktivator aus *R. rubrum* vergleichbaren Komponente an der Aktivierung der nPHB-Granula. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des jeweiligen Assay-Systemes für einen Nachweis entsprechender Depolymeraseaktivität. Die untersuchten PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen PhaZRr und PhaZ7 zeigen keine Aktivität mit dem bisher insbesondere für die extrazellulären PHA-Depolymerasen als Screening-Substrat eingesetzten parakristallinen Polymer. Der Nachweis von nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen erfordert den Einsatz amorpher PHA-Substrate. Bei Verwendung nativer PHA-Granula aus Wildtypzellen, z. B. aus *R. eutropha* H16, *Z. ramigera* oder *P. oleovorans*, muß durch entsprechende Kontrollen oder adäquate Testbedingungen (pH-Wert, Behandlung mit Protease) sichergestellt werden, daß möglicherweise Granula-gebundene intrazelluläre PHA-Depolymerasen nicht zur Verfälschung der Testergebnisse aufgrund der von verschiedenen Autoren beschriebenen Autohydrolyse (HANDRICK et al., 2000; JENDROSSEK et al., 1997; SAITO et al., 1992; FOSTER et al., 1994; FOSTER et al., 1996) führen. Eine Behandlung mit Proteasen hat jedoch stets zur Folge, daß neben gebundenen Depolymerasen auch andere Granula assoziierte Proteine (z. B. GA24 aus *R. eutropha* H16; WIECZORECK et al., 1996; HANLEY et al., 1999) hydrolysiert werden und damit die natürliche Integrität der gesamten Granulamembran zerstört wird. Bei einer Behandlung der Granula mit Aktivatorkomponente aus *R. rubrum* waren hingegen in elektronenmikroskopischen Untersuchungen keine solch drastischen Strukturveränderungen erkennbar (Dr. M. MADKOUR, Universität Göttingen, pers. Mitteilung). Alternativ können, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, auch PHA-Granula aus rekombinanten *E. coli*, welche die Gene (*phaCAB* oder *phaCABP*) der PHA-Synthese aus *R. eutropha* tragen, als Testsubstrat verwendet werden. Diese Polymergranula sind aufgrund der rekombinanten Bildung frei von PHA-Depolymerasen, jedoch binden auch Fremdproteine des rekombinanten Stammes unspezifisch an die Granulaoberfläche. Eine Protein-freie Variante amorpher PHA stellen die artifiziellen Polymergranula mit emulsionsstabilisierenden Detergentien anstelle der natürlichen Membran dar (HOROWITZ und SANDERS, 1994). Wie unter 3.7.6. gezeigt, werden solche Granula jedoch auch durch einige dPHA-Depolymerasen z. T. hydrolysiert. Die An- oder Abwesenheit von Proteinen in der Membran natürlicher Granula könnte entscheidenden Einfluß auch auf die Hydrolyse durch intrazelluläre nPHA-Depolymerasen haben. Die Coexpression eines unlängst entdeckten Phasinproteins (GA16; MAEHARA et al., 1999) aus *P. denitrificans* mit den PHA-Biosyntheseegenen *phaCAB<sub>Pd</sub>* in rekombinanten *E. coli* zeigte im Vergleich zu Kontrollen ohne *phaP<sub>Pd</sub>* einen Abnahme der Granula-Durchmesser bei nahezu Verdopplung der akkumulierten PHB-Menge. Interessanterweise ging die Expression von *phaP* mit einer Erhöhung der Granulaanzahl/Zelle und einer Halbierung der Molekulargewichte bei sinkender Polydispersität einher. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die von JOSSEK et al. (1998) beobachtete erhöhte Turnover-Rate der PHA-Synthase (PhaC) in Gegenwart von Phasinprotein (PhaP) darstellen.

Aufgrund der erwähnten strukturellen Unterschiede artifizieller und nativer PHA-Granula sowie der möglicherweise besonderen Rolle Granula-gebundener Proteine in der Regulation von PHA-

Synthese-/Abbau sind mit artifiziellen PHA-Granula erhaltene Befunde nicht ohne weiteres auf die mögliche Polymerhydrolyse *in vivo* übertragbar. Auch mit Proteasen/Lipasen in Gegenwart von Oleat (SAITO et al., 1995) gewonnene nPHA geben nur den amorphen Zustand des Polymers, nicht jedoch die für eine Untersuchung von intrazellulären nPHA-Depolymerasen zu fordernde *in vivo*-Situation wieder. Die Konstruktion *phaZ*-negativer Stämme und die Untersuchung der resultierenden Phänotypen wäre für eine Klärung der Funktion *in vivo* erforderlich. Experimente zur PHB-Mobilisierung und Hydrolyse nativer PHB-Granula aus *phaZRe* knockout-Mutanten von *R. eutropha* H16 (-826 bp Deletion; Frameshift, zusätzliche Stopcodons) zeigten, daß die von SAEGUSA et al. (2001) postulierte intrazelluläre nPHA-Depolymerase in diesem Stamm offenbar nicht allein für die Hydrolyse des endogenen Polymers verantwortlich ist (HANDRICK et al., 2000). Der PHB-Gehalt des Wildtypstammes sank unter PHB-Mobilisierungsbedingungen (Kohlenstoffmangel) innerhalb von 12 h um über 40 %. Die  $\Delta$ *phaZ*-Mutanten zeigten noch eine Verringerung des endogenen Polymers um > 25 %. In Abbauxperimenten schonend isolierte (intakte) nPHB-Granula wiesen im Falle der Mutante noch 50 % der PHB-Hydrolyserate auf, was die Existenz mindestens einer weiteren Granula-gebundenen nPHB-hydrolytischen Aktivität in *R. eutropha* H16 nahelegt.

Die signifikante Hemmung der hydrolytischen Aktivität von PhaZRr durch den Serinproteaseinhibitor DFP sowie die hohe Spezifität für PHA<sub>SCL</sub>-Oligomere und nPHA<sub>SCL</sub> lassen vermuten, daß das Enzym wie die bereits beschriebene extrazelluläre nPHB-Depolymerase PhaZ7 zur Klasse der Serinhydrolasen gehört, obwohl PMSF oder DDSC keine Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität zeigen. Die geringe Wirkung der letztgenannten Serinhydrolase-Inhibitoren könnte in einer im Vergleich zu DFP schlechteren Zugänglichkeit des katalytischen Zentrums von PhaZRr begründet sein. Die biochemischen Eigenschaften von PhaZRr stimmen gut mit den Befunden von GAO et al. (2001) und SAEGUSA et al. (2001) für intrazelluläre nPHA-Depolymerasen sowie in eingeschränktem Maße für PhaZ7 überein. Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse bekräftigen die Zugehörigkeit von PhaZRr zur  $\alpha/\beta$ -Hydrolasefold-Proteinfamilie (OLLIS et al., 1992; NARDINI und DIJKSTRA, 1999).

Völlig überraschend bestanden zwischen der in *E. coli* klonierten nPHB-Depolymerase aus *R. rubrum* und den unlängst veröffentlichten Sequenzen anderer intrazellulärer nPHB-Depolymerasen (SAEGUSA et al., 2001; GAO et al., 2001) jedoch keinerlei signifikante Homologie. Auch von der extrazellulären nPHB<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 unterschied sich PhaZRr erheblich. Mit durchschnittlich > 30 % Identität bei Ähnlichkeiten > 50 % stellten ausnahmslos extrazelluläre dPHB-Depolymerasen mit katalytischer Domäne des Typs 2 (Abfolge der katalytischen Aminosäuren: Serin<sub>42</sub>, Aspartat<sub>115</sub>, Histidin<sub>155</sub>, H<sub>250</sub>G<sub>251</sub>-Motiv der Oxyaniontasche) die am nächsten verwandte Proteinspezies, wobei sich die Homologien jeweils über das gesamte Protein erstreckten (s. 3.14.3.).

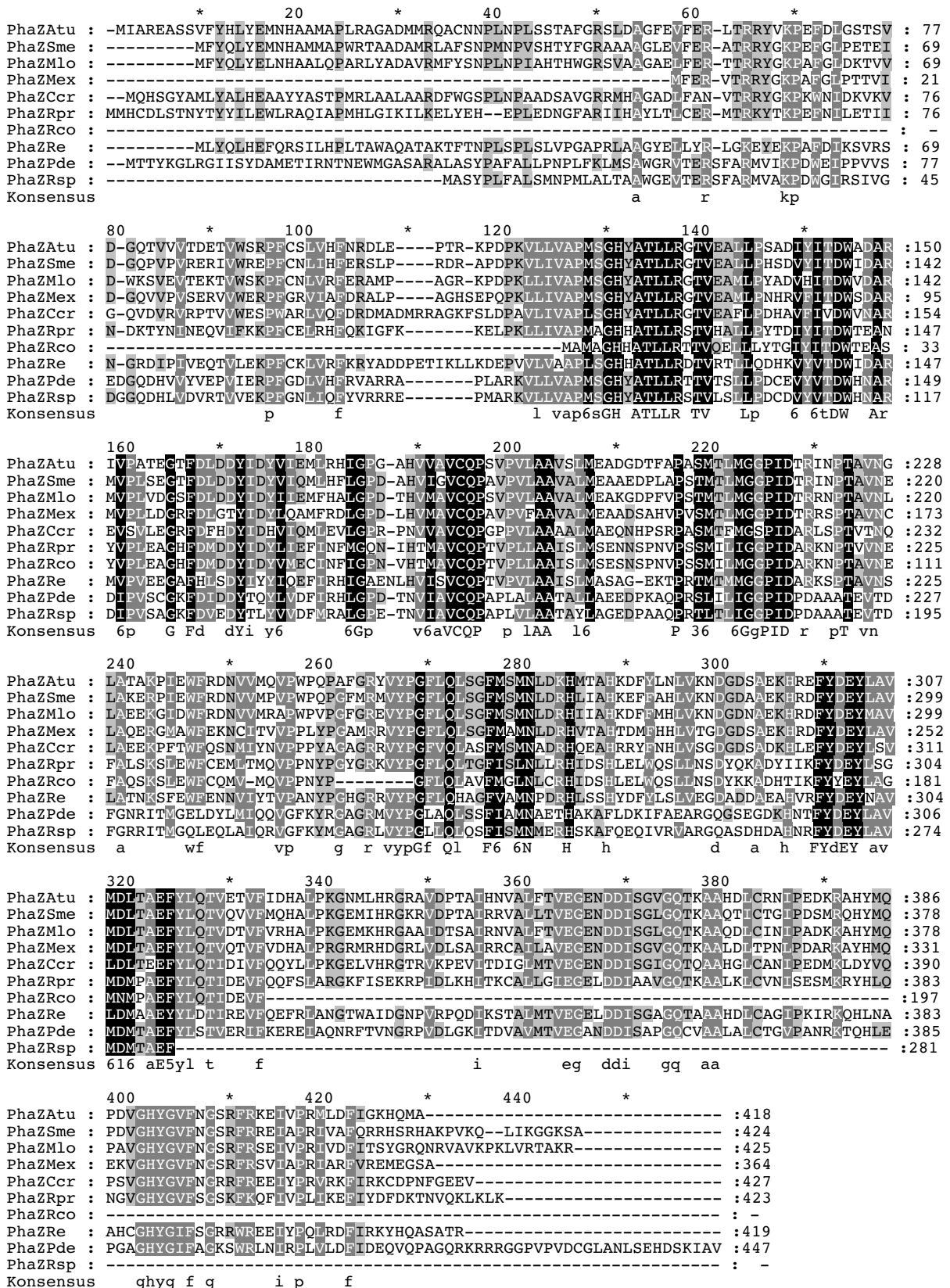


Protein	Pos. Serin (S)	Pos. Aspartat (D)	Pos. Histidin (H)	Pos. Oxyaniontasche (HG)	Referenz
<b>dPH<sub>ASCL</sub> Depolymerasen (S)</b>					
Typ 1					
Phaz5P1e	138 IDPNÖVYVVTGLSSGGGET	213 VM-GTSDFTV	272 GMSHAWPAGTG	49 LVLVLLHGCAQTAS	JENDROSSEK et al. (1995b)
Phaz6P1e	136 IDPNÖIYISGLSSGALET	211 VY-GSNDALIV	269 GMSHAWPAGSG	46 LMLSLHGGCGQTAS	SCHÖBER et al. (2000)
PhazRpi K1	140 IDPNÖVYVVAAGLSSGGGMT	215 VM-GTSDYTV	274 GMAHAWPAGTG	50 LVLVLLHGCCLQTAS	SAITO (1999)
PhazRpi	139 IDPNÖVYVVAAGLSSGGGMT	214 AVWGTSDYTV	273 GMAHAWPAGTG	49 LVLVLLHGCVQTAS	KURUSO et al. (1994)
PhazPst	125 IDANRRFITGLSSGGAMA	202 ILÖNRNDCTV	251 GCRHIAVYTDG	40 MVMALLHGCRTND	OHURA et al. (1999)
PhazPsp GM101	125 IDANRRFITGLSSGGAMA	202 ILÖNRNDCTV	251 GCRHIAVYTDG	40 MVMALLHGCRTND	KIM et al. (2000)
PhazAfAT1	139 IDPNÖVYVVAAGLSSGGGMT	214 VM-GTSDYTV	273 GMAHAWPAGTG	49 LVLVLLHGCVQTAS	SAITTO et al. (1989)
PhazAfAE122	119 IDPNÖVYIAGLSSGSASFA	191 SIHGDA DTTV	248 LWFHGLDHSWS	37 LLIIVLHGCCTQSID	KITA et al. (1997)
Phaz1P1e	117 IDPSRVYVVTGLSAGAFMT	195 IWHGSSD YTV	253 GMGHGTPVDPG	35 LVVALLHGCDDTAA	JENDROSSEK et al. (1993b)
Phaz2P1e	117 IDTNRVYVVTGLSAGGYMV	195 IWHGDAD YTV	253 GMGHGTPVDPG	35 LVIAMHGCCTQSAS	BRIESE et al. (1994b)
Phaz3P1e	117 IDANRVYVVTGLSAGAFMT	195 VWÖGSSD YTV	253 GMAHGTVPDPG	35 LIVAMHGCCTQSAS	BRIESE et al. (1994b)
PhazShy	131 ADPÖRTYITGLSAGAMT	209 IWHGDKD YTV	269 GIGHGTPVDPG	48 VVFALLHGCCTQDAQ	WU et al. (2000)
Phaz4P1e	137 IDPNÖIYVSGLSAGAGET	212 VY-GDKD YLIV	270 GMSHAWPSPGG	47 LMLSLHGCCTQTAS	JENDROSSEK et al. (1995b)
Typ 2					
PhazAsp	20 IDKTÖTTVSGLSSGGFMA	107 LFSGTLLD SVV	141 ASEHAMVTTDDY	233 LHVVLHGCKQNVN	KOBAYASHI et al. (1999)
PhazSex	25 NATDÖISVSGLSGGFMA	111 LFHGTNDSTV	143 ASGHAWVSP LG	237 LMVTLHGCYÖYFG	KLINGBEIL et al. (1996)
PhazCsp	20 IATDÖISVSGLSGGFMA	105 IFFTGTSD YTV	140 GAAHVLPTDFD	258 LHVVLHGCGQSTP	JENDROSSEK et al. (1995a)
PhazCac	20 IDKTÖTTVSGLSSGGFMA	107 LFSGTLLD SVV	141 AAEHAMVTTDDY	233 LHVVLHGCGQSTP	KASUYA et al. (1997)
PhazCte	20 IATDÖISVSGLSGGFMA	105 IFFTGTSD YTV	140 GAAHVLPTDFD	233 LHVVLHGCGQSTP	SHINOMIYA et al. (1997)
PhazLsp**	20 IDKSÖISVSGLSGGFMA	104 LFVGTSDSTI	139 GAAHVFPPTDFD	231 LHVVALHGCGQSYA	TAKEDA et al. (2000)
<b>KONSENSUS</b>					
id--q*-v-GLSSsg+---					
**-g--D*TLV					
g--H-*p---g					
<b>nPH<sub>ASCL</sub> Depolymerase</b>					
PhazRr	19 IDADHVTVSGLSSGAYMA	115 LFTGEADTVV	155 KAGHAFILTPDR	250 LHIAFHGCKQSDQ	diese Arbeit
<b>dPH<sub>AWCL</sub> Depolymerase</b>					
PhazPfl1	139 INAÖRÖYATGSISSGGYNT	193 FLHGFVDAVV	227 LGGHEWFAASP	78 ÖNLLDHGYAVIAP	SCHIRMER und JENDROSSEK (1994)

**Abb. 103:** Alignment katalytisch aktiver Bereiche bekannter dPHA-Depolymerasen mit potentiell an der nPHB-Hydrolyse beteiligten Aminosäuren von PhazRr (nach JENDROSSEK 2001b, modifiziert). *Legende:* Phaz1 bis Phaz6: *Pseudomonas lemoignei*, PhazAfAT1: *Alcaligenes faecalis* T1, PhazRpiA1: *Ralstonia pickettii* strain A1, PhazRpiK1: *Ralstonia pickettii* strain K1, PhazShy: *Streptomyces hygroscopicus*, PhazPst: *Pseudomonas stutzeri*, PhazPsp.GM101: *Pseudomonas* sp. GM101; PhazAspTP4: *Acidovorax* sp., PhazDac: *Deifita acidovorans*, PhazCsp: *Comamonas* sp., PhazCte: *Comamonas testosteroni*, PhazLspHS: *Lepthorix* sp. Stamm HS\*\* (synonym *Calldimonas manganoxidans*, TAKEDA et al., 2002); PhazSex: *Streptomyces exfoliatus*, PhazRr: *Rhodospirillum rubrum*, PhazPfl: *Pseudomonas fluorescens* GK13.

Primärstrukturalignments und Sekundärstrukturanalysen stützen die aufgrund der biochemischen Charakterisierung getroffene Annahme, daß es sich um eine Serin-Hydrolase handelt. Insbesondere die Bereiche potentiell katalytisch aktiver Aminosäuren weisen einen hohen Grad an Übereinstimmung mit den entsprechenden Konsensussequenzen aller dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen auf (Abb. 103). Nur innerhalb des als Lipasebox (PERSSON et al., 1989) bezeichneten, in dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen strikt konservierten Pentapeptidmotives GLS(S/A)G, lag Leucin an Position zwei ausgetauscht gegen ein Isoleucin vor. Beide Aminosäuren besitzen aliphatische Seitenketten, wobei Isoleucin in größerer Entfernung vom Peptidgerüst sterisch weniger Raum beansprucht. Das Motiv GISSG findet sich im katalytischen Zentrum der extrazellulären PHO-Depolymerase aus *P. fluorescens* GK13 (SCHIRMER und JENDROSSEK, 1994). Die Funktionalität des katalytischen Serins konnte durch Aminosäureaustausch Serin gegen Alanin mittels gerichteter Mutagenese nachgewiesen werden (SCHIRMER et al., 1995; JENDROSSEK et al., 1997). Es handelt sich jedoch um eine PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerase mit hoher Spezifität für PHA mit einer Seitenkettenlänge der Monomere von fünf Kohlenstoffatomen.

Zur postulierten intrazellulären nPHB-Depolymerase aus *R. eutropha* H16 homologe Proteine weichen deutlich von von PhaZRr ab (Alignment potentieller intrazellulärer nPHB-Depolymerasen s. Abb. 104). Bisher ist über das mögliche katalytische Zentrum dieser Enzyme nichts bekannt. Neben ihrer Sensitivität gegenüber Serinproteaseinhibitoren und einer Spezifität für nPHB spricht jedoch auch die Lokalisation der zugehörigen *phaZ*-Strukturgene in unmittelbarer Nachbarschaft zu PHA-Synthasegenen für die Beteiligung dieser Proteine am intrazellulären PHA-Metabolismus. Das Gen der intrazellulären PHA-Depolymerase *phaZ* aus *P. denitrificans* ist in antiparalleler Orientierung in unmittelbarer Nachbarschaft zu *phaC* (PHA-Synthase) lokalisiert (MAEHARA et al., 1999; GAO et al., 2001). Auch bei ORF1 des PHA-Operons aus *Rhodobacter sphaeroides* (HUSTEDE und STEINBÜCHEL, 1993) kann aufgrund der Homologien mit PhaZRe aus *R. eutropha* H16 vermutet werden, daß es sich bei dem entsprechenden Genprodukt um eine intrazelluläre PHA-Depolymerase handelt. In *Sinorhizobium meliloti* werden am PHB-Stoffwechsel beteiligte Gene sowohl chromosomal- als auch Plasmid-codiert (CHARLES et al., 1997). Zwischen den PHA<sub>MCL</sub>-Synthasegenen *phaC1* und *phaC2* aus *P. oleovorans* (HUISMAN et al., 1991), *P. aeruginosa* (TIMM und STEINBÜCHEL, 1992), *Pseudomonas* sp. 61-3 (MATSUSAKI et al., 1998), *Pseudomonas putida* (GARCIA et al., 1999) und *Pseudomonas mendocina* (HEIN et al., 2002) findet sich eine vergleichbare Lokalisation der PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasegene in unmittelbarer Nähe weiterer Gene des PHA-Stoffwechsels ( $\beta$ -Ketothiolase; Acetoacetyl-CoA-Reduktase). In allen zur Gattung *Pseudomonas* gehörenden Stämmen liegt das Strukturgen der PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerase abweichend von PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen offenbar stets zwischen zwei Synthasegenen in der gleichen Orientierung wie die zugehörigen PHA-Synthasen vor.



**Abb. 104:** Primärstrukturelignment intrazellulärer nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen und homologer Proteine. PhaZ= PHA-Depolymerase; PhaZAtu: *Agrobacterium tumefaciens*, PhaZSme: *Sinorhizobium meliloti*, PhaZMlo: *Mesorhizobium loti*, PhaZMex: *Methylobacterium extorquens*, PhaZCcr: *Caulobacter crescentus*, PhaZRpr: *Rickettsia prowazekii*, PhaZRe: *Ralstonia eutropha*, PhaZPde: *Paracoccus denitrificans*, PhaZRsp: ORF1-Genproduct aus *Rhodobacter sphaeroides*, PhaZRco: *Rickettsia conorii*. Algorithmus ClustalX 1.8 (THOMSON et al., 1994, 1997)/ Gonnet Proteinmatrix). Homologe Aminosäuren wurden in Abhängigkeit vom Grad der Übereinstimmung grau hinterlegt (schwarz = Identität).

Intrazelluläre PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen weisen einen weitaus höheren Grad der Konservierung auf als intrazelluläre nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen. In *R. eutropha* selbst liegt das von SAEGUSA et al. (2001) beschriebene *phaZ*-Gen (1257 Nukleotide; 47,3 kDa) offenbar ausserhalb des PHB-Genklusters. Unlängst konnte das komplette PHA-Genkluster aus *Methylobacterium extorquens* AM1 identifiziert und kloniert werden (KOROTKOVA und LINDSTROM, 2001). Produkte zweier hierbei gefundenen Gene intrazellulärer nPHA-Depolymerasen, DepA und DepB, wiesen Identitäten von 47 und 49 % zur nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. eutropha* H16 auf. Knock out – Mutanten dieser intrazellulären nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen zeigten keine signifikanten phänotypischen oder wachstumsphysiologischen Veränderungen. Interessanterweise sind die beiden *depA* flankierenden ORFs homolog zu potentiellen Histidin-Kinasen. Wie unter 3.8.9. gezeigt, besitzt auch der in paralleler Orientierung vor *PhaZ7* lokalisierte ORF 2 aus *P. lemoignei* signifikante Ähnlichkeiten zu Zweikomponenten-Regulationssystemen. Die tatsächliche Funktion des potentiellen Genproduktes ist noch unbekannt. Es könnte es sich möglicherweise um ein an der Streßbewältigung der Zelle beteiligtes Sensorsystem handeln.

Bei Analyse der Alignments extrazellulärer dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen des Typs 2 und *PhaZRr* aus *R. rubrum* (s. 3.14.3.) fällt auf, daß *PhaZRr* hohe Homologie zur N-terminalen Region und der katalytischen Domäne der dPHA<sub>SCL</sub>-Typ2-Depolymerasen besitzen, jedoch offensichtlich die für extrazelluläre dPHA-Depolymerasen typische Bindedomäne fehlt. Auch eine Linkerdomäne, welche in Form einer Threonin-reichen, Fibronektin TypIII- oder Cadherin-artigen Domäne in allen bisher bekannten extrazellulären dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen als Bindeglied zwischen N-terminaler katalytischer und der C-terminaler Substratbindedomäne nachgewiesen wurde, ist offenbar nicht vorhanden. Daß es sich hierbei nicht um einen durch fehlerhafte DNA-Sequenzierung verursachten vorzeitigen Sequenzabbruch und darauf basierende Mißinterpretation der Daten handeln kann, ist durch die gute Übereinstimmung der experimentell in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermittelten und der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Molekularmasse abgesichert. Während dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen eine Molekülmasse von 40 bis 70 kDa aufweisen (JENDROSSEK, 2001b), war *PhaZRr* mit 35 kDa von geringerer Größe. Nur nPHA-Depolymerase *PhaZ7* aus *P. lemoignei* (36 kDa) und intrazelluläre und extrazelluläre PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen besitzen mit 25 bis 32 kDa eine geringere Molekularmasse. Für mittlerweile bekannte intrazelluläre nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen abgeleitete Molekulargewichte liegen mit 47 kDa (*PhaZRe*; *R. eutropha* H16; SAEGUSA et al., 2001) bzw. 49 kDa (GAO et al., 2001) ebenfalls oberhalb der gefundenen Werte. Die Inaktivität der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase gegenüber dPHA<sub>SCL</sub> könnte auf dem Fehlen der Linker und Substratbindedomäne beruhen. Für die Hydrolyse amorpher PHA-Granula sind derartige Strukturmerkmale offenbar nicht erforderlich. Auch für die extrazelluläre nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase *PhaZ7* aus *P. lemoignei* konnten keine zu den genannten Domänenstrukturen homologe Bereiche nachgewiesen werden. Im Falle von *PhaZRr* spielt möglicherweise der eingangs erwähnte Aktivator für die Substraterkennung eine entscheidende Rolle. Für die Sekundärstruktur wird in *PhaZRr* eine C-

terminale  $\alpha$ -Helix mit hydrophobem Charakter vorhergesagt. Die Struktur endet mit dem Alanin des Motivs AGR, welches im N-terminalen Bereich der Substratbindedomänen nahezu aller dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen konserviert ist. Eine Reihe von Autoren schlagen für die Bindung der dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen an parakristalline Polymere neben einem hydrophoben Charakter der Bindedomäne zur Anlagerung an Methyl-/Acylseitengruppen der PHA auch eine spezifische Interaktion zwischen konservierten Aminosäuren der C-terminalen Depolymeraseregion und den Esterbindungen des Polymersubstrates vor (SHINOMIYA et al., 1998; KASUYA et al., 1999; YAMASHITA et al., 2001). Bisher liegt keine signifikante experimentelle Evidenz für diese Theorie vor. Für die Klärung der Interaktion der nPHB-Depolymerase PhaZRr mit nPHB bzw. der Ursache des Fehlens einer Aktivität mit dPHA<sub>SCL</sub> sind weiterführende Versuche notwendig. Die offensichtlich unterschiedliche Spezifität von nPHA<sub>SCL</sub>- und dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen für eine amorphe oder parakristalline Polymerstruktur sowie eine Konstruktion von Fusionsproteinen aus PhaZRr und den C-terminalen Domänen von Typ 2 dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen würde einen möglichen Weg zur Klärung der Frage auch nach der Substraterkennung durch dPHA-Depolymerasen eröffnen.

Ein unerwartetes Ergebnis stellte der Nachweis einer für ein 23-Aminosäuren großes typisches N-terminales Signalpeptid kodierenden 5'-Region des *phaZR*-Genes aus *R. rubrum* dar. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wies alle von PUGSLEY (1993) und VON HEIJNE (1983) geforderten Eigenschaften N-terminaler Signalpeptide Gram-negativer Organismen inklusive einer Erkennungsstelle (AWA23/D24SLPKL) für die Signalendopeptidase auf. Die theoretische vorhergesagte Schnittstelle wurde durch die N-terminale Sequenzierung des Proteins und den gefundenen Start der Sequenz mit N'-DSLPKL bestätigt. Die für das reife Protein ermittelten Molekularmassen sowohl in der SDS-PAGE als auch durch MALDI-TOF-MS stimmten mit der abgeleiteten Sequenz überein. Die Aktivität des rekombinant in *E. coli* exprimierten Enzyms war in Rohextrakten und im Kulturüberstand der Klone nachweisbar, was eine Erkennung der offenbar funktionellen Signalsequenz durch *E. coli* eigene Sec-Proteine und die Signalpeptidase vermuten läßt. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre eine extrazelluläre oder zumindest periplasmatische Lokalisation der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZRr zu fordern.

Bei Anzucht von *R. rubrum* konnte jedoch keinerlei extrazellulär lokalisierte nPHB-Depolymeraseaktivität nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für zellfreie Kulturüberstände als auch die direkte Inkubation aktivierter nPHB-Granula mit Suspensionen ganzer Zellen im Titristatexperiment, um eine mögliche zellassoziierte Lokalisation zu auszuschließen. Die Depolymeraseaktivität war erst nach einem Aufschluß der Zellen im löslichen Proteinextrakt nachweisbar. Auch MERRICK und DOUDOROFF (1961, 1964) und MERRICK et al. (1999) gewannen Depolymerase-haltige Fraktionen erst durch Aufschluß der Zellen. Eine eventuelle periplasmatische Lokalisation von PhaZ7 kann jedoch aufgrund der leichten Lysierbarkeit der Zellen aus bisher vorliegenden Daten nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Aufgrund des bereits

geschilderten besonderen Aufbaues der nativen PHA-Granula aus einer inneren PHA-Matrix und einer äußeren stabilisierenden Membranstruktur aus Proteinen und Phospholipiden wäre jedoch auch eine physiologische Funktion des Signalpeptides denkbar. Ähnlich der für Eukaryonten beschriebenen Mechanismen zur Kompartimenterkennung könnte PhaZRr mittels der Signalsequenz sein Substrat „erkennen“. Grundlage einer solchen gewagten Hypothese sind Beobachtungen wonach in rekombinanten *E. coli* XL1-blue, welche die PHA-Synthesegene aus *R. eutropha* H16 heterolog exprimieren, deutliche Änderungen des Musters Granula-assoziiierter Proteine auftreten. (WIECZORRECK et al., 1995, WIECZORECK, 1997). Erstaunlicherweise bildete  $\beta$ -Lactamase aus dem Wirtsorganismus eine der Hauptfraktionen Granula-gebundener Proteine in rekombinanten nPHB-Granula. Die Autoren zeigten durch Edman-Sequenzierung, daß es sich um das  $\beta$ -Lactamase-Präprotein mit intakter Signalsequenz handelte. Dieses Enzym wird in *E. coli* normalerweise in das Periplasma transportiert und nach Abspalten der Signalsequenz durch die Leaderpeptidase in Gegenwart intermolekularer Chaperone (GroEL, GroES) gefaltet (LAMINET et al., 1990). Offenbar handelte es sich um eine „Fehlleitung“ des Proteins infolge der Ähnlichkeiten zwischen Granula und Cytoplasmamembran. Die Signalsequenz der  $\beta$ -Lactamase besteht aus 23 Aminosäuren. Hydrophobizitätsanalysen mit der unlängst reevaluierte Sequenz des von WIECZORECK et al., 1995 beschriebenen Phasinproteins GA24 zeigen interessanterweise einen PhaZRr-vergleichbaren hydrophoben N'-Terminus. Diesem Bereich könnte eine Funktion in der Erkennung der PHA-Granulaoberfläche zukommen. Jedoch ergab im Unterschied zu PhaZRr eine Sequenzanalyse mittels SignalP keine Anhaltspunkte für eine mögliche posttranslationale Modifikation von GA24, was mit den publizierten Daten der N'-terminalen Aminosäuresequenzierung und massenspektrometrischen Peptidfragment-Analysen in Einklang steht (HANLEY et al., 1999).

Um die entscheidende Fragestellung der Lokalisation der nPHA-Depolymerase in *R. rubrum* sicher klären zu können, wurden bereits weiterführende Versuche initiiert, die nach erfolgreicher rekombinanter Überexpression und Reinigung von PhaZRr als His6-Fusionsprotein die Herstellung polyklonaler Antikörper für eine *in vivo*-Detektion des Enzyms in *R. rubrum* mittels polyklonaler Immuno-Gold-Antikörper und elektronenmikroskopischen Techniken zum Ziel haben.

#### **4.3.2. Anmerkungen zur Aktivatorkomponente des nPHB-hydrolysierenden Systems in *R. rubrum***

Native PHA-Granula aus *R. eutropha* H16 besitzen eine Hüllschicht aus Lipiden, Phasinproteinen und funktionellen Proteinen (PHA-Synthasen, PHA-Depolymerasen), welche für die Aufrechterhaltung der amorphen Polymerkonformation und den kolloidalen Zustand des hydrophoben Polymers im wässrigen Milieu des Cytoplasmas essentiell ist (MERRICK et al., 1965; McCOOL et al., 1996; STEINBÜCHEL et al., 1995). Diese Hüllmembran (s. 1.; Abb 1) besteht im Falle von nPHA<sub>SCL</sub> aus *R. eutropha* H16 offenbar aus einer Lipid-Protein-Layer (MAYER, 1992; MAYER et al., 1996; MAYER und HOPPERT, 1997) in der die Phasine als dominierende Komponente neben einer

essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Granulastruktur (*phaCAB* aus *R. eutropha* H16 exprimierende rekombinante *E. coli* ohne *phaP*-Gen zeigen eine deutlich verringerte Anzahl nPHB-Granula) möglicherweise auch regulatorische Funktion besitzen (STEINBÜCHEL et al., 1995; YORK et al., 2000; 2001). Im Falle von *R. eutropha* H16 bildet ein Phasinprotein von 24 kDa Größe den Hauptanteil der granulaassoziierten Proteine (WIECZORREK et al., 1995; 1996).

Die Wirkung der Aktivatorkomponente kann durch eine Reihe von Endoproteinasen (Serinproteasen: Trypsin, MERRICK und DOUDOROFF; 1964, Chymotrypsin, Endoproteinase Arg-C; Metalloendopeptidasen: Thermolysin, Mycolysin, SANDER und HANDRICK, unveröffentlicht) ersetzt werden. Die hieraus mögliche Schlußfolgerung, bei der Aktivatorkomponente handele es sich ebenfalls um eine Protease, erwies sich jedoch offenbar als unzutreffend. Eine fehlende proteolytischen Aktivität der angereicherten Aktivatorfraktionen mit Casein und N- $\alpha$ -Benzoyl-L-arginin-4-nitranilin sowie die Insensitivität gegenüber Proteaseinhibitoren (Ovomucoid, PMSF, EDTA, Antipain Dihydrochlorid, Pefabloc®SC) lassen einen anderen Mechanismus der Substrataktivierung vermuten. Mit Aktivator behandelte Granula weisen keine signifikanten Änderungen des SDS-PAGE-Musters Granula-assoziiierter Proteine auf. Hinweise auf einen von der Proteaseaktivierung abweichenden Mechanismus der Aktivatorwirkung ergeben sich auch aus den Experimenten mit dPHB-Depolymerase PhaZ5. Das Enzym zeigte keine Aktivität mit intakten nPHB-Granula, führte jedoch nach Trypsinbehandlung des Substrates zur raschen Hydrolyse des Polymers. Die Proteaseaktivierung war in diesem Falle wie auch für alle anderen getesteten dPHA-Depolymerasen nicht durch die Aktivatorkomponente zu ersetzen. Der aktivierende Effekt durch Behandlung der nPHB-Granula mit Protease beruht offenbar auf einer „Demaskierung“ des Substrates durch Zerstörung der Membran-integrierten Granulaproteine. Der Aktivator selbst ist äußerst Protease-sensitiv. Trypsin, Thermolysin, Mycolysin, (SANDER, 1998) sowie Endoproteinase GluC, Chymopapain, PronaseE (TECHNOW, 2000) zerstören irreversibel dessen Funktion. Offenbar handelt es sich um eine Komponente mit essentiellen Peptid- oder Esterbindungen, deren Wirkung möglicherweise in einer biophysikalischen Interaktion mit der Protein-Phospholipid-Schicht nativer PHA-Granula bzw. der Vermittlung einer Bindestelle für PhaZRr, nicht jedoch in einer proteolytischen Aktivität besteht.

Die Hydrolysierbarkeit der PHB-Granula durch PhaZRr ist offenbar direkt mit dem physikalischen Zustand des Polymers korreliert. Parakristalline dPHAS<sub>CL</sub> wurden nicht hydrolysiert. Exzessive Vorinkubation mit Protease (>15 min) führte zur Erhöhung der zu beobachtenden Resttrübung bzw. zum vorzeitigen Abbruch der Säurefreisetzung aus derart vorbehandelten nPHB-Granula im Titrationsexperiment, welche auch durch Zugabe frischen Enzyms unverändert bleibt. Auch die Behandlung von nPHB mit Phospholipase A führte zum Verlust der Hydrolysierbarkeit, wobei der Effekt weitaus drastischer ausfiel als bei fortschreitender Trypsinbehandlung. Diese Beobachtungen können konsistent auf die Konformationsänderungen des Polymers zurückgeführt werden. Weitwinkel-Röntgenbeugungsspektren Natriumhypochlorit-behandelter PHB-Granula aus *R. eutropha*

H16 (dPHB) weisen eine Reihe charakteristischer Peaks im Bereich  $2\theta = 10-30^\circ$  auf. Intakte nPHB-Granula führen aufgrund des Fehlens kristalliner Bereiche zu keinem klaren Beugungsmuster. KAWAGUCHI und DOI (1990) konnten für Lipase-behandelte Granula oder mit Natriumhypochlorit, NaOH bzw. Aceton extrahierte Proben nach 2 h ein dPHB-vergleichbares Spektrum nachweisen. Die Autoren beobachteten im direkten Vergleich für Trypsin-behandelte Granula kaum signifikante Änderungen des Kristallinitätsgrades nach zweistündiger Inkubation. Die Ergebnisse deuten auf eine relativ langsame Zunahme der Kristallinität nach Trypsinbehandlung und eine rasche Kristallisation von nPHA infolge der Zerstörung von Lipidkomponenten der Granulamembran (Lipasebehandlung). Je geringer der amorphe PHB-Anteil im Polymer, desto höher ist offenbar der verbleibende (nicht durch PhaZRr hydrolysierbare) Gehalt an PHB in lamellar kristalliner Struktur. Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß ein Zusatz von dPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ5 nicht nur zu einer weiteren Säurefreisetzung im Titrationsexperiment (was auch als Hinweis auf entstandene 3-HB-Oligomere interpretierbar wäre) sondern auch zur weiteren Trübungsabnahme führte, die nur durch Hydrolyse noch verbliebener (mittlerweile parakristalliner) PHB zu erklären ist.

Ob es sich bei der PHA-Depolymerase aus *R. rubrum* tatsächlich um ein Enzym mit offenbar hoher Präferenz für PHAS<sub>SCL</sub> in amorpher Form handelt, oder möglicherweise andere Strukturkomponenten der nPHA-Granula die Spezifität bedingen, wurde (wie im Falle von PhaZ7) in Abbauxperimenten mit nach HOROWITZ und SANDERS (1994) gewonnenen artifiziellen PHAS<sub>SCL</sub>-Granula untersucht. Die gereinigte nPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* zeigte hydrolytische Aktivität mit artifiziellen PHB-Granula, deren amorphe Polymerkonformation durch die Detergentien SDS oder Natriumcholat in wässrigem Milieu stabilisiert wurde. Für die Hydrolysierbarkeit durch PhaZRr bedarf es in diesen Fällen weder einer Aktivierung mit Trypsin noch der Anwesenheit des Aktivators (HANDRICK und JENDROSSEK, 1998). Die *in vivo* die Granulamembran bildenden Proteine sind folglich für die Hydrolyse amorpher PHB durch PhaZRr nicht erforderlich. Offenbar liegt die Ursache für die geringe Aktivität von PhaZRr mit nPHB in Abwesenheit der Aktivatorkomponente nicht in einer möglicherweise in nur schwach aktiver Form vorliegenden Depolymerase, was der Annahme widerspricht, daß es sich bei der aktivierenden Komponente um einen Cofaktor bzw. ein intermolekulares Chaperon nach Art der Colipasen handeln könnte, welche die Aktivität lipolytischer Enzyme durch Konformationsänderungen regulieren (LOWE, 1997). Eine kurze lag-Phase vor Beginn der Hydrolyse bei zeitgleicher Zugabe von Aktivator und Depolymerase, welche bei sukzessivem Zusatz beider Komponenten nicht beobachtet wird, deutet ebenfalls eher auf eine Modifikation der Substratgranula. Interessanterweise erwies sich die nPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* mit ebenfalls amorphen, CTAB-stabilisierten PHB-Granula in Tris-HCl (pH 9.0 mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> oder CaCl<sub>2</sub>) unabhängig von der Gegenwart des Aktivators als inaktiv. Diese Befunde entsprechen dem Aktivitätsmuster der extrazellulären nPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7. Für beide Proteine wurden bei isoelektrischen Punkten > pH 9,0 eine Bindung an DEAE und Mono P-Anionenauschersäulen erst bei pH Werten > 10,5 ermittelt. Da es sich bei CTAB im Gegensatz zu SDS und Cholat um ein



kationisches Detergenz handelt, wirkt sich eine positive Oberflächenladung möglicherweise bereits hemmend auf die Enzymbindung an die positiv geladene Granulaoberfläche und damit auf die Hydrolysierbarkeit amorpher CTAB-PHA-Granula aus. In unabhängigen Versuchen von MERRICK et al. (1999) erhaltene Daten bestätigen die Beobachtungen und liefern einen möglichen physikalischen Ansatzpunkt für das beobachtete Phänomen. Die Autoren beschreiben ebenfalls Aktivator-unabhängig eine Aktivität von angereicherten löslichen Proteinextrakten aus *R. rubrum* mit Cholat-nPHB (negative Oberflächenladung) und zeigen das Fehlen signifikanter Hydrolyseraten mit CTAB-nPHB (positive Oberflächeladung). Bei Verzicht auf den Zusatz von  $MgCl_2$ , wurde jedoch in Gegenwart des Aktivators aus *R. rubrum* auch CTAB-nPHB sowohl durch PhaZRr-haltige Proteinextrakte als auch Depolymerase-haltige Kulturüberstände aus *P. lemoignei* hydrolysiert. Der Aktivator könnte also durch eine Kompensation der Oberflächenladung eine physikalische Interaktion der Depolymerase mit den Substrat-Granula bewirken, wobei geringe Menge  $MgCl_2$  oder  $CaCl_2$  offenbar bereits das korrekte Anlagern des Aktivators an die CTAB-PHB-Micellen unterbinden. Eine mögliche Interaktion zwischen Aktivator und Depolymerase im Bereich zwischen pH 6 und 9 wäre aufgrund der unter 3.11.2. gezeigten stark divergierenden isoelektrischen Punkte beider Komponenten denkbar. Für eine rein physikalische Wirkung spräche auch die schlechte Quantifizierbarkeit der aktivierenden Wirkung. Der Versuch, den Aktivator durch Zusatz des stark negativ geladenen Heparins zu ersetzen, führte nur für Kulturüberstände aus *P. lemoignei* zu einer Rekonstitution der Hydrolyseaktivität mit CTAB-nPHB (MERRICK et al., 1999). Auch im Testsystem mit nativen PHB-Granula konnte Heparin die Funktion des Aktivators nicht übernehmen. Eine allein auf der physikalischen Kompensation von Ladungen der Granulaoberfläche basierende Funktion der Aktivator-Komponente im Falle der nPHAS<sub>CL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* ist daher unwahrscheinlich. Sollte der Aktivator dennoch seine Wirkung über einen elektrostatischen Effekt entfalten, dann müsste dies in einer Art geschehen, die es der Depolymerase anders als im Falle von Heparin erlauben sollte, ihr Substrat zu erkennen. Möglicherweise müsste eine Spezifität für Komponenten auf der Granulaoberfläche als auch für PhaZRr gefordert werden, wenn der Aktivator z.B. als eine Art Substratanker wirken sollte.

GRIEBEL und MERRICK (1971) beschrieben die Aktivator- und Protease-unabhängige Hydrolyse nativer PHB-Granula aus *Bacillus megaterium* durch angereicherte Extrakte löslicher Depolymeraseaktivität aus *R. rubrum* nach Behandlung der Granula mit 0,01 M NaOH. So präparierte Granula wurden ohne weitere Behandlung direkt von Depolymerase-haltigen Fraktionen aus *R. rubrum* hydrolysiert. Der alkalische Extrakt wurde durch Gelfiltration in zwei Fraktionen getrennt. Während eine offenbar PHB-Synthase-haltige Fraktion keinen Einfluß auf die Hydrolyseraten hatte, führte die Zugabe der zweiten Fraktion (niedrigmolekularer als Fraktion 1) zu einer durch Trypsin oder Aktivator-Behandlung reversiblen Hemmung der Hydrolyse. Die Autoren schlossen auf die Gegenwart einer Granula-assoziierten Inhibitor-Komponente, welche die direkte Hydrolyse von nPHB durch Depolymerase unterbindet und vor einem Angriff der Depolymerase auf die Substratpolyester

durch Aktivator modifiziert werden muß. Gestützt wird diese Hypothese durch Befunde, wonach Triton X-114-Extrakte aktiver PHB-Granula ebenfalls reversibel die Hydrolyse hemmen, jedoch Extrakte von bereits mit Aktivator behandelten Granula offenbar keine weitere Aktivierung erfordern (MERRICK et al., 1999). Vorgeschlagen wird eine Modifikation des potentiellen Inhibitors durch die Aktivator Komponente, bzw. die Zerstörung des Inhibitors durch Protease, was impliziert, daß es sich bei dem postulierten Inhibitormolekül um eine Verbindung mit Peptidbindungen handeln sollte.

Interessanterweise wurden auch nPHB-Granula aus rekombinanten *E. coli* HMS174 (pJM9238 ± pBluescript::phaP) mit und ohne Phasinproteinen nach Behandlung der Granula mit Aktivatorfraktionen mit fünffach höherer Rate vergleichbar mit dem Anstieg bei Verwendung von nPHB aus *R. eutropha* H16 hydrolysiert. Da es sich, wie bei den von MERRICK und DOUDOROFF (1964) verwendeten nativen PHB-Granula aus *B. megaterium*, um ein heterologes Testsystem handelt, scheint eine Phasin-pezifische Wirkung des Aktivators wenig wahrscheinlich.

Herausragende Eigenschaften des Aktivators sind seine Temperatur- (MERRICK und DOUDOROFF, 1964), Lösungsmittel-, pH- und Trocknungsstabilität. Eine Inkubation für 10 min bei 121°C zeigt keine signifikante Aktivitätsverringerng (TECHNOW, 2000). Hohe Temperatur und Lösungsmittel- und Trocknungsstabilität sind z. B. für eine Reihe von Lipasen charakteristisch (Lipasen aus *Pseudomonas*, GILBERT, 1993; aus *G. thermooleovorans*, CHO et al., 2000). Für den Aktivator ließ sich jedoch bisher keine lipolytische Aktivität nachweisen (keine Säurefreisetzung bei Aktivatorzugabe im Titrationsexperiment mit nPHB bzw. polaren oder unpolaren Lipidfraktionen aus Eigelb bzw. den Membranen von *B. subtilis* oder *E. coli*), so daß eine Aktivierung nativer PHB-Granula durch Modifikation der membranbildenden Lipide nicht wahrscheinlich ist. Wie bereits erwähnt, führte die Vorinkubation mit Lipasen zur raschen Kristallisation des Polymers und einer drastischen Reduzierung der Hydrolyseraten, was ebenfalls gegen die Annahme einer lipolytischen Aktivierung von nPHB spricht.

Die Aktivator Komponente verhält sich amphiphil und ist offenbar in einer Reihe polarer und unpolarer Lösungsmittel (Alkane, Ketone, aliphatische oder aromatische Alkohole) stabil. Gemeinsam mit TECHNOW (2000) durchgeführte Versuche zur Lösungsmittlextraktion zeigten, daß der Aktivator höhere Löslichkeit in leicht polaren Lösungsmitteln aufwies. Ein Ausschütteln mit Hexan, Pentan, Toluol oder Butanol war nicht möglich. Mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol konnte eine signifikante Anreicherung aus der wässrigen Phase erreicht werden, jedoch zeigte sich, daß gleichzeitig auch im Verlaufe der bis dahin erfolgten Aufreinigung noch enthaltene vermeintliche Proteinkontaminationen in der Lösungsmittelphase enthalten waren. Die amphiphilen Eigenschaften sprechen für eine mögliche Membraninteraktion des Aktivators mit der Membran nativer Granula, wobei sowohl eine Interaktion mit den Phospholipiden als auch mit amphiphilen membranbildenden Proteinen der nPHB-Granula in Betracht gezogen werden müßte. Für Lipasen wie z.B. Lipase aus *B. glumae* oder *P. aeruginosa* sind sogenannte Lif („lipase specific foldase“) - Proteine als intermolekulare Chaperone beschrieben (FRENKEN et al., 1993; IHARA et al., 1992), welche N-

terminale hydrophobe Membrananker zur Immobilisierung in der Cytoplasmamembran besitzen (JAEGER et al., 1994; JAEGER, 1999). Die Interaktion der Lipase mit dem jeweiligen Lif-Chaperon ist spezifisch und die Komplexbildung ist Calcium-abhängig (SHIBATA et al., 1998). Diese Lif-Proteine sind essentiell für eine korrekte ATP-unabhängige Faltung der Lipase im Periplasma. Die Annahme eines solchen Aktivierungsmechanismus würde jedoch eine direkte Aktivierung der Depolymerase am Granulum implizieren und die Aktivitäts-lag-Phasen bei gleichzeitiger Zugabe von PhaZRr und Aktivator könnten nur über eine möglicherweise für die Chaperonfunktion essentielle Membranbindung („Verankerung“) erklärt werden, was für Lif-Chaperone (anhand N-terminal deletierter Proteine gezeigt) nicht erforderlich scheint (JAEGER et al., 1999). Gegen eine solche Hypothese spricht nicht nur die Aktivität der nPHB-Depolymerase PhaZRr mit artifiziellen PHB-Granula in Abwesenheit des Aktivators sondern auch die mögliche Substitution des Aktivatoreffektes mit Proteasen oder geringen Konzentrationen NaOH (GRIEBEL und MERRICK, 1971).

Ein interessanter Ansatzpunkt für die Klärung der möglichen Aktivatorfunktion bietet ein Vergleich mit den sogenannten Colipasen. Zur effektiven Lipid-Hydrolyse durch Pankreas-Lipase ist die Gegenwart einer Colipase als Mittler zwischen Lipase und Öl/Wasser-Interphase erforderlich. Die Colipase erfüllt einem Anker für das hydrolytische Enzym vergleichbare Funktionen und besitzt neben einer hydrophilen Oberfläche, welche mit der C-terminalen nicht katalytischen Domäne der Lipase interagiert, eine hydrophobe Struktur zur Verankerung in den Substratmicellen (CORDLE und LOWE, 1998). Colipasen sind kleine Proteinfaktoren (10-20 kDa). Ihre Bindung an die jeweilige Lipase stabilisiert deren aktive Konformation und erhöht im Komplex mit der Lipase die hydrophobe Substratbindeoberfläche. Eine weitere Funktion der Colipasen besteht offenbar in einer Stabilisierung der Lid-Domäne der Lipasen in der offenen Konformation, wie mittels Mutation der für eine ionische Bindung verantwortlichen Aminosäure (Glu) gezeigt werden konnte (direkte Proteinaktivierung – Lipaseaktivität sinkt um zwei Größenordnungen; LOWE, 1997). HERMOSO et al. (1996) konnten anhand von Kristallstrukturen nachweisen, daß die Gegenwart von Colipase und Micellen des nichtionischen Detergens Tetraethylglycol-monooctylether zu einer Stabilisierung der offenen Konformation führt. Zur Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zwischen Colipase und Lid kommt es erst in Anwesenheit von Substrat- oder Detergenzmicellen. Humane Colipase wird als Procolipase durch Abspaltung eines Pentapeptides posttranslational modifiziert. Das Peptid, Enterostatin, besitzt Hormonfunktion und reguliert den Fettstoffwechsel (ERLANSON-ALBERTSSON, 1992). Während die amphiphilen Eigenschaften des Aktivators offenbar mit denen der Colipasen vergleichbar sind, sprächen auch bei dieser Möglichkeit einer Aktivierung der PHA-Depolymerase-Aktivität aus *R. rubrum* die beobachteten Aktivitäten mit Cholate-behandelten Granula gegen die Notwendigkeit einer „CoPHase“ in Form des Aktivators. Für einige bakterielle Lipasen sind jedoch auch reine Grenzflächenaktivierungseffekte beschrieben (CYGLER und SCHRAG, 1997).

Eine regulatorische Funktion des Aktivators im PHA-Metabolismus der Zelle wäre denkbar. Die Wachstumsversuche mit *R. rubrum* zeigten eine Korrelation der nPHB-Depolymeraseaktivität mit dem PHB-Gehalt der Zellen und der Wachstumsphase.

#### **4.4. Verwandtschaft der nPHA-Depolymerasen mit anderen PHA-Depolymerasen (E.C.3.1.1.75; E.C.3.1.1.76) und Carboxylesterasen (E.C.3.1.1.1.)**

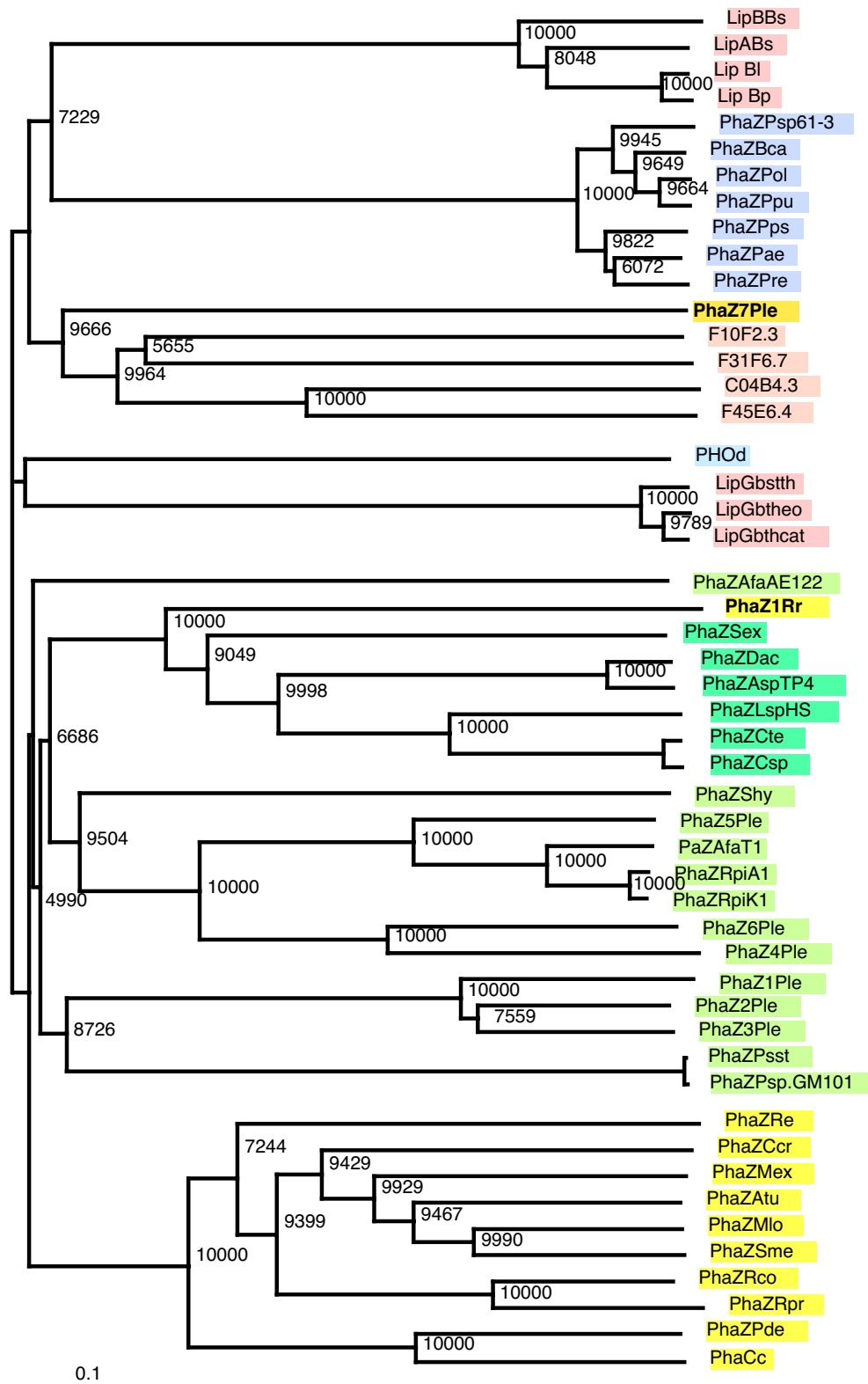
Es wurde ein Alignment der in dieser Arbeit charakterisierten nPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen PhaZ7 (*P. lemoignei*) und PhaZRr (*R. rubrum*) mit Aminosäuresequenzen bekannter und postulierter Proteine aus Datenbanken durchgeführt. Der in Abbildung 105 gezeigte resultierende Stammbaum ausgewählter Hydrolasen verdeutlicht mögliche Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen Gruppen der PHA-Depolymerasen und Lipasen. Obwohl das Alignment ausschließlich auf Aminosäureprimärstrukturdaten beruht, werden auch in funktioneller Hinsicht einander nahestehende Enzyme in entsprechenden Gruppen zusammengefaßt. Intrazelluläre PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen, die untereinander Sequenzhomologien von > 60 % zeigen, sind offenbar der Gruppe der esteraseartigen Lipasen nahestehend. Interessant sind in diesem Zusammenhang Befunde von EGGERT et al (2000; 2001) wonach eine Substitution von Alanin<sup>76</sup> der *Bacillus*-typischen Lipasebox A-x1-S-x2-G von LipB aus *B. subtilis* gegen das in anderen Lipasen und einer Reihe von PHA-Depolymerasen (z.B. intrazellulären PHO-Depolymerasen) typische Glycin zu einer drastischen Erhöhung der Aktivität für Monoolein um Faktor 10<sup>3</sup> führt.

Die nPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 steht den eine separate Gruppe offenbar geringer Verwandtschaft bildenden hypothetischen, bisher aufgrund der Homologien zu den Lipasen gerechneten Proteinen aus *Caenorhabditis elegans*, nahe. Die Verwandtschaft von PhaZ7 zu Proteinen unbekannter Funktion aus dem saprozooisch lebenden Nematoden ist signifikant, jedoch überwiegend auf den N-terminalen Bereich des reifen Proteins beschränkt. Vorläufige Ergebnisse aus Fütterungsversuchen zur Verwertung PHB-reicher Zellen von *R. eutropha* H16 durch *Paramecium caudatum* legen nahe, daß PHA auch von Eukaryonten hydrolysiert und metabolisiert werden könnte (J. GIERLICH und D. JENDROSSEK, Universität Stuttgart, persönliche Mitteilung). Aus Abbildung 105 wird ersichtlich, daß zu dPHAS<sub>SCL</sub> und intrazellulären nPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerasen offenbar nur äußerst geringe Beziehungen bestehen.

Die dPHB<sub>SCL</sub>-Depolymerasen und intrazelluläre nPHA-Depolymerasen bilden separate Gruppen, wobei im Stammbaum die Ähnlichkeiten insbesondere innerhalb der dPHB<sub>SCL</sub>-Depolymerasen des Typs 2 am höchsten sind. Mit deutlich geringerer Homologie wird auch die nPHAS<sub>SCL</sub>-Depolymerase aus *R. rubrum* dieser Enzymgruppe zugeordnet. Ruft man sich die biochemischen Eigenschaften der

im Verlaufe dieser Arbeit charakterisierten Enzyme in Erinnerung, dann wird deutlich, daß zwischen PhaZRr und dPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen oder zwischen Lipasen der *B. subtilis*-Familie und PhaZ7 signifikante Unterschiede insbesondere hinsichtlich des Substratspektrums bestehen. Während Lipasen mit *p*-Nitrophenylacylester-Substraten Aktivitäten von typischerweise  $> 10^2$  U/mg aufweisen (MANCO et al., 1998; EGGERT et al., 2001) zeigt PhaZ7 bei vergleichsweise geringer Aktivität für die löslichen Ester ( $< 0,4$  U/mg) eine hohe Spezifität für nPHA<sub>SCL</sub> auf ( $> 9000$  U/mg). Zwar bestehen Sequenzhomologien zu *Bacillus*-Lipasen im Bereich der katalytisch aktiven Aminosäuren, über weite Bereiche des Proteins insbesondere mit zunehmender Entfernung vom N-Terminus jedoch weichen die Primär- und Sekundärstrukturen deutlich voneinander ab. Während Lipasen überwiegend sensitiv für eine Behandlung insbesondere mit ionischen Detergentien sind, zeigt PhaZ7 keinen Aktivitätsverlust in Gegenwart von SDS, Triton X-100 oder Tween. Typische Esterase-/Lipase-Substrate wie Tributyrin, Triolein oder Olivenöl werden durch PhaZ7 nicht hydrolysiert. Die Aktivität scheint strikt auf amorphe PHA<sub>SCL</sub> beschränkt. Bei PhaZ7 handelt es sich offensichtlich nicht um eine Lipase.

Die heterogene Gruppe der Lipasen wurde unlängst unter Berücksichtigung von Aminosäuresequenzhomologien und grundlegenden biochemischen Eigenschaften einer Neuklassifizierung unterzogen (ARPIGNY und JAEGER, 1999). Die erste der 8 Proteinfamilien faßt alle echten Lipasen in sechs Subfamilien zusammen (I.1. *P. aeruginosa*-Subfamilie, I.2. *Burkholderia glumae* Subfamilie, I.4. *B. subtilis* Subfamilie, I.5. *Geobacillus thermophilus*-Subfamilie, I.6. *Propionibacterium acnes* Subfamilie). Enzyme verschiedener Esteraseaktivität sind jeweils einer der weiteren 7 Familien zugeordnet. Aufgrund der signifikanten Unterschiede zwischen PHA-Depolymerasen, Lipasen und einer Reihe weiterer Esterasen wurde vorgeschlagen, die Klassifizierung um eine neunte Familie (extrazelluläre PHA-Depolymerasen) zu erweitern (HANDRICK et al., 2001). Subfamilie 9.1 enthält bisher nur einen Vertreter, die nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZ7 aus *P. lemoignei*. Aufgrund der gezeigten Unterschiede zwischen PhaZ7 und anderen extrazellulären PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen sollten diese dPHA-spezifischen Enzyme in der Subfamilie 9.2 erfaßt werden.



**Abb. 105:** Verwandtschaft bekannter PHA-Depolymerasen (PhaZ) und ausgewählter Lipasen (Lip) sowie hypothetischer Proteine. Nach initialem Aminosäurealignment der reifen Proteine (ClustalX1.8, Gonnet Proteinmatrix THOMSON et al., 1997) erfolgte die Berechnung des Stammbaumes mittels „neighbour joining“ (SAITOU und NEI, 1986) und Bootstrap-Analyse (Felsenstein, 1995). [Bootstrap-Parameter: Zufallszahl 997; Alterationen: 10000] bei automatischer Korrektur multipler Substitutionen. War die Größe von Signalsequenzen nicht bekannt, wurde zuvor mittels SIGNALP (NIELSEN et al., 1997) die mögliche Signalpeptidase-Schnittstelle lokalisiert und das Präprotein „*in silico*“ prozessiert. Die arabischen Zahlen geben die Häufigkeit des Auftretens der entsprechenden Astlänge und Verzweigung in einer Auswahl von 10000 erzeugten Stammbäumen wieder (Bootstrap). Zur besseren Übersicht wurden einzelne Enzymgruppen farbig unterlegt.

**verwendete Abkürzungen (vorangehende Seite):****abgeleitete hypothetische Proteine aus GenBank:**

*Caenorhabditis elegans*: F31F6.7, C04B4.3, F45E6.4, F10F2.3;

**Lipasen:**

LipBBs: *Bacillus subtilis* Lipase B, LipABs: *Bacillus subtilis* Lipase A, LipBl: *Bacillus licheniformis* LipBp: *Bacillus pumilus* Lipase, LipGbsth: *Geobacillus stearothermophilus*; LipGbtheo: *Geobacillus thermooleovorans*, LipGbthcat: *Geobacillus thermocatenolatus*

**Intrazelluläre PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen:**

PhaZPae: *Pseudomonas aeruginosa*, PhaZPre: *Pseudomonas resinovorans*, PhaZPps: *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, PhaZPol: *Pseudomonas oleovorans*, PhaZPpu: *Pseudomonas putida*, PhaZBca: *Burkholderia caryophylli*, PhaZPsp61–3: *Pseudomonas* sp. strain 61–3

**Extrazelluläre PHA<sub>MCL</sub>-Depolymerasen:**

PHOd: extrazelluläre PHO-Depolymerase *Pseudomonas fluorescens* GK13

**Extrazelluläre PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen Typ 1:**

PhaZ1 bis PhaZ6: *Pseudomonas lemoignei*, PhaZAfaT1: *Alcaligenes faecalis* T1, PhaZRpiA1: *Ralstonia pickettii* strain A1, PhaZRpiK1: *Ralstonia pickettii* strain K1, PhaZShy: *Streptomyces hygroscopicus*, PhaZPsst: *Pseudomonas stutzeri*, Pssp.GM101: *Pseudomonas* sp. GM101

**Extrazelluläre PHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen Typ 2:**

PhaZAspTP4: *Acidovorax* sp., PhaZDac: *Delftia acidovorans*, PhaZCsp: *Comamonas* sp., PhaZCte: *Comamonas testosteroni*, PhaZLspHS: *Lepthotrix* sp. Stamm HS\*\* (synonym *Caldimonas manganoxidans*, TAKEDA et al., 2002), PhaZSex: *Streptomyces exfoliatus*, PhaZRr: *Rhodospirillum rubrum*

**Intrazelluläre nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerasen:**

PhaZAtu: *Agrobacterium tumefaciens*, PhaZSme: *Sinorhizobium meliloti*, PhaZMlo: *Mesorhizobium loti*., PhaZMex: *Methylobacterium extorquens*, PhaZCcr: *Caulobacter crescentus*, PhaZRpr: *Rickettsia prowazekii*, PhaZRe: *Ralstonia eutropha*, PhaZPde: *Paracoccus denitrificans*, PhaZRsp: ORF1-Genprodukt aus *Rhodobacter sphaeroides*, PhaZRco: *Rickettsia conorii*

**4.5. Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit konnte der erstmalige Nachweis einer extrazellulären nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymeraseaktivität am Beispiel von *P. lemoignei* erbracht werden. Das Enzym unterscheidet sich grundlegend von Lipasen und anderen PHA-Depolymerasen. Bisher ist keine 3-D Struktur einer PHA-Depolymerase bekannt. Da die Substratspezifität deutlich von Lipasen und Esterasen abzugrenzbar ist, wäre eine Depolymerase-Kristallstruktur zum Verständnis molekularer Mechanismen der Polymerhydrolyse von Vorteil. Die für PhaZ7 gefundene Tendenz zur Bildung von Mikrokristallen sollte bei stetig fortschreitender Analysetechnik (Mikrokristallstrukturanalyse durch Röntgenbeugung, NMR) eine Gewinnung von verwertbaren Kristallen zur Röntgenstrukturaufklärung ermöglichen. Hierzu wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Dr. Tassos Papageorgiou (Turku Centre for Biotechnology, Turku, FINLAND) bereits weiterführende Experimente initiiert. Die Kenntnis der Tertiärstrukturen von PHA-Depolymerasen würde die Chance eröffnen, mechanistische Einblicke in Prinzipien der PHA-Bindung und Hydrolyse zu erhalten und möglicherweise Antworten zur Frage der Substratspezifität sowie des gehäufteten Auftretens von Isoenzymen bei Polymerhydrolasen liefern. Die von EGGING et al. (2000) beobachteten Spezifitätsänderungen bei einem Austausch des offenbar *Bacillus*-Lipase-typischen Alanins der Lipasebox (AHSMG) werfen die Frage nach den Folgen einer solchen Modifikation im *Bacillus*-identischen Lipasebox-Motiv von PhaZ7 auf. Die Kenntnis einer Vielzahl von Enzymstrukturen, Enzymspezifitäten und Mechanismen sollte es ermöglichen, auf dem Wege des Proteindesign, neuartige Biokatalysatoren mit heute möglicherweise noch unbekanntem Spezifitäten/Eigenschaften zu entwickeln.

Mit der erfolgreichen Isolierung und Klonierung einer weiteren nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase, PhaZRr, aus *R. rubrum* und der Charakterisierung des gereinigten Enzyms rückt die Lösung einer wichtigen Fragestellung zum PHA-Stoffwechsel in greifbare Nähe. Die Summe aller mittlerweile bekannten Eigenschaften des Aktivators der nPHB-Hydrolyseaktivität aus *R. rubrum* sowie der Verfügbarkeit ausreichender Mengen rekombinanter, Aktivator-freier nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase PhaZRr aus den rekombinanten *E. coli* Klonen K368: pBlueskriptKS-::*phaZ7*; sowie pJOE4036::*phaZ7*-His<sub>6</sub> (S. REINHARDT und T. REICHERT, Universität Stuttgart, persönliche Mitteilung) wird es möglich sein, die Aktivatorkomponente zu reinigen und mittels entsprechender Analytikmethoden deren Natur aufzuklären (Protein: Edman-Abbau, MALDI-TOF-Massenspektrometrie; eventuelle niedermolekulare Verbindungen: HPLC-MS, LC-MS, Gaschromatographie-MS, ESI-MS, NMR, MALDI-TOF-MS). Für eine Reinigung des Aktivators kann, basierend auf den verfügbaren Daten, ein optimiertes Reinigungsprotokoll entworfen werden, welches dem beschriebenen Verhalten an Gelfiltrations-, Hydrophoben- sowie Ionentauschersäulen Rechnung trägt und auf den Lösungseigenschaften und der guten Trocknungs- bzw. Hitzestabilität aufbaut. Aufgrund der bisher durchgeführten Experimente kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, daß es sich bei den beobachteten Phänomenen einer PHB-Abbau-Aktivierung in *R. rubrum* um einen *in vitro*-Artefakt handelt, und die nPHA-Aktivierung, wie sie mit verschiedenen nativen PHA<sub>SCL</sub>-Granula beobachtet wurde, *in vivo* keine Relevanz besitzt oder auf anderen Mechanismen beruht. Zur Klärung dieser Frage ist jedoch eine Isolierung der charakterisierten Aktivatorkomponente erforderlich, um Aussagen über die Funktion in der Zelle treffen und weiterführende Experimente (z.B. zur *in vivo* Lokalisation mit Fluoreszenz- und Immunogoldtechniken) durchführen zu können. Weitere Aufschlüsse dürften in Kürze aus bereits initiierten Versuchen zur Gewinnung von Antikörpern für eine elektronenmikroskopische Lokalisation der nPHA<sub>SCL</sub>-Depolymerase in *R. rubrum* mittels Ultramikrotomie- und Immuno-Gold-Labeling-Techniken zu erwarten sein. Entscheidend für die Relevanz der Depolymeraseaktivität *in vivo* ist die Klärung der Frage, ob es sich tatsächlich um ein zytoplasmatisch lokalisiertes Protein handelt. Interessant wäre hinsichtlich der gefundenen, strikt auf die katalytische Domäne beschränkten Ähnlichkeiten von PhaZRr zu dPHA-Depolymerasen des Typs 2 auch die Konstruktion rekombinanter Chimärenproteine aus PhaZRr und der postulierten Linker- sowie dPHB-Substratbindedomäne von dPHA-Depolymerasen, z.B. aus *P. lemoignei*.

Wie am Beispiel von *R. eutropha* H16 bereits gezeigt (HANDRICK et al., 2000; SAEGUSA et al., 2001), könnten über die Konstruktion von Knock-out Mutanten der PHB-Depolymerase PhaZRr Aufschlüsse über das Vorhandensein von möglichen PHB-Depolymerase-Isoenzymen und über die physiologische Bedeutung eines intakten PHA-Metabolismus für den phototrophen Mikroorganismus gewonnen werden.

Bisher sind weder die Regulation des intrazellulären PHA-Abbaues noch die Bildung extrazellulärer Depolymerasen ausreichend erforscht. Die genaue Kenntnis der am PHA-Metabolismus beteiligten Enzyme und ihrer Interaktion könnten neben dem wichtigen Beitrag zum Gesamtverständnis



biologischer Systeme auch praktische Möglichkeiten einer besseren Steuerung von Stoffflüssen in der Zelle eröffnen.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

- ABE, H. und DOI, Y. 2002. Side-chain effect of second monomer units on crystalline morphology, thermal properties, and enzymatic degradability for random copolyesters of (*R*)-3-hydroxybutyric acid with (*R*)-3-hydroxyalkanoic acids. *Biomacromolecules*. **3**(1): 133-138.
- ABE, H., DOI, Y., AOKI, H. und AKEHATA, T. 1998. Solid-State Structures and Enzymatic Degradabilities for Melt-Crystallized Films of Copolymers of (*R*)-3-Hydroxybutyric Acid with Different Hydroxyalkanoic Acids. *Macromolecules*. **31**(6): 1791-1797.
- ABE, H., MATSUBARA, I. und DOI, Y. 1995. Physical properties and enzymatic degradability of polymer blends of bacterial poly[(*R*)-3-hydroxybutyrate] and poly[(*R,S*)-3-hydroxybutyrate] stereoisomers. *Macromolecules*. **28**: 844-853.
- ALTSCHUL, S. F. und KOONIN, E. V. 1998. Iterated profile searches with PSI-BLAST- a tool for discovery in protein databases. *Trends Biochem. Sci.* **23**(11): 444-447.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. und LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**(17): 3389-3402.
- ALVAREZ-MACARIE, E., AUGIER-MAGRO, V. und BARATTI, J. 1999. Characterization of a thermostable esterase activity from the moderate thermophile *Bacillus licheniformis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**(11): 1865-1870.
- AMOR, S. R., RAYMENT, T. und SANDERS, J. K. M. 1991. Poly(3-hydroxybutyrate) *in vivo*: NMR and X-ray characterization of the elastomeric state. *Macromolecules*. **24**: 4583-4588.
- ANEJA, P. und CHARLES, C. 1999. Poly-3-hydroxybutyrate degradation in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*: Isolation and characterization of a gene encoding 3-hydroxybutyrate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **181**(3): 849-857.
- ARMAND, S., TOMITA, H., HEYRAUD, A., GEY, C., WATANABE, T. und HENRISSAT, B. 1994. Stereochemical course of the hydrolysis reaction catalyzed by chitinases A1 and D from *Bacillus circulans* WL-12. *FEBS Lett.* **343**(2): 177-180.
- ARPIGNY, J. L. und JAEGER, K. E. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* **343 Pt 1**: 177-183.
- ARPIGNY, J. L., JENDROSSEK, D. und JAEGER, K. E. 1998. A novel heat-stable lipolytic enzyme from *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 displaying similarity to polyhydroxyalkanoate depolymerases. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**(1): 69-73.
- AUSUBEL, F. M. 1984. Regulation of nitrogen fixation genes. *Cell*. **37**(1):5-6.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. und STRUHL, K. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons Inc., New York.
- BACHMANN, B. M. 1997. Über die Stereoselektivität des enzymatischen Abbaus von Oligo-3-hydroxybuttersäure und über den Nachweis von (*R*)-3-Hydroxybuttersäure in Proteinen. Doktorarbeit, ETH Zürich, # 12074.
- BACHMANN, B. M. und SEEBACH, D. 1998. Synthesis and structure of linear and cyclic oligomers of 3-hydroxybutanoic acid with specific sequences of (*R*)- and (*S*)-configurations. *Helv. Chim. Acta.* **81**: 2430-2461.
- BACHMANN, B. M. und SEEBACH, D. 1999. Investigation of the cleavage of diastereomeric oligo(3-hydroxybutanoates) containing two to eight HB units. A model for stereoselectivity of PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T<sub>1</sub>. *Macromolecules*. **32**(6): 1777-1784.
- BANERJEE, A. K. und SCHLEGEL, H. G. 1966. Zur Rolle des Hefeextraktes während des chemolithotrophen Wachstums von *Micrococcus denitrificans*. *Journal Arch. Mikrobiol.* **53**: 132-153.
- BAPTIST, J. M. und WERBER, F. X. 1965. Plasticized poly-β-hydroxybutyric acid and progress. *US Pat. Appl.* **US 3**: 182,036.
- BARNARD, G. N. und SANDERS, J. K. M. 1989. The poly-β-hydroxybutyrate granule *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **264**: 3286-3291.
- BARTHA, R. 1962. Physiologische Untersuchungen über den chemolithotrophen Stoffwechsel neu isolierter *Hydrogenomonas*-Stämme. *Arch. Mikrobiol.* **41**: 313-350.
- BEHREND, A., KLINGBEIL, B. und JENDROSSEK, D. 1996. Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases bind to their substrate by a C-terminal located substrate binding site. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**(2-3): 191-194.
- BELLIZZI, J. J. 3RD, WIDOM, J., KEMP, C., LU, J. Y., DAS, A. K., HOFMANN, S. L. und CLARDY, J. 2000. The crystal structure of palmitoyl protein thioesterase 1 and the molecular basis of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**(9): 4573-8.
- BIBB, M. J., FINDLAY, P. R. und JOHNSON, M. W. 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene*. **30**(1-3):157-66.
- BIEHLER, M. J. 1989. A first practical use of specially constructed starter cultures in a new technological nitrate elimination process for drinking water with degradable biopolymers as adhesion material. In: BEHRENS, D. & DRIESEL, A. J. (eds.): DEHEMA Biotechnology Conferences, Vol. 3, Part B: 997-1002.
- BILLINGHAM, N. C., HENMAN, T. J. und HOLMES, P. A. 1987. Degradation and stabilisation of polyesters of biological and synthetic origin. In: GRASSIE, N. (ed.): Developments of polymer degradation 7: 81-121. London: Elsevier Applied Science.
- BLAKESLEY, R. W. 1993. Cycle sequencing. *Methods Mol. Biol.* **23**:209-17.
- BLUM, H., BEIER, H. und GROSS, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- BOATMAN, E. S. 1964. Observations on the fine structure of spheroplasts of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Cell Biol.* **20**: 297-311.
- BONNEN, A.M. und HAMMERSCHMIDT, R. 1989. Cutinolytic enzymes from *Colletotrichum lagenarium*. *Physical and Molecular Plant Pathology* 35:463-474.
- BONTHRONE, K. M., CLAUSS, J., HOROWITZ, D. M., HUNTER, B. K. und SANDERS, J. K. M. 1992. The biological and physical chemistry of polyhydroxyalkanoates as seen by NMR spectroscopy. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 269-278.

- BRAAZ, R., WONG, S. L. und JENDROSSEK D.** 2002. Production of PHA depolymerase A (PhaZ5) from *Paucimonas lemoignei* in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. **209(2)**: 237-41.
- BRADFORD, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- BRADLEY, D. E.** 1954. Simultaneous evaporation of platinum and carbon for possible use in high-resolution shadowcasting for the electron microscope. Nature **181**: 875-877.
- BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z. S., DODSON, E., DODSON, G., TOLLEY, S., TURKENBURG, J. P., CHRISTIANSEN, L., HUGE-JENSEN, B., NORSKOV, L., THIM, L. und MENGE, U.** 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triglycerol lipase. Nature **343**: 767-770.
- BRANDL, H. und PÜCHNER, P.** 1992. Biodegradation of plastic bottles made from "Biopol" in an aquatic ecosystem under *in situ* conditions. Biodegradation **2**: 237-243.
- BRANDL, H., AEBERLI, B., BACHOFEN, R., SCHWEGLER, I., MÜLLER, H.-M., BÜRGER, M. H. HOFMANN, T., LANGWEILER, U. D. und SEEBACH, D.** 1995. Biodegradation of cyclic and substituted linear oligomers of poly(3-hydroxybutyrate). Can. J. Microbiol. (Suppl. 1) **41**: 180-186.
- BRANDL, H., GROSS, R. A., LENZ, R. W. und FULLER, R. C.** 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. Appl. Environ. Microbiol. **54**: 1977-1982.
- BRAUNEGG, G. und KORNETI, L.** 1984. *Pseudomonas 2 F*: Kinetics of growth and accumulation of poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (Poly-HB). Biotechnol. Lett. **6**: 825-829.
- BRAUNEGG, G., SONNLEITNER, B. und LAFFERTY, R. M.** 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **6**: 29-37.
- BRIESE, B. H.** 1997. Charakterisierung der Poly(3-hydroxybutyrat) – Depolymerase A aus *Pseudomonas lemoignei*. Dissertation, Universität Göttingen.
- BRIESE, B. H., JENDROSSEK, D. J. und SCHLEGEL, H. G.** 1994a. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by aerobic sewage sludge. FEMS Microbiol. Lett. **130**: 107-112.
- BRIESE, B. H., JENDROSSEK, D. und SCHLEGEL, H. G.** 1994. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by aerobic sewage sludge. FEMS Microbiol Lett. **117(1)**: 107-11.
- BRIESE, B. H., SCHMIDT, B. und JENDROSSEK, D. J.** 1994b. *Pseudomonas lemoignei* has five poly(hydroxyalkanoic acid) (PHA) depolymerase genes: A comparative study of bacterial and eukaryotic PHA-depolymerases. J. Environ. Polm. Deg. **2**: 75-87.
- BRIESE, B.-H. und JENDROSSEK, D.** 1998. Biological basis of enzyme-catalyzed polyester degradation : 59 C- terminal amino acids of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase A from *Pseudomonas lemoignei* are sufficient for PHB binding, Macromol. **130**: 205-216.
- BROCK, T. D. und MADIGAN, M., T.** 1994. Biology of microorganisms. 7. ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- BROSIUS, J., PALMER, M. L., KENNEDY, P. J. und NOLLER, H. F.** 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **75(10)**:4801-
- BROWN, A. J. und KOLATTUKUDY, P. E.** 1978. Arch. Biochem. Biophys. **190**: 17
- BRUCATO, C. L. und WONG, S. S.** 1991. Extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium funiculosum*: general characteristics and active site studies. Arch. Biochem. Biophys. **290(2)**: 497-502.
- BRUMLIK M. J., VAN DER GOOT F. G., WONG K. R., BUCKLEY J. T.** 1997. The disulfide bond in the *Aeromonas hydrophila* lipase/acyltransferase stabilizes the structure but is not required for secretion or activity. J. Bacteriol. **179(10)**:3116-21.
- BRURBERG, M. B., NES, I. F. und EIJSINK, V. G.** 1996. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. Microbiology. **142 ( Pt 7)**:1581-1589.
- BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, U., DEREWENDA, Z. S., DODSON, G. G., LAWSON, D. M., TURKENBURG, J. P., BJORKLING, F., HUGE-JENSEN, B., PATKAR, S. A. und THIM, L.** 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. Nature. **351(6326)**: 491-494.
- BRZOZOWSKI, A. M., SAVAGE, H., VERMA, C. S., TURKENBURG, J. P., LAWSON, D. M., SVENDSEN, A. und PATKAR, S.** 2000. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. Biochemistry. **39(49)**: 15071-82.
- BUJARD, H.** 1980. The interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with promoters. TIBS. **5**: 274-278.
- BUJNICKI, J. M., ELOFSSON, A., FISCHER, D. und RYCHLEWSKI, L.** 2001. Structure prediction meta server. Bioinformatics. **17(8)**: 750-751.
- BUJNICKI, J. M., ELOFSSON, A., FISCHER, D., RYCHLEWSKI, L.** 2001. "Structure prediction meta server". Bioinformatics. **17(8)**:750-751.
- BULLOCK, W. O., J. M. FERNANDEZ und J. M. STUART.** 1987. XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. BioTechniques **5**: 376-379
- BYROM, D.** 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. Trends Biotechnol. **5**: 246-250.
- BYROM, D.** 1990. Industrial productions of copolymer from *Alcaligenes eutrophus*. In: DAWES, E. A. (ed.): Novel biodegradable microbial polymers: 113-117. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
- CAO, A., ARAI, Y., YOSHIE, N., KASUYA, K., DOI, Y., und INOUE, Y.** 1999. Solid structure and biodegradation of the compositionally fractionated poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypropionic acid)s. Polymer **40**: 6821-6830.

- CAO, A., KASUYA, K., ABE, H., DOI, Y. und INOUE, Y. 1998. Studies on comonomer compositional distribution of the bacterial poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxypropionic acid)s and crystal and thermal characteristics of their fractionated component copolyesters. *Polymer* **39**: 4801-4816.
- CAO, J. G. und MEIGHEN, E. A. 1993. Biosynthesis and stereochemistry of the autoinducer controlling luminescence in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **175**: 3856-3862.
- CHEN, Y. M. und LIN, E. C. 1991. Regulation of the *adhE* gene, which encodes ethanol dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**: 8009-8013.
- CHESTER, N. und MARSHAK, D. R. 1993. Dimethyl sulfoxide-mediated primer  $T_m$  reduction: A method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **209**: 284-290.
- CHEVET, E., LEMAITRE, G. und KATINKA, M. D. 1995. Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR. *Nucleic Acids Res.* **23(16)**: 3343-4.
- CHO, A. R., YOO, S. K. und KIM, E. J. 2000. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **186(2)**: 235-238.
- CHO, K., ZUSMAN, D. R. 1999. AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **34(2)**: 268-281.
- CHOI, M. H., YOON, S. C., LENZ, R. W. 1999. Production of poly(3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly(4-hydroxybutyric acid) without subsequent degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65(4)**: 1570-1577.
- CHOWDHURY, A. A. 1963. Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure abbauende Bakterien und Exoenzym. *Arch. Mikrobiol.* **47**: 167-200.
- CLEMENTE, T., SHAH, D., TRAN, M., STARK, D., PADGETTE, S., DENNIS, D., BRUCKENER, K., STEINBÜCHEL, A. und MITSKY, T. 2000. Sequence of PHA synthase gene from two strains of *Rhodospirillum rubrum* and *in vivo* substrate specificity of four PHA synthases across two heterologous expression systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53(4)**: 420-429.
- CLINE, J., BRAMAN, J. C. und HOGREFE, H. H. 1996. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24(18)**: 3546-3551.
- COLLINS, M. L. P. und SALTON, M. R. J. 1979. Solubility characteristics of *Micrococcus lysodeikticus* membrane components in detergents and chaotropic salts analyzed by immunoelectrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **553**: 40-53.
- CORDLE, R. A. und LOWE, M. E. 1998. The hydrophobic surface of colipase influences lipase activity at an oil-water interface. *J. Lipid Res.* **39(9)**: 1759-1767.
- CORNIBERT, J. und MARCHESSAULT, R. H. 1975. Conformational isomorphism. A general 2(1) helical conformation for poly( $\beta$ -alkanoates). *Macromolecules.* **8**: 296-305.
- CORNIBERT, J. und MARCHESSAULT, R. H. 1972. Physical properties of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. IV. Conformational analysis and crystalline structure. *J. Mol. Biol.* **71(3)**: 735-756.
- CURRY, K. A. und TOMICH, C. S. 1988. Effect of ribosome binding site on gene expression in *Escherichia coli*. *DNA.* **7(3)**: 173-179.
- CYGLER, M. und SCHRAG, J. D. 1997. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. *Methods Enzymol.* **199**: 284-3-27.
- DARTOIS, V., BAULARD, A., SCHANCK, K. und COLSON, C. 1992. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochim. Biophys. Acta.* **1131(3)**: 253-260.
- DAS, S., LENGWEILER, U. D., SEEBACH, D. und REUSCH, R. N. 1997. Proof for a nonproteinaceous calcium-selective channel in *Escherichia coli* by total synthesis from (R)-3-hydroxybutanoic acid and inorganic polyphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94(17)**: 9075-9079.
- DAS, S., SEEBACH, D. und REUSCH, R. N. 2002. Differential effects of temperature on *E. coli* and synthetic polyhydroxybutyrate/polyphosphate channels. *Biochemistry.* **41(16)**: 5307-12.
- DAS, S., und REUSCH, R. N. 2001. pH regulates cation selectivity of poly-(R)-3-hydroxybutyrate/polyphosphate channels from *E. coli* in planar lipid bilayers. *Biochemistry.* **40(7)**: 2075-2079.
- DAVIS, D. H., STANIER, R. Y., DOUDOROFF, M. und MANDEL, M., 1970. Taxonomic studies on some gram-negative polarly flagellated "hydrogen bacteria" and related species. *Arch. Mikrobiol.* **70**: 1-13.
- DAVIS, J. B. 1964. Cellular lipids of a *Nocardia* grown on propane and n-butane. *Appl. Microbiol.* **12**: 301-304.
- DAWES, E. A. 1976. Endogenous metabolism and the survival of starved prokaryotes. In: GRAY, T. G. R. & POSTGATE, J. R. (eds.): *The survival of vegetative microbes*: 19-53. Cambridge University Press: Cambridge
- DAWES, E. A. 1985. Starvation, survival and energy reserves. In: FLETCHER, M. & FLOODGATE, G. D. (eds.): *Bacteria in their natural environments*: 43-79. London: Academic Press.
- DAWES, E. A. 1989. Growth and survival of bacteria. In: POINDEXTER, J. S. & LEADBETTER, E. R. (eds.): *Bacteria in nature*, Vol. **3**: 67-187. New York: Plenum Publishing Corp.
- DAWES, E. A. und RIBBONS, D. W. 1964. Some aspects of the endogenous metabolism of bacteria. *Bacteriol. Rev.* **28**: 126-149.
- DAWES, E. A. und SENIOR, P. J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **10**: 136-267.
- DE KONING, G. J. M. und LEMSTRA, P. J. 1992. The amorphous state of bacterial poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] *in vivo*. *Polymer.* **33**: 3304-3306.

- DE KONING, G. J. M., van BILSEN, H. M. M., LEMSTRA, P. J., HAZENBERG, W., WITHOLD, B., PREUSTING, H., VAN DER GALIEN, J. G., SCHIRMER, A. und JENDROSSEK, D. 1994. A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoate) from *Pseudomonas oleovorans*. *Polymer* **35**: 2090-2097.
- De PHILIPPIS, R., ENA, A., GUASTINI, M., SILI, C. und VINZENZINI, M. 1992. Factors affecting poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria and in non-sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*
- DE SMET, M. J., EGGINK, G., WITHOLD, B., KINGMA, J. und WYNBERG, H. 1983. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *J. Bacteriol.* **154**: 870-878.
- DEISING, H., NICHOLSON, R.L., HAUG, M., HOWARD, R.J. und MENDEN, K. 1992. Adhesion pad formation and the involvement of cutinase and esterases in the attachment of uredospores to the host cuticle. *The Plant Cell* **4**: 1101-1111.
- DELAFIELD, F. P., COOKSEY, K. E. und DOUDOROFF, M. 1965a.  $\beta$ -hydroxybutyric dehydrogenase and dimer hydrolase of *Pseudomonas lemoignei*. *J. Biol. Chem.* **240**: 4023-4028.
- DELAFIELD, F. P., DOUDOROFF, M. und PALLERONI, N. J. 1965b. Decomposition of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by pseudomonads. *J. Bacteriol.* **90**: 1455-1466.
- DELCHER, A. L., HARMON, D., KASIF, S., WHITE, O. und SALZBERG SL. 1999. Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res.* **27(23)**:4636-4641.
- DELVECCHIO, V. G., KAPATRAL, et al. 2002. The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99(1)**: 443-448.
- DEVERIEUX, J., HAEBERLI, P. und SMITHIES, O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids. Res.* **12**: 387-395.
- DOI, Y., KANESAWA, Y. und KUNIOKA, M. 1990b. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Macromolecules* **23**: 26-31.
- DOI, Y., KANESAWA, Y., TANAHASHI, N. und KUMAGAI, Y. 1992a. Biodegradation of microbial polyesters in the marine environment. *Polymer Degradation and Stability* **36**: 173-177.
- DOI, Y., KAWAGUCHI, Y., KOYAMA, N., NAKAMURA, S., HIRAMITSU, M., YOSHIDA, Y. und KIMURA, H. 1992b. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 103-108.
- DOI, Y., KUMAGAI, Y., TANAHASHI, N. und MUKAI, K. 1992. Structural effects on biodegradation of microbial and synthetic poly(hydroxyalkanoates). In: VERT, M. (ed.) *Biodegradable Polymers and Plastics*: 139-148. Royal Society of Chemistry: London.
- DOI, Y., MUKAI, K., KASUYA, K. und Yamada, K. 1994. Biodegradation of biosynthetic chemosynthetic poly-hydroxyalkanoates. In DOI, Y. & FUKUDA, K., (eds): *Biodegradable Polymers and Plastics* BV: 39-51, Elsevier Science: Amsterdam.
- DOI, Y., SEGAWA, A., KAWAGUCHI, Y. und KUNIOKA, M. 1990a. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 165-170.
- DOI, Y., TAMAKAI, A., KUNIOKA, M. und SOGA, K. 1987. Biosynthesis of terpolyesters of 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 5-hydroxyvalerate in *Alcaligenes eutrophus* from 5-chloropentanoic and pentanoic acids. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **8**: 631-635.
- DOI, Y., TAMAKAI, A., KUNIOKA, M. und SOGA, K. 1988. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate in *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 330-334.
- DOI, Y., KAWAGUCHI, Y., NAKAMURA, Y. und KUNIOKA, M. 1989. Nuclear magnetic resonance studies of poly(3-hydroxybutyrate) and polyphosphate metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2932-2938.
- DUGAICZYK, A., BOYER, H. W. und GOODMAN, H. M. 1975. Ligation of *EcoRI* endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* **6(1)**:171-84.
- DUNLOP, W. F. und ROBARDS, A. W. 1973. Ultrastructural study of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **114**: 1271-1280.
- DUS, K., SLETTEN, K. und KAMEN, M. D. 1968. Cytochrome c2 of *Rhodospirillum rubrum*. II. Complete amino acid sequence and phylogenetic relationships. *J. Biol. Chem.* **243(20)**:5507-5518.
- EGGERT, T., PENCREAC, H. G., DOUCHET, I., VERGER, R., JAEGER K. E. 2000. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur. J. Biochem.* **267(21)**:6459-69.
- EGGERT, T., VAN POUDEROYEN, G., DIJKSTRA, B. W. und JAEGER, K. E. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure. *FEBS Lett.* 2001 Aug 3; **502(3)**:89-92.
- EGGINK, G., DE WAARD, P. und HUIJBERTS, G. N. M. 1992. The role of fatty acid biosynthesis and degradation in the supply of substrates for poly(3-hydroxyalkanoate) formation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 159-164.
- EGGINK, G. 1996. Vortrag im Rahmen des International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates (ISBP), Davos, Schweiz.
- ELLAR, D., LUNDGREN, D. G., OKAMURA, K. und MARCHESSAULT, R. H. 1968. Morphology of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules. *J. Mol. Biol.* **35**: 489-502.
- EMERUWA, A. C. und HOWRIKO, R. Z. 1973. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism during growth and sporulation of *Clostridium botulinum*. *J. Bacteriol.* **116**: 989-993.
- ERLANSON-ALBERTSSON C. 1992. Enterostatin: the pancreatic procolipase activation peptide - a signal for regulation of fat intake. *Nutr. Rev.* **50(10)**: 307-310.
- ESMARCH, E. 1887. Über die Reinkultur eines Spirillum. *Zbl. Bakteriol. I.* **1**: 225-230

- EWERING, C., LUTKE-EVERSLOH, T., LUFTMANN, H. und STEINBÜCHEL, A. 2002. Identification of novel sulfur-containing bacterial polyesters: biosynthesis of poly(3-hydroxy-*S*-propyl-omega-thioalkanoates) containing thioether linkages in the side chains. *Microbiology*. **148**(Pt 5):1397-1406.
- FALK, G. und WALKER, J. E. 1988. DNA sequence of a gene cluster coding for subunits of the F<sub>0</sub> membrane sector of ATP synthase in *Rhodospirillum rubrum*. Support for modular evolution of the F<sub>1</sub> and F<sub>0</sub> sectors. *Biochem. J.* **254**(1): 109-122.
- FARISELLI, P. und CASADIO, R. 2000. Prediction of the number of residue contacts in proteins. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **8**:146-51.
- FELSENSTEIN, J. 1997. An alternating least squares approach to inferring phylogenies from pairwise distances. *Syst. Biol.* **46**(1):101-111.
- FERNANDEZ-PATRON, C., CALERO, M., RODRIGUEZ-COLLAZO, P., GRACIA, J. R., MADRAZO, J., MUSACCHIO, A., SORIANO, F., ESTRADA, R., FRANK, R., CASTELLANOS-SERRA, L. und MENDEZ, E. 1995. Protein reverse staining: High-efficiency microanalysis of unmodified proteins detected on electrophoresis gels. *Anal. Biochem.* **224**: 203-211.
- FICKETT, J. W. 1982. Recognition of protein coding regions in DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **10**(17): 5303-18.
- FIDLER, S. und DOUGLAS, D. 1992. Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 231-236.
- FIEDLER, S., STEINBÜCHEL, A. und REHM, B. H. 2000. PhaG-mediated synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of medium-chain-length constituents from nonrelated carbon sources in recombinant *Pseudomonas fragi*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(5): 2117-2124.
- FISCHER, D. 1999. Modeling three-dimensional protein structures for amino acid sequences of the CASP3 experiment using sequence-derived predictions. *Proteins*. **37**(S3): 61-65.
- FISCHER, S., CRABTREE, J., BRUNK, B., GIBSON, M. und OVERTON, G. C. 1999. bioWidgets: data interaction components for genomics. *Bioinformatics*. **15**(10): 837-46.
- FOCARETE, M. L., CECCORULLI, G., SCANDOLA, M. und KOWALCZUK, M. 1998. Further evidence of crystallinity-induced biodegradation of synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate) by PHB-depolymerase A from *Pseudomonas lemoignei*. Blends of atactic poly(3-hydroxybutyrate) with crystalline polyesters. *Macromolecules*. **31**(24): 8485-8492.
- FOCARETE, M. L., SCANDOLA, M., JENDROSSEK, D., ADAMUS, G., SIKORSKA, W. und KOWALCZUK, M. 1999. Bioassimilation of atactic poly[(*R,S*)-3-hydroxybutyrate] oligomers by selected bacterial strains. *Macromolecules*. **32**(15): 4814-4818.
- FÖLLNER, C. G., BABEL, W. und STEINBÜCHEL, A. 1995. Isolation and purification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthesis from methylotrophic bacteria relying on the serine pathway. *Can. J. Microbiol.* **41**: 124-130.
- FÖLLNER, C. G., MADKOUR, M., MAYER, F., BABEL, W. und STEINBÜCHEL, A. 1997. Analysis of the PHA granule-associated proteins GA20 and GA11 in *Methylobacterium extorquens* and *Methylobacterium rhodesianum*. *J. Basic. Microbiol.* **37**(1): 11-21.
- FOSTER, J., LENZ, R. und FULLER, R. 1999. Intracellular depolymerase activity in isolated inclusion bodies containing polyhydroxyalkanoates with long alkyl and functional substituents in the side chain. *Int. J. Biol. Macromol.*: 187-192.
- FOSTER, L. J. R., LENZ, R. W. und FULLER, R. C. 1994. Quantitative determination of intracellular depolymerase activity in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing poly-3-hydroxyalkanoates with long alkyl substituents. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 279-282.
- FOSTER, L.J., STUART, E.S., TEHRANI, A., LENZ, R.W. und FULLER, R.C. 1996. Intracellular depolymerase and polyhydroxyoctanoate granule integrity in *Pseudomonas oleovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* **19** (3): 177-183
- FRASER, H. M., SANDOW, J., SEIDEL, H. R. und LUNN, S. F. 1989. Controlled release of a GnRH antagonist from a polyhydroxybutyric acid implant: reversible suppression of the menstrual cycle in the macaque. *Acta. Endocrinol.* **121**: 841-848.
- FRENKEN, L. G., DE GROOT, A., TOMMASSEN, J. und VERRIPS, C. T. 1993. Role of the *lipB* gene product in the folding of the secreted lipase of *Pseudomonas glumae*. *Mol. Microbiol.* **9**(3): 591-599.
- FRISHMAN, D. und ARGOS, P. 1997. Seventy-five percent accuracy in protein secondary structure prediction. *Proteins*. **27**(3): 329-335.
- FRITZSCHE, K., LENZ, R. W. und FULLER, R. C. 1990a. Production of unsaturated polyesters by *Pseudomonas oleovorans*. *Int. J. Biol. Macromol.* **12**: 85-91.
- FRITZSCHE, K., LENZ, R. W. und FULLER, R. C. 1990b. Bacterial polyesters containing branched poly(β-hydroxyalkanoate) units. *Int. J. Biol. Macromol.* **12**: 92-101.
- FRITZSCHE, K., LENZ, R. W. und FULLER, R. C. 1990c. An unusual bacterial polyester with a phenyl pedant group. *Macromol. Chem.* **191**: 1957-1965.
- FUKUI, T., ITO, M. und TOMITA, K. 1982. Purification and characterization of acetoacetyl-CoA synthetase from *Zoogloea ramigera* I-16-M. *Eur. J. Biochem.* **127**: 423-428.
- FUKUI, T., NARIKAWA, T., MIWA, K. und SHIRAKURA, Y. 1988. Effects of limited tryptic modification of a bacterial poly(β-hydroxybutyrate) depolymerase on its catalytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* **952**: 164-171.
- FUKUI, T., YOSHIMOTO, A., MATSUMOTO, M., HOSOKAWA, S., SAITO, T., NISHIKAWA, H. und TOMITA, K. 1976. Enzymatic synthesis of poly-β-hydroxybutyrate in *Zoogloea ramigera*. *Arch. Microbiol.* **110**: 149-156.
- FULLER, R. C., O'DONNELL, J. P., SAULNIER, J., REDLINGER, T. E., FOSTER, J. und LENZ, R. W. 1992. The supramolecular architecture of the polyhydroxyalkanoate inclusions in *Pseudomonas oleovorans*. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 279-288.
- FUQUA, C. und GREENBERG, E. P. 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**(2): 183-189.

- FUQUA, C., WINANS, S. C. und GREENBERG, E. P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 727-751.
- GALIBERT, F., FINAN, T. M., et al. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*. **293(5530)**: 668-672.
- GAO, D., MAEHARA, A., YAMANE, T. und UEDA, S. 2001. Identification of the intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase gene of *Paracoccus denitrificans* and some properties of the gene product. *FEMS Microbiol. Lett.* **196(2)**: 159-164.
- GARCIA, B., OLIVERA, E. R., MINAMBRES, B., FERNANDEZ-VALVERDE, M., CANEDO, L. M., PRIETO, M. A., GARCIA, J. L., MARTINEZ, M. und LUENGO, J. M. 1999. Novel biodegradable aromatic plastics from a bacterial source. Genetic and biochemical studies on a route of the phenylacetyl-coA catabolon. *J. Biol. Chem.* **274(41)**: 29228-29241.
- GAZZANO, M., FOCARETE, M. L., RIEKEL, C. und SCANDOLA, M. 2000. Bacterial poly(3-hydroxybutyrate): an optical microscopy and microfocus X-ray diffraction study. *Biomacromolecules*. **1(4)**: 604-608.
- GERNGROSS, T. U., REILLY, P., STUBBE, J., SINSKEY, A. J. und PEOPLES, O. P. 1993. Immunocytochemical analysis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: Localization of the synthase enzyme at the surface of PHB granules. *J. Bacteriol.* **175**: 5289-5293.
- GERNGROSS, T. U., SNELL, K. D., PEOPLES, O. P., SINSKEY, A. J., CSUHAI, E., MASAMUNE, S. und STUBBE, J. 1994. Overexpression and purification of the soluble polyhydroxyalkanoate synthase from *Alcaligenes eutrophus*: evidence for requires posttranslational modification for catalytic activity. *Biochem.* **33**: 9311-9320.
- GHOSH, D., ERMAN, M., SAWICKI, M., LALA, P., WEEKS, D. R., LI, N., PANGBORN, W., THIEL, D. J., JORNVALL, H., GUTIERREZ, R. und EYZAGUIRRE, J. 1999. Determination of a protein structure by iodination: the structure of iodinated acetylxyylan esterase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55 (Pt 4)**: 779-84.
- GIFFHORN, F., BEUSCHER, N., GOTTSCHALK, G. 1972. Regulation of citrate lyase activity in *Rhodospseudomonas gelatinosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **49(2)**: 467-472.
- GILBERT, E. J. 1993. *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning. *Enzyme Microb. Technol.* **15(8)**: 634-645.
- GOLD, L., PRIBNOW, D., SCHNEIDER, T., SHINEDLING, S., SINGER, B. S. und STORMO, G. 1981. Translational initiation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **35**: 365-403.
- GOTTSCHALK, G. 1964b. Die Biosynthese der Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure durch Knallgasbakterien. II. Verwertung organischer Säuren. *Arch. Mikrobiol.* **47**: 230-235.
- GOTTSCHALK, G. 1964c. Die Biosynthese der Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure durch Knallgasbakterien. III. Synthese aus Kohlendioxid. *Arch. Mikrobiol.* **47**: 236-250.
- GRANTHAM, R., GAUTIER, C. und GOUY, M. 1980. Codon frequencies in 119 individual genes confirm consistent choices of degenerate bases according to genome type. *Nucleic Acids Res.* **8(9)**: 1893-912.
- GRIBSKOV, M., DEVEREUX, J. und BURGESS, R. R. 1984. The codon preference plot: graphic analysis of protein coding sequences and prediction of gene expression. *Nucleic Acids Res.* **12(1 Pt 2)**: 539-49.
- GRIEBEL, R. und MERRICK, J. M. 1971. Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules. *J. Bacteriol.* **108**: 782-789.
- GRIEBEL, R., SMITH, Z. und MERRICK, J. M. 1968. Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* **7**: 3676-3681.
- GROCHULSKI, P., BOUTHILLIER, F., KAZLAUSKAS, R. J., SERREQUI, A. N., SCHRAG, J. D., ZIOMEK, E. und CYGLER, M. 1994. Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry*. **33(12)**: 3494-3500.
- GROSS, R. A., BRANDL, H., DE MELLO, C. und FULLER, C. 1989. Biosynthesis and characterization of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules* **22**: 1106-1115.
- GRUBER, K., GUGGANIG, M., WAGNER, U. G. und KRATKY, C. 1999. Atomic resolution crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Biol. Chem.* **380(7-8)**: 993-1000.
- GRUNSTEIN, M. und WALLIS, J. 1979. Colony hybridization. *Methods Enzymol.* **68**: 379-389.
- GRZESZIK, C. 1996. Molekularbiologische Untersuchungen an der löslichen Hydrogenase von *Rhodococcus opacus*. Dissertation, Universität Göttingen.
- HALLING, S.M., SANCHEZ-ANZALDO, F.-J., FUKUDA, R., DOI, R. H. und MEARES, C. F. 1977. Zinc is associated with beta subunit of DNA dependent RNA polymerase of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **16**: 2880-2884.
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166(4)**: 557-80.
- HANDRICK, R. und JENDROSSEK, D. 1998. Extracellular und intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerases: homologies and differences. In: STEINBÜCHEL, A. (ed.), *Biochemical Principles and Mechanisms of Biodegradation and Biodegradation of Polymers*: 57-67. Wiley-VCH: Weinheim
- HANDRICK, R., REINHARDT, S. und JENDROSSEK, D. 2000. Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* **182**: 5916-18.
- HANDRICK, R., REINHARDT, S., FOCARETE, M. L., SCANDOLA, M., ADAMUS, G., KOWALCZUK, M. und JENDROSSEK, D. 2001. A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short chain-length hydroxyalkanoic acids. *J. Biol. Chem.* **276(39)**: 36215-36224.
- HANLEY, S. Z., PAPPIN, D. J., RAHMAN, D., WHITE, A. J., ELBOROUGH, K. M. und SLABAS, A. R. 1999. Re-evaluation of the primary structure of *Ralstonia eutropha* phasin and implications for polyhydroxyalkanoic acid granule binding. *FEBS Lett.* **447(1)**: 99-105.

- HARTLEY, P. 1987. Abbaubare Polymere aus dem Fermenter. *BioEngineering* **3**: 66-68.
- HAWLEY, D. K., McCLURE, W. R. 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11(8)**:2237-2255.
- HAYWARD, A. C., FORSYTH, W. G. C. und ROBERTS, J. B. 1959. Synthesis and breakdown of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **20**: 510-518.
- HAYWOOD, G. W., ANDERSON, A. J. und DAWES, E. A. 1989. The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **57**: 1-6.
- HAYWOOD, G. W., ANDERSON, A. J., CHU, L. und DAWES, E. A. 1988a. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 91-96.
- HAYWOOD, G. W., ANDERSON, A. J., CHU, L. und DAWES, E. A. 1988b. The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 259-264.
- HAYWOOD, G. W., ANDERSON, A. J., EWING, D. F. und DAWES, E. A. 1990. Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 40135. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3354-3359.
- HAYWOOD, G. W., ANDERSON, A. J., WILLIAMS, D. R. und DAWES, E. A. 1991. Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. *Int. J. Biol. Macromol.* **13**: 83-88.
- HE, Y., SHUAI, X., KASUYA, K., DOI, Y. und INOUE, Y. 2001. Enzymatic degradation of atactic poly(*R,S*-3-hydroxybutyrate) induced by amorphous polymers and the enzymatic degradation temperature window of an amorphous polymer system. *Biomacromolecules.* **2(3)**: 1045-1051.
- HEIN, S., PALETTA, J. R. und STEINBÜCHEL, A. 2002. Cloning, characterization and comparison of the *Pseudomonas mendocina* polyhydroxyalkanoate synthases Pha1 and PhaC2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58(2)**: 229-236.
- HEIN, S., SOHLING, B., GOTTSCHALK, G., STEINBÜCHEL, A. 1997. Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **153 (2)**: 411-418.
- HEINRICHS, J. H., BAYER, M. G. und CHEUNG, A. L. 1996. Characterization of the sar locus and its interaction with agar in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178(2)**: 418-423.
- HERMOSO, J., PIGNOL, D., KERFELEC, B., CRENON, I., CHAPUS, C. und FONTECILLA-CAMPS, J. C. 1996. Lipase activation by nonionic detergents. The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol mono-octyl ether complex. *J. Biol. Chem.* **271(30)**: 18007-18016.
- HIPPE, H. 1967. Abbau und Wiederverwertung von Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure durch *Hydrogenomonas* H16. *Arch. Mikrobiol.* **56**: 248-277.
- HIPPE, H. und SCHLEGEL, H. G. 1967. Hydrolyse von PHBS durch intrazelluläre Depolymerase von *Hydrogenomonas* H16. *Arch. Mikrobiol.* **56**: 278-299.
- HIRAIISHI, T., OHURA, T., ITO, S., KASUYA, K. und DOI, Y. 2000. Function of the catalytic domain of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Pseudomonas stutzeri*. *Biomacromolecules.* **1**: 320-324.
- HOCKING, J. P., TIMMINS, M. R., SCHERER, T. M., FULLER, R. C., LENZ, R. W. und MARCHESSAULT, R. H. 1995. Enzymatic degradability of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) as a function of tacticity. *J.M.S.-Pure Appl. Chem.* **A32(4)**: 889-894.
- HOFMANN, B., TOLZER, S., PELLETIER, I., ALTENBUCHNER, J., VAN PEE, K. H. und HECHT, H. J. 1998. Structural investigation of the cofactor-free chloroperoxidases. *J. Mol. Biol.* **279(4)**: 889-900.
- HOLMES, P. A. 1985. Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.* **16**: 32-36.
- HOLMES, P. A., WRIGHT, L. F. und COLLINS, S. H. 1982.  $\beta$ -hydroxybutyrate polymers. *Eur. Pat. Appl. EP 052.459*.
- HOROWITZ, D. M. und SANDERS, J. K. M. 1994. Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate: preparation, characterization, and biological implications. *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 2695-2702.
- HOROWITZ, D. M. und SANDERS, J. K. M. 1995. Biomimetic, amorphous granules of polyhydroxyalkanoates: composition, mobility, and stabilization *in vitro* by proteins. *Can. J. Microbiol.* **41(Suppl. 1)**: 115-123.
- HRABAK, O. 1992. Industrial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 251-256.
- HUANG, R. und REUSCH, R. 1995. Genetic competence in *Escherichia coli* requires poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate membrane complexes and certain divalent cations. *J. Bacteriol.* **177**: 486-490.
- HUISMAN, G. W., DE LEEUW, O., EGGINK, G. und WITHOLT, B. 1989. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1949-1954.
- HUISMAN, G. W., WONINK, E., MEIMA, R., KAZEMIER, B., TERPSTRA, P. und WITHOLT, B. 1991. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*: identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.* **266**: 2191-2198.
- HUSTEDE, E. und STEINBÜCHEL, A. 1993. Characterization of the polyhydroxyalkanoate synthase gene locus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 709-714.
- HUSTEDE, E., STEINBÜCHEL, A. und SCHLEGEL, H. G. 1992. Cloning of poly(3-hydroxybutyric acid) synthase genes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum* and heterologous expression in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**: 285-290.



- IHARA, F., OKAMOTO, I., AKAO, K., NIHIRA, T. und YAMADA, Y. 1995. Lipase modulator protein (LimL) of *Pseudomonas* sp. strain 109. J. Bacteriol. **177**(5): 1254-1258.
- IMHOFF, J. F., TRÜPER, H. G. und PFENNIG, N. 1984. Rearrangements of the species and genera of the phototrophic purple nonsulfur bacteria. Journal Int. J. Syst. Bacteriol. **34**: 340-343.
- INOUE, H., NOJIMA, H. und OKAYAMA H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene. **96**(1): 23-28.
- ISHIZUKA, H., HORINOUCI, S., KIESER, H. M., HOPWOOD, D. A. und BEPPU, T. 1992. A putative two-component regulatory system involved in secondary metabolism in *Streptomyces* spp. J. Bacteriol. **174**(23): 7585-94.
- ITOH, S., MIZUKAMI, T., MATSUMOTO, T., NISHI, T., SAITO, A., OKA, T., FURUYA, A., TAKAOKA, C. und TANIGUCHI, T. 1984. Efficient expression in *Escherichia coli* of a mature and an modified human interferon- $\beta_1$ . DNA. **3**: 157-165.
- IYER, S., JOSHI, A. und DESAI, A. 1997. Rapid detection of fungal poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase using a new *in situ* gel activity staining technique. Biotechnol. Tech. **11**: 905-907.
- IYER, S., SHAH, R., SHARMA, A., JENDROSSEK, D. und DESAI, A. 2001. Purification of a *A. fumigatus* (Pdf) PHB depolymerase using a new, single step substrate affinity chromatography method: Characterization of the PHB depolymerase exhibiting novel self-aggregation behavior. J. Environ. Polym. Degrad. Zit. in: JENDROSSEK 2001c.
- JAEGER, J. A., TURNER, D. H. und ZUKER, M. 1989. Improved predictions of secondary structures for RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **86**(20): 7706-7710.
- JAEGER, K. E. und WOHLFAHRTH, S. 1993. Bakterielle Lipasen: Biochemie, Molekulargenetik und biotechnologische Bedeutung. BioEngineering **9**: 39-46.
- JAEGER, K. E., DIJKSTRA, B. W. und REETZ, M. T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. Annu. Rev. Microbiol. **53**: 315-51.
- JAEGER, K. E., RANSAC, S., DIJKSTRA, B. W., COLSON, C., VAN HEUVEL, M. und MISSET, O. 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbiol. Rev. **15**(1): 29-63.
- JAEGER, K. E., RANSAC, S., KOCH, H. B., FERRATO, F. und DIJKSTRA, B. W. 1993. Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Lett. **332**(1-2): 143-149.
- JAEGER, K. E., STEINBÜCHEL, A. und JENDROSSEK, D. 1995. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyze poly(omega-hydroxyalkanoates). Appl. Environ. Microbiol. **61**(8): 3113-3118.
- JAHNS, T. und KALTWASSER, H. 1989. Energy-dependent uptake of urea by *Bacillus megaterium*. FEMS Microbiol. Lett. **48**(1): 13-17.
- JAN, S., ROBLLOT, C., GOETHALS, G., COURTOIS, J., COURTOIS, B., SAUCEDO, J. E., SEGUIN, J. P. und BARBOTIN, J. N. 1995. Study of parameters affecting poly(3-hydroxybutyrate) quantification by gas chromatography. Anal. Biochem. **225** (2): 258-263.
- JEDLINSKI, Z., ADAMUS, G., KOWALCZUK, M., SCHUBERT, R., SZEWCZUK, Z. und STEFANOWICZ, P. 1998. Electrospray tandem mass spectrometry of poly(3-hydroxybutanoic acid) end groups analysis and fragmentation mechanism. Rapid Commun. Mass Spectrom. **12**: 357-360.
- JENDROSSEK, D. 1998. Microbial degradation of polyesters: a review on intracellular poly-(hydroxyalkanoic acid) depolymerases. Polym. Degrad. Stab. **59**:317-325.
- JENDROSSEK, D. 2001a. Transfer of [*Pseudomonas*] *lemoignei*, a gram-negative rod with restricted catabolic capacity, to *Paucimonas* gen. nov. with one species, *Paucimonas lemoignei* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**(Pt 3):905-908.
- JENDROSSEK, D. 2001b. Extracellular PHA depolymerases: the key enzymes of PHA degradation. In: STEINBÜCHEL, A., DOI, Y. (eds), Biopolymers, vol 3b, polyesters II, properties and chemical synthesis: 41-83. Wiley-VCH: Weinheim
- JENDROSSEK, D. 2001c. Microbial degradation of polyesters. In: SCHERPER, T (Ed.) Advances in Biochemical/Engineering Biotechnology, Biopolyesters. **71**:293-325. Springer Verlag Berlin: Heidelberg.
- JENDROSSEK, D. und HANDRICK, R. 1999. Diversity of Polyester depolymerases. Vortrag auf der Jahrestagung der VAAM, Göttingen.
- JENDROSSEK, D. und HANDRICK, R. 2001. Diversität bakterieller PHB-Depolymerasen am Beispiel von *Paucimonas* gen. nov. *lemoignei* comb. nov. BIOSpektrum **6**: 521-526.
- JENDROSSEK, D. und HANDRICK, R. 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. Annual. Rev. (accepted for publication).
- JENDROSSEK, D., BACKHAUS, M., und ANDERMANN, M. 1995a. Characterization of the *Comamonas* sp. poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase and of its structural gene. Can. J. Microbiol. **41**: 160-169.
- JENDROSSEK, D., FRISSE, A., BEHREND, A., ANDERMAN, M., KRATZIN, H. D., STANISLAWSKI, T. und SCHLEGEL, H. G. 1995b. Biochemical and molecular characterization of the *Pseudomonas lemoignei* polyhydroxyalkanoate depolymerase system. J. Bacteriol. **177**: 596-607.
- JENDROSSEK, D., KNOKE, I., HABIBIAN, R. B., STEINBÜCHEL, A. und SCHLEGEL, H. G. 1993a. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of a novel PHB depolymerase from *Comamonas* sp. J. Environ. Polymer. Degrad. **1**: 53-63.
- JENDROSSEK, D., MÜLLER, B. und SCHLEGEL, H. G. 1993b. Cloning and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid)-depolymerase gene locus, *phaZ1*, of *Pseudomonas lemoignei* and its gene product. Eur. J. Biochem. **218**: 701-710.
- JENDROSSEK, D., SCHIRMER, A. und HANDRICK, R. 1997. Recent advances in characterization of bacterial PHA depolymerases. In: EGGINK, G., STEINBÜCHEL, A., PRIORIER, Y. & WITTHOLT, B. (eds.) 1996 International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates: 89-101. Ottawa, Canada: NRC Research Press.

- JENDROSSEK, D., SCHIRMER, A. und SCHLEGEL, H. G. 1996. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 451-463.
- JOHANSSON, M. und NORDLUND, S. 1996. Transcription of the *glnB* and *glnA* genes in the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Microbiology*. **142** (PT 5): 1265-1272.
- JOSSEK, R. REICHELT, R. UND STEINBÜCHEL, A. 1998. *In vitro* biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) by using purified poly(hydroxyalkanoic acid) synthase of *Chromatium vinosum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**:258-266.
- KABACK, H. R. 1971. Bacterial membranes. In: COLOWICK, S. P. und KAPLAN, N. O. (eds.): *Methods in enzymology*, Vol. **22**: 99-120. London: Academic Press.
- KAHLWEIT, M., STREY, R., HAASE, D., KUNIEDA, H., SCHMELLING, T., FAULHABER, B., BORKOVEC, M., EICKE, H.-F., BUSSE, G., EGGERS, F., FUNCK, TH., RICHMAN, H., MAGID, L., SÖDERMAN, O., STILBS, P., WINKLER, J., DITTRICH, A. und JAHN, W. 1987. How to study microemulsions. *J. of Colloid and Interface Science* **118**: 436-453.
- KALTWASSER, H. 1962. Die Rolle der Phosphate im Phosphatstoffwechsel eines Knallgasbakteriums (*Hydrogenomonas* Stamm H16). *Arch. Mikrobiol.* **41**: 282-306.
- KANEKO, T., NAKAMURA, Y., SATO, S., et al. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium. *DNA Res.* **7**(6): 331-338.
- KARAS, M. und HILLENKAMP, F. 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **60**(20): 2299-2301.
- KASUYA K, INOUE Y, DOI Y 1996. Adsorption kinetics of bacterial PHB depolymerase on the surface of polyhydroxyalkanoate films. *Int. J. Biol. Macromol.* **19** (1): 35-40.
- KASUYA, K., DOI, Y., und YAO, T. 1994. Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] by *Comamonas testosteroni* ATSU of soil bacterium. *Polym. Degrad. Stab.* **45**: 379-386.
- KASUYA, K., INOUE, Y., TANAKA, T., AKEHATA, T., IWATA, T., FUKUI, T. und DOI, Y. 1997. Biochemical and molecular characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM1609, isolated from freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(12): 4844-4852.
- KASUYA, K., INOUE, Y., YAMADA, K. und DOI, Y. 1995. Kinetics of surface hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *Polym. Degrad. Stab.* **48**: 167-174.
- KASUYA, K., MITOMO, H., NAKAHARA, M., AKIBA, A., KUDO, T., und DOI, Y. 2000. Identification of a marine benthic P(3HB)-degrading bacterium isolate and characterization of its P(3HB) depolymerase. *Biomacromolecules* **1**: 194-201.
- KASUYA, K., OHURA, T., MASUDA, K., und DOI, Y. 1999. Substrate and binding specificities of bacterial polyhydroxybutyrate depolymerases. *Int. J. Biol. Macromol.* **24**: 329-336.
- KASUYA, K., TAKAGI, K., ISHIWATARI, S., YOSHIDA, Y., und DOI, Y. 1998. Biodegradabilities of various aliphatic polyesters in natural waters. *Polym. Degrad. Stab.* **59**: 327-332.
- KAWAGUCHI, Y. und DOI, Y. 1990. Structure of native poly(3-hydroxybutyrate) granules by X-ray diffraction. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**: 401-407.
- KAWAGUCHI, Y. und DOI, Y. 1992. Kinetics and mechanism of synthesis and degradation of poly(3-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *Macromolecules* **25**(9) 2324-2329.
- KELLEY, L. A., MACCALLUM, R. M. und STERNBERG, M. J. 2000. Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *J. Mol. Biol.* **299**(2): 499-520.
- KHALAMEYZER, V. und BORNSCHEUER, U.T. 1999. Overexpression and characterization of an esterase from *Streptomyces diastatochromogenes*. *Biotechnol. Lett.* **21**, 101-104.
- KIDWELL, J., VALENTIN, H. E., DENNIS, D. 1995. Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus pha* biosynthesis genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(4): 1391-1398.
- KIM, H. K., PARK, S. Y., LEE, J.K., OH, T. K. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**(1):66-71.
- KIM, J. W., JUNG, S. J., YI, C. O. und AHN, J. S. 2000. Accession No. AF293347.
- KIM, K. K., SONG, H. K., SHIN, D. H., HWANG, K. Y. und SUH, S. W. 1997. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure.* **5**(2): 173-185.
- KIM, Y. B. und LENZ, R. W. 2001. Polyesters from microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **71**: 81-123.
- KIM, Y. B., LENZ, R. W. und FULLER, R. C. 1991. Preparation and characterization of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) obtained from *Pseudomonas oleovorans* grown with mixtures of 5-phenylvaleric acid and n-alkanoic acids. *Makromolecules* **24**: 5256-5360.
- KITA, K., ISHIMARU, K., TERAOKA, M., YANASE, H. und KATO, N. 1995. Properties of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1727-1730.
- KITA, K., MASHIBA, S., NAGITA, M., ISHIMARU, K., OKAMOTO, K., YANASE, H. und KATO, N. 1997. Cloning of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122, and characterization of its gene product. *Biochim. Biophys. Acta.* **1352**: 113-122.
- KLINGBEIL, B., KROPPESTEDT, R. M. und JENDROSSEK, D. 1996. Taxonomic identification of *Streptomyces exfoliatus* K10 and characterization of its poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **142**: 215-221.
- KNOKE, I. 1991. Untersuchungen zum Abbau von Poly( $\beta$ -hydroxybuttersäure) durch Bakterien. Diplomarbeit, Universität Göttingen.

- KOBAYASHI, T., SUGIYAMA, A., KAWASE, Y. SAITO, T., MERGAERT, J. und SWINGS, J.** 1999. Biochemical and genetic characterization of an extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Acidovorax* sp. strain TP4. *J. Environ. Polym. Degrad.* **7(1)**: 9-18.
- KOLATTUKUDY, P. E.** 2001. Polyesters in higher plants. In: SCHERPER, T (ed.) *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Biopolyesters.* **71**: 1-49. Springer Verlag Berlin: Heidelberg.
- KOROTKOVA, N. und LIDSTROM, M. E.** 2001. Connection between poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis and growth on C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub> compounds in the methylotroph *Methylobacterium exoterquens* AM1. *J. Bacteriol.* **183(3)**: 1038-1046.
- KOUKER, G. und JAEGER, K.E.** 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* **53(1)**: 211-213.
- KOWALCZUK, M., ADAMUS, G., SIKORSKA, W., RYDZ, J.** 2000. Structural studies of biorelated polymers derived from natural pha and their synthetic analogs with the aid of electrospray multistage mass spectrometry. *ACS Polym. Prep.* **41**: 1626-1627.
- KOYOMA, N. und DOI, Y.** 1997. Effect of solid-state structures on enzymatic degradability of poly(3-hydroxyalkanoic acids), *Macromolecules.* **30**: 826-832.
- KREBSFÄNGER, N., ZOCHER, F., ALTENBUCHNER, J. und BORNSCHEUER, U. T.** 1998. Characterization, and enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *Enzyme Microb. Technol.* **21**: 641-646.
- KUMAGAI, Y., KANESAWA, Y. und DOI, Y.** 1992. Enzymatic degradation of microbial poly(3-hydroxybutyrate) films. *Makromol. Chem.* **193**: 53-57.
- KUNIOKA, M., KAWAGUCHI, Y. und DOI, Y.** 1989. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 569-573.
- KUNKEL, T. A. BEBENEK, K. und McCLARY, J.** 1991. Efficient site-directed mutagenesis using uracil-containing DNA. *Meth. Enzymol.* **204**: 125-139.
- KUNKEL, T. A., ROBERTS, J. D., und ZAKOUR, R. A.** 1987. Rapid and efficient site-directed mutagenesis without phenotypic selection. *Meth. Enzymol.* **154**: 367-382.
- KUNST, F., OGASAWARA, N., MOSZER, I., et al.** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390(6657)**: 249-256.
- KURUSO, Y., KOHAMA, K., UCHIDA, Y., SAITO, T. und YUKAWA, H.** 1994. Cloning and nucleotide sequencing of the poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase gene from *Pseudomonas pickettii*. In DOI, Y. und FUKUDA, K. (eds.): *Biodegradable plastics and polymers.* Elsevier Science B V: 357-361.
- KYTE, J., DOOLITTLE, R. F.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157(1)**:105-132.
- LAEMMLI, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
- LAGEVEEN, R. G., HUISMAN, G. W., PREUSTING, H., KETELAAR, P., EGGINK, G. und WITHOLD, B.** 1988. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans* : effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkanoates. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2924-2932.
- LAMINET, A. A., ZIEGELHOFFER, T., GEORGOPOULOS, C. und PLUCKTHUN, A.** 1990. The *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the beta-lactamase precursor. *EMBO J.* **9(7)**: 2315-2319.
- LANG, D., HOFMANN, B., HAALCK, L., HECHT, H. J., SPENER, F., SCHMID, R. D. und SCHOMBURG, D.** 1996. Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 angstroms resolution. *J. Mol. Biol.* **259(4)**:704-717.
- LANGE R, HENGGE-ARONIS R.** 1991. Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor sigma S. *J. Bacteriol.* **173(14)**:4474-81.
- LEE, D., KOH, Y., KIM, K., KIM, B., CHOI, H., KIM, D., SUHARTONO, M. T. und PYUN, Y.** 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.* **179(2)**: 393-400.
- LEHMAN, L.J., FITZMAURICE, W.P. und ROBERTS, G.P.** 1990. The cloning and functional characterization of the *nifH* gene of *Rhodospirillum rubrum*. *Gene.* **95(1)**: 143-147.
- LEMOIGNE, M.** 1926. Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **8**: 770-782.
- LEMOIGNE, M., DELAPORTE, B. und CROSON, S.** 1944. Contribution à l'étude botanique et biochimique des bactériennes du genre *Bacillus*. I. Valeur du test des lipides  $\beta$ -hydroxybutyriques pour la caractérisation des espèces. *Ann. Inst. Pasteur* **70**: 224.
- LEMOIGNE, M., und GRIARD, H.** 1943. Réserves lipidiques  $\beta$ -hydroxybutyriques chez *Azotobacter chroococcum*. *Comptes rendus de l'academie des sciences* **217**: 557-558.
- LENZ, O. und FRIEDRICH, B.** 1998. A novel multicomponent regulatory system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 12474-12479.
- LENZ, O., SCHWARTZ, E., DERNEDDE, J., EITINGER, M. und FRIEDRICH, B.** 1994. The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. *J. Bacteriol.* **176**: 4385-4393.
- LENZ, R. W., KIM, Y. B. und FULLER, R. C.** 1992. Production of unusual bacterial polyesters by *Pseudomonas oleovorans* through cometabolism. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 207-214.
- LESUISSE, E., SCHANCK, K. und COLSON, C.** 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **216(1)**: 155-160.
- LIEBERGESELL, M. und STEINBÜCHEL, A.** 1992. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D. *Eur. J. Biochem.* **209**: 135-150.

- LIEBERGESELL, M. und STEINBÜCHEL, A. 1993. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthetic genes of *Thiocystis violacea*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**: 493-501.
- LIEBERGESELL, M., HUSTEDE, E., TIMM, A., STEINBÜCHEL, A., FULLER, R. C., LENZ, R. W. und SCHLEGEL, H. G. 1991. Formation of poly(3-hydroxyalkanoates) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria. Arch. Microbiol. **155**: 415-421
- LIEBERGESELL, M., MAYER, F. und STEINBÜCHEL, A. 1993. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. Appl. Microbiol. Biotechnol. **40**: 292-300.
- LIEBERGESELL, M., SCHMIDT, B. und STEINBÜCHEL, A. 1992. Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. FEMS Microbiol. Lett. **99**: 227-232.
- LIEBERGESELL, M., SONOMOTO, MADKOUR, M., MAYER, F. und STEINBÜCHEL, A. 1994. Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Chromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. Eur. J. Biochem. **226**: 71-80.
- LIEBETON, K., ZACHARIAS, A. und JAEGER, K. E. 2001. Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. J. Bacteriol. **183**(2): 597-603.
- LINDBLAD, A., JANSSON, J., BROSTEDT, E., JOHANSSON, M., HELLMAN, U. und NORDLUND, S. 1996. Identification and sequence of a *nifJ*-like gene in *Rhodospirillum rubrum*: partial characterization of a mutant unaffected in nitrogen fixation. Mol. Microbiol. **20**(3): 559-568.
- LITTLE, E., BORK, P. und DOOLITTLE, R. F. 1994. Tracing the spread of fibronectin type III domains in bacterial glycohydrolases. J. Mol. Evol. **39**(6): 631-643.
- LOTTSPREICH, F. und ZORBAS, H., 1998. Bioanalytik. Spektrum Akad. Verlag., Hdg.; ISBN: 3827400414
- LOWE, M. E. 1997. Colipase stabilizes the lid domain of pancreatic triglyceride lipase. J. Biol. Chem. **272**(1): 9-12.
- LOWRY, J. R., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., und RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
- LUNDGREN, D. G., ALPER, R., SCHNAITMAN, C. und MARCHESSAULT, R. H. 1965. Characterization of poly- $\beta$  hydroxybutyrate extracted from different bacteria. J. Bacteriol. **89**: 245-251.
- LUNDGREN, D. G., PFISTER, R. M. und MERRICK, J. M. 1964. Structure of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid granules. J. Gen. Microbiol. **34**: 441-446.
- LUSTY, C. J. und DOUDOROFF, M. 1966. Poly- $\beta$  hydroxybutyrate depolymerases of *Pseudomonas lemoignei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **56**: 960-965.
- MACRAE, R. M. und WILKINSON, J. F. 1958. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. J. Gen. Microbiol. **19**: 210-222.
- MAEHARA, A., UEDA, S., NAKANO, H. und YAMANE, T. 1999. Analyses of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the *pha* locus of *Paracoccus denitrificans*. J. Bacteriol. **181**(9): 2914-2921.
- MARCK, C. 1988. 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. Nucleic Acids Res. **16**(5): 1829-36.
- MARMUR, J. 1961. A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. J. Mol. Biol. **3**: 208-218.
- MARTINEZ, C., DE GEUS, P., LAUWEREYS, M., MATTHYSSENS, G. und CABBILLAU, C. 1992. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. Nature. **356**(6370):615-618.
- MASAMUNE, S., WALSH, C. T., SINSKEY, A. J. und PEOPLES, O. P. 1989. Poly-(R)-3-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis: mechanistic studies on the biological Claisen condensation catalyzed by  $\beta$ -ketoacyl thiolase. Pure und Appl. Chem. **61**: 303-312.
- MATAVULJ, M. und MOLITORIS, H. P. 1992. Fungal degradation of polyhydroxyalkanoates and semiquantitative assay for screening their degradation by terrestrial fungi. FEMS Microbiol. Rev. **103**: 323-332.
- MATAVULJ, M., MOSS, S. T. und MOLITORIS, H. P. 1993. Degradation of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate-based plastics in natural environments. In: SCHLEGEL, H. G. und STEINBÜCHEL, A. (eds.): Proceedings of the international symposium on bacterial polyhydroxyalkanoates. Göttingen: Goltze-Druck.
- MATSUSAKI, H., MANJI, S., TAGUCHI, K., KATO, M., FUKUI, T. und DOI, Y. 1998. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. J. Bacteriol. **180**(24): 6459-6467.
- MAYER, F., MADKOUR, M. H., PIEPER-FÜRST, U., WIECZOREK, R., LIEBERGESELL, M. und STEINBÜCHEL, A. 1996. Electron microscopic observations on the macromolecular organization of the boundary layer of bacterial PHA inclusion bodies. J. Gen. Appl. Microbiol. **42**: 445-455.
- MAYER, F. 1992. Structural aspects of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules. FEMS Microbiol. Rev. **103**: 265-268.
- MAYER, F. und HOPPERT, M. 1997. Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer. J. Basic Microbiol. **37**: 45-52.
- MAYER, F. und SPIESS, E. 1976. Elektronenmikroskopische Präparationsmethoden: Negativ-Kontrastierung. Begleitveröffentlichung C1191. Inst. wiss. Film, Göttingen.
- McCOOL, G. J., FERNANDEZ, T., LI, N. und CANNON, M. C. 1996. Polyhydroxyalkanoate inclusions-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. FEMS Microbiol. Lett. **138**: 41-48.

- McINERNEY, M. J., AMOS, D. A., KEALY, K. S. und PALMER, J. A. 1992. Synthesis and funktion of polyhydroxyalkanoates in anaerobic syntrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 195-206.
- McLELLAN, D. W. und HALLING, P. J. 1988. Acid tolerant poly(3-hydroxybutyrate) hydrolases from moulds. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 215-218.
- McNAMARA, P. J. und IANDOLO, J. J. 1998. Genetic instability of the global regulator *agr* explains the phenotype of the *xpr* mutation in *Staphylococcus aureus* KSI9051. *J. Bacteriol.* **180(10)**: 2609-2615.
- MERGAERT, J., ANDERSON, C., WOUTERS, A., SWINGS, J. und KERSTERS, K. 1992. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 317-322.
- MERGAERT, J., SCHIRMER, A., HAUBEN, L., MAU, M., HOSTE, B., KERSTERS, K., JENDROSSEK, D., SWINGS, J. 1996. Isolation and identification of poly(3-hydroxyvalerate)-degrading strains of *Pseudomonas lemoignei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 769-773.
- MERRICK, J. M. 1965. Effect of polymyxin B, tyrocidine, gramicidin D, and other antibiotics on the enzymatic hydrolysis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **90**: 965-969.
- MERRICK, J. M. 1978. Metabolism of reserve materials. In: CLAYTON, R. K. und SISTROM, W. R. (eds.): *The photosynthetic bacteria*: 199-219. New York: Plenum Publishing Corp.
- MERRICK, J. M. und DOUDOROFF, M. 1961. Enzymatic synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in bacteria. *Nature* **189**: 890-892.
- MERRICK, J. M. und DOUDOROFF, M. 1964. Depolymerization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.* **88**: 60-71.
- MERRICK, J. M. und Yu, C. I. 1966. Purification and properties of a D(-)- $\beta$ -hydroxybutyric dimer hydrolase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem.* **5**: 3563-3568.
- MERRICK, J. M., LUNDGREN, G. und PFISTER, R. M. 1965. Morphological changes in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules associated with decreased susceptibility to enzymatic hydrolysis. *J. Bacteriol.* **89**: 234-239.
- MERRICK, J. M., STEGER, R. und DOMBROSKI, D. 1999. Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *Int J Biol Macromol.* **25(1-3)**: 129-134.
- MERRICK, M. J. 1993. In a class of its own - the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol. Microbiol.* **10(5)**:903-9.
- MEYER, T. E., AMBLER, R. P., BARTSCH, R. G., KAMEN, M. D. 1975. Amino acid sequence of cytochrome c' from the purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* S1. *J. Biol. Chem.* **250(21)**: 8416-8421.
- MITOMO, H., BARHAM, P. J. und KELLER, A. 1988. Temperature dependence of mechanical properties of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate- $\beta$ -hydroxyvalerate). *Polymer Communications* **29**: 112-115.
- MITSKY, T. A., HAO, M., LA VALLEE, B. J., GRUYS, K. J., TAYLOR, N. B., RODRIGUES, D. J., SHAH, D. T., CLEMENTE, T. E., TRAN, M., COLBURN, S. M., LOWRY, S. S., WU, Z., SLATER, S. C., HINCHEE, M. A., STARK, D. M., KISHORE, G. M. und PADGETTE, S. R. 1996. Metabolic engineering of oilseed crops for the production of biodegradable plastics. Posterpräsentation, „International Symposium on Bacterial PHA“ (ISBP), 18.-23.08.1996, Davos, Schweiz.
- MONTAUDO G. 1996. Mass spectrometry of synthetic polymers - Mere advances or revolution? *Trends in Polymer Science* **4 (3)**: 81-86.
- MOSKOWITZ, G. J. und MERRICK, J. M. 1969. Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. II. Enzymatic synthesis of D(-)- $\beta$ -hydroxybutyryl coenzyme A by an enoylhydratase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem.* **8**: 2748-2755.
- MUKAI, K., DOI, Y., SEMA, Y. und TOMITA, K. 1993c. Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. *Biotech. Lett.* **15**: 601-604.
- MUKAI, K., YAMADA, K. und DOI, Y. 1992. Extracellular poly(hydroxyalkanoate) depolymerases and their inhibitor from *Pseudomonas lemoignei*. *Int. J. Biol. Macromol.* **14**: 235-239.
- MUKAI, K., YAMADA, K. und DOI, Y. 1993a. Kinetics and mechanism of heterogenous hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] film by PHA depolymerases. *Int. J. Biol. Macromol.* **15**: 361-366.
- MUKAI, K., YAMADA, K. und DOI, Y. 1993b. Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by a marine bacterium. *Polym. Degrad. Stab.* **41**: 85-91.
- MUKAI, K., YAMADA, K. und DOI, Y. 1994. Efficient hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* YM1414 isolated from lake water. *Polym. Degrad. Stab.* **43**: 319-327.
- MÜLLER, B. 1992. Reinigung und Charakterisierung von Poly(Hydroxyalkanoat)-Depolymerasen aus *Pseudomonas lemoignei* und Klonierung der Gene. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- MÜLLER, B. und JENDROSSEK, D. 1993. Purification and properties of poly(3-hydroxyvaleric acid) depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 487-492.
- MÜLLER, H.-M. und SEEBACH, D. 1993. Poly(hydroxyfettsäureester), eine fünfte Klasse von physiologisch bedeutsamen organischen Biopolymeren? *Angewandte Chemie* **105(4)**: 483-658.
- MURASE, T., SUZUKI, Y., DOI, Y. und IWATA, T. 2002. Nonhydrolytic fragmentation of a poly[(R)-3-hydroxybutyrate] single crystal revealed by use of a mutant of polyhydroxybutyrate depolymerase. *Biomacromolecules.* **3(2)**: 312-317.
- MURASHIMA, K., CHEN, C. L., KOSUGI, A., TAMARU, Y., DOI, R. H. und WONG, S. L. . 2002. Heterologous production of *Clostridium cellulovorans engB*, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. *J. Bacteriol.* **184(1)**: 76-81.
- NAKADA, T., FUKUI, T., SAITO, T., MIKI, K., OJIC, MATSUDA, S., USHIJIMA, A. und TOMITA, K. 1981. Purification and properties of D- $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase from *Zoogloea ramigera* I-16-M. *J. Biochem.* **89**: 625-635.

- NAKAMURA, Y., GOJOBORI, T. und IKEMURA, T. 2000. Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucl. Acids Res.* **28**: 292.
- NAKAYAMA, K., SAITO, T., FUKUI, T., SHIRAKURA, Y. und TOMITA, K. 1985. Purification and properties of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases from *Pseudomonas lemoignei*. *Biochim. Biophys. Acta* **827**: 63-72.
- NARDINI, M. und DIJKSTRA, B. W. 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**(6): 732-737.
- NARDINI, M., LANG, D. A., LIEBETON, K., JAEGER, K. E. und DIJKSTRA, B. W. 2000. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* **275**(40): 31219-25.
- NEEDLEMAN, S. B. und WUNSCH, C. D. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**(3): 443-53.
- NEWKOME, G. R. 1995. *Advances in dendritic macromolecules*. Jai Press Inc., Greenwich, London.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S. und VON HEIJNE, G. 1997a. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int. J. Neural. Syst.* **8**(5-6): 581-99.
- NIELSEN, H., ENGELBRECHT, J., BRUNAK, S. und VON HEIJNE, G. 1997b. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**(1): 1-6.
- NIERMAN, W. C., FELDBLYUM, T. V., et al. 2001. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**(7): 4136-4141.
- NISHIDA, H. und TOKIWA, Y. 1993. Effects of higher-order structure of poly(3-hydroxybutyrate) on its biodegradation. II. Effects of crystal structure on microbial degradation. *J. Environ. Polymer. Degrad.* **1**: 65-80.
- NOJIRI, M. und SAITO, T. 1997. Structure and function of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *J. Bacteriol.* **179**(22): 6965-6970.
- NOSSAL, N. G. und HEPPEL, L. A. 1966. The release of Enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J. Biol. Chem.* **241**: 3055-3062.
- OEDING, V. und SCHLEGEL, H. G. 1973.  $\beta$ -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* **134**: 239-248.
- OHURA, T., KASUYA, K. I. und DOI, Y. 1999. Cloning and characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase gene of *Pseudomonas stutzeri* and analysis of the function of substrate-binding domains. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(1): 189-97.
- OKAZAKI, K., KATO, F., WATANABE, N., YASUDA, S., MASUI, Y. und HAYAKAWA, S. 1995. Purification and properties of two chitinases from *Streptomyces* sp. J-13-3. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**(8): 1586-1587.
- OLLIS, D. L., CHEAH, E., CYGLER, M., DIJKSTRA, B., FROLOW, F., FRANKEN, S. M., HAREL, M., REMINGTON, S. J., SILMAN, I., SCHRAG, J., SUSSMAN, J. L., VERSCHUEREN, K. H. G. und GOLDMAN, A. 1992. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering* **5**: 197-211.
- ONG, E., KILBURN, D. G., MILLER, R. C. JR und WARREN, R. A. 1994. *Streptomyces lividans* glycosylates the linker region of a beta-1,4-glycanase from *Cellulomonas fimi*. *J. Bacteriol.* **176**(4): 999-1008.
- OWEN, A. J. 1985. Some dynamic mechanical properties of microbially produced poly- $\beta$ -hydroxybutyrate /  $\beta$ -hydroxyvalerate copolymers. *Colloid und Polymer Sci.* **263**: 799-803.
- PAGE, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357-358.
- PAZUR, R. J., HOCKING, P. J., RAYMOND, S. und MARCHESSAULT, R. H. 1998. Crystal structure of syndiotactic poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) from X-ray fiber and powder diffraction analyses and molecular modeling. *Macromolecules.* **31**(19): 6585-6592.
- PEARSON, W. R., LIPMAN, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**(8): 2444-2448.
- PEDRÓS-ALIÓ, C., MAS, J. und GUERRERO, R. 1985. The influence of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation on cell volume and buoyant density in *Alcaligenes eutrophus*. *Arch. Microbiol.* **143**: 178-184.
- PEOPLES, O. P. und SINSKEY, A. J. 1989a. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* **264**: 15293-15297.
- PEOPLES, O. P. und SINSKEY, A. J. 1989b. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). *J. Biol. Chem.* **264**: 15298-15303.
- PERSSON, B., BENTSSON-OLIVECRONA, G., ENERBACK, S., OLIVECRONA, T. und JORNvall, H. 1989. Structural features of lipoprotein lipase: lipase family relationships, binding interactions, non-equivalence of lipase cofactors, vitellogenin similarities and functional subdivision of lipoprotein lipase. *Eur. J. Biochem.* **179**: 39-45.
- PFENNIG, N. 1974. *Rhodospseudomonas globiformis*, sp. n., a New Species of the *Rhodospirillaceae*. *Arch. Mikrobiol.* **100**: 197-206.
- PFENNIG, N. 1978. *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a ring shaped vitamin B<sub>12</sub>- requiring member of the family *Rhodospirillaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 283-288.
- PFÜLLER, U. 1986. Mizellen - Vesikel - Mikroemulsionen: Tensidassoziate und ihre Anwendung in Analytik und Biochemie. Anleitung für die chemische Laboratoriumspraxis Band **22**. Springer Berlin.
- PIEPER, U. 1993. Biosynthese eines Copolymers aus 3-Hydroxybuttersäure und 3-Hydroxyvaleriansäure in *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126: physiologische, molekulargenetische und biochemische Untersuchungen. Dissertation, Universität Göttingen.

- PIEPER, U. und STEINBÜCHEL, A. 1992. Identification, cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the Gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber*. FEMS Microbiol. Lett. **96**: 73-80.
- PIEPER-FÜRST, U., MADKOUR, M. H., MAYER, F. und STEINBÜCHEL, A. 1994. Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. J. Bacteriol. **176**: 4328-4337.
- PIEPER-FÜRST, U., MADKOUR, M. H., MAYER, F. und STEINBÜCHEL, A. 1995. Identification of the region of a 14-kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules. J. Bacteriol. **177**: 2513-2523.
- PLATT, T. 1986. Transcription termination and the regulation of gene expression. Ann. Rev. Biochem. **55**: 339-372.
- PLATTNER, D. A., BRUNNER, A., DOBLER, M., MÜLLER, H.-M., PETTER, W., ZBINDEN, P. und SEEBACH, D. 1993. Cyclic oligomers of (*R*)-3-hydroxybutanoic acid: preparation and structural aspects. Helv. Chim. Acta. **76**: 102-103.
- POIRIER, Y., DENNIS, D., KLOMPARENS, K., NAWRATH, C. und SOMERVILLE, C. 1992. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in plants. FEMS Microbiol. Rev. **103**: 237-246.
- PREISS, J. 1989. Chemistry and metabolism of intracellular reserves. In: POINDEXTER, J. S. und LEADBETTER, E. R. (eds.): Bacteria in nature, Vol. 3: 189-258. New York: Plenum Publishing Corp.
- PREUSTING, H., KINGMA, J. und WITTHOLD, B. 1991. Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures. Enzyme Microb. Technol. **13**: 770-779.
- PRIBNOW, D. 1975. Bacteriophage T7 early promoters: nucleotide sequences of two RNA polymerase binding sites. J. Mol. Biol. **99**(3):419-43.
- PRIEST, F. G. 1985. Synthesis and secretion of extracellular enzymes by bacilli. Microbiol. Sci. **2**(9): 278-282.
- PRIEST, F. G. 1992. Synthesis and secretion of extracellular enzymes in bacteria. In: WINKELMANN, G. (ed.) Microbial degradation of natural products: 1-25. VCH: Weinheim
- PÜCHNER, P. und MÜLLER, W. R. 1993. Aspects on biodegradation of PHA. In: SCHLEGEL, H. G. und STEINBÜCHEL, A. (eds.): Proceedings of the international symposium on bacterial polyhydroxyalkanoates. Göttingen: Goltze-Druck.
- PUGSLEY, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. **57**(1): 50-108.
- QUINTEROS, R., GOODWIN, S., LENZ, R. W. und PARK, W. H. 1999. Extracellular degradation of medium chain length poly(beta-hydroxyalkanoates) by *Comamonas* sp. Int. J. Biol. Macromol. **25**(1-3): 135-143.
- RAMSAY, B. A., LOMALIZA, K., CHAVARIE, C., DUBE, B., BATAILLE, P. und RAMSAY, J. A. 1990. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-Co-beta-hydroxyvaleric) acids. Journal Appl. Environ. Microbiol. **56**: 2093-2098.
- RAY, A. K. und STARK, R. E. 1998. Phytochemistry. **48**: 1313
- REHM, B. H., KRÜGER, N. und STEINBÜCHEL, A. 1998. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The PHAG gene from *Pseudomonas putida* KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme A transferase. J. Biol. Chem. **273**(37): 24044-24051.
- REINHARDT, S., HANDRICK, R. und JENDROSSEK, D. 2002. The "PHB Depolymerase Inhibitor" (PDI) of *Paucimonas lemoignei* is a PHB Depolymerase. Biomacromol. (in press).
- REPASKE, R. und REPASKE, C. R. 1976. Quantitative requirements for exponential growth of *Alcaligenes eutrophus*. J. Appl. Environ. Microbiol. **32**: 585-591.
- REUSCH, R. N. 1989. Poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eucaryotic membranes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **191**: 377-381.
- REUSCH, R. N. 1999. *Streptomyces lividans* potassium channel contains poly-(*R*)-3-hydroxybutyrate and inorganic polyphosphate. Biochemistry. **38**(47): 15666-15672.
- REUSCH, R. N. und GRUHN, A. G. 1997. In: 1996 Int. Symp. on Bact. Polyhydroxyalkanoates, NRC Research Press, Ottawa, pp. 10-19.
- REUSCH, R. N. und SADOFF, H. L. 1983. D(-)-Poly-beta-hydroxybutyrate in membranes of genetically competent bacteria. J. Bacteriol. **156**: 778-788.
- REUSCH, R. N. und SADOFF, H. L. 1988. Putative structure and functions of a poly-beta-hydroxybutyrate/calciumphosphate channel in bacterial plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 4176-4180.
- REUSCH, R. N., HISKE, T. W. und SADOFF, H. L. 1986. Poly-beta-hydroxybutyrate membrane structure and its relationship to genetic transformability in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **168**: 553-562.
- REUSCH, R. N., SPARROW, A. W. und GARDINER, J. 1992. Transport of poly-beta-hydroxybutyrate in human plasma. Biochim. Biophys. Acta **1123**: 33-40.
- REVOL, J.-F., CHANZY, H. D., DESLANDES, Y. und MARCHESSAULT, R. H. 1989. High-resolution electron microscopy of poly(beta-hydroxybutyrate). Polymer **30**: 1973-1976.
- RODOLPHE, F. und MATHE, C. 2000. Translation conditional models for protein coding sequences. J. Comput. Biol. **7**(1-2): 249-260.
- RODRIGUEZ-VALERA, F. und LILLO, J. A. G. 1992. Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. FEMS Microbiol. Rev. **103**: 181-186.
- ROHDE, M., GERBERDING, H., MUND, T. und KOHRING, G.-W. 1988. Immunoelectron microscopic localization of bacterial enzymes: pre- and post-embedding labelling techniques on resin-embedded samples. In: MAYER, F. (ed.): Methods in microbiology, Vol. **20**: 175-210. London: Academic Press.

- ROSENBERG, M. und COURT, D. 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* **13**: 319-53.
- SAEGUSA, H., SHIRAKI, M., KANAI, C. und SAITO, T. 2001. Cloning of an intracellular Poly[D(-)-3-Hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J. Bacteriol.* **183**(1): 94-100.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. und ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**(4839):487-491.
- SAITO, T. und KOBAYASHI, T. 2001. Intracellular degradation of PHAs. In: STEINBÜCHEL, A., DOI, Y. (eds) *Biopolymers*, vol. 3b, polyesters II, properties and chemical synthesis: 24-40. Wiley-VCH: Weinheim
- SAITO, T., FUKUI, T., IKEDA, F., TANAKA, Y. und TOMITA, K. 1977. An NADP-linked acetoacetyl CoA reductase from *Zoogloea ramigera*. *Arch. Microbiol.* **114**: 211-217.
- SAITO, T., IWATA, A. und WATANABE, T. 1993. Molecular structure of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *J. Environ. Polym. Degrad.* **1**: 99-105.
- SAITO, T., SAEGUSA, H., MIYATA, Y. und FUKUI, T. 1992. Intracellular degradation of poly(3-hydroxybutyrate) granules of *Zoogloea ramigera* I-16-M. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 333-338.
- SAITO, T., SUZUKI, K., YAMAMOTO, J., FUKUI, T., MIWA, K., TOMITA, K., NAKANISHI, S., ODANI, S., SUZUKI, J. I. und ISHIKAWA, K. 1989. Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the gene for poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *J. Bacteriol.* **171**: 184-189.
- SAITO, T., TAKIZAWA, K. und SAEGUSA, H. 1995. Intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Alcaligenes eutrophus*. *Can. J. Microbiol.* **41**: 187-191.
- SAITOU, N. und NEI, M. 1986. Phylogenetic tree, neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- SALZBERG S.L., DELCHER A.L., KASIF S. und WHITE O. 1998. Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic Acids Res.* **15**; **26**(2):544-8.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. und MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- SANDER, T. 1998. Physiologische Untersuchungen zum Abbau von Poly(3-hydroxybutyrat) [PHB] in *Rhodospirillum rubrum*. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- SANTALUCIA, J. J. R. 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**(4):1460-1465.
- SCANDOLA, M. S. 1996. Vortrag im Rahmen des International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates (ISBP), Davos, Schweiz.
- SCANDOLA, M., FOCARETE, M. L. und FRISONI, G. 1998. Simple kinetic model for the heterogeneous enzymatic hydrolysis of natural poly(3-hydroxybutyrate). *Macromolecules.* **31**(12): 3846-3851.
- SCANDOLA, M., FOCARETE, M. L., ADAMUS, G., SIKORSKA, W., BARANOWSKA, I., SWIERCZEK, S., GNATOWSKI, M., KOWALCZUK, M. und JEDLINSKI, Z. 1997. Polymer blends of natural poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and a synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate). Characterization and biodegradation studies. *Macromolecules.* **30**(9): 2568-2574.
- SCANDOLA, M., FOCARETE, M. L., GAZZANO, M., MATUSZOWICZ, A., SIKORSKA, W., ADAMUS, G., KURCOK, P., KOWALCZUK, M. und JEDLINSKI, Z. 1997b. Crystallinity-Induced Biodegradation of Novel [(R,S)-Butyrolactone]-b-pivalolactone Copolymers. *Macromolecules.* **30**(25): 7743-7748.
- SCHALLER, H., GRAY, C. und HERMANN, K. 1975. Nucleotide sequence of a RNA polymerase binding site from DNA of bacteriophage fd. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 737-741.
- SCHERER, F. E. G., WALKINSHAW, M. D., ARNOTT, S. und MORRE, J. 1980. The ribosome binding sites by *E. coli* ribosomes have regions with signal character in both leader and protein coding segments. *Nucl. Acids Res.* **8**: 3895-3905.
- SCHERER, T. M., FULLER, R. C., GOODWIN, S. und LENZ, R. W. 2000. Enzymatic hydrolysis of oligomeric models of poly-3-hydroxybutyrate. *Biomacromolecules.* **1**(4): 577-583.
- SCHINDLER, J. 1964. Die Synthese der Poly-β-hydroxybuttersäure in *Hydrogenomonas* H16: Die zu β-Hydroxybutyryl-Coenzym A führenden Reaktionsschritte. *Arch. Mikrobiol.* **49**: 236-255.
- SCHIRMER, A. 1991. Isolierung von Poly(3-Hydroxyvalerat) [PHV]- und Poly(3-Hydroxyoctanoat) [PHO]-verwertenden aeroben Bakterien und Charakterisierung der extrazellulären PHO-Depolymerase aus einem Neuisolat. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- SCHIRMER, A. 1994. Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen zum extrazellulären Abbau von Polyhydroxyalkanoaten durch *Pseudomonas fluorescens* GK 13. Dissertation, Universität Göttingen.
- SCHIRMER, A. und JENDROSSEK, D. 1994. Molecular characterization of the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] depolymerase gene of *Pseudomonas fluorescens* GK13 and of its gene product. *J. Bacteriol.* **176**(22):7065-7073.
- SCHIRMER, A., JENDROSSEK, D. und SCHLEGEL, H. G. 1993. Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria: purification and properties of a P(3HO) depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1220-1227.
- SCHIRMER, A., MATZ, C. und JENDROSSEK, D. 1995. Substrate specificities of poly(hydroxyalkanoate)-degrading bacteria and active site studies on the extracellular poly(3-hydroxyoctanoic acid) depolymerase of *Pseudomonas fluorescens* GK13. *Can. J. Microbiol.* **41** (Suppl. 1): 170-179.
- SCHLEGEL, H. G. und GOTTSCHALK, G. 1962. Poly-β-hydroxybuttersäure, ihre Verbreitung, Funktion und Biosynthese. *Angew. Chem.* **74**: 342-347.



- SCHLEGEL, H. G., GOTTSCHALK, G. und v. BARTHA, R. 1961b. Formation and utilization of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature* **191**: 463-465.
- SCHLEGEL, H. G., KALTWASSER, H. und GOTTSCHALK, G. 1961a. Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxidierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.* **38**: 209-222.
- SCHLEGEL, H. G., LAFFERTY, R. und KRAUSS, I. 1970. The isolation of mutants not accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Arch. Mikrobiol.* **71**: 283-294.
- SCHMIDT-DANNERT, C., RUA, M. L., ATOMI, H. und SCHMID, R. D. 1996. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochim. Biophys. Acta.* **1301(1-2)**: 105-114.
- SCHÖBER, U. 1997. Klonierung und Charakterisierung des Strukturgens der Poly(3-Hydroxyvalerat)-Depolymerase aus *Pseudomonas lemoignei* sowie biochemische Untersuchungen der Poly(3-hydroxyvalerat)-Depolymerase. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- SCHÖBER, U., THIEL, C. und JENDROSSEK, D. 2000. Poly(3-hydroxyvalerate) depolymerase of *Pseudomonas lemoignei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1385-1392.
- SCHRAG, J. D., LI, Y., CYGLER, M., LANG, D., BURGDORF, T., HECHT, H. J., SCHMID, R., SCHOMBURG, D., RYDEL, T. J., OLIVER, J. D., STRICKLAND, L. C., DUNAWAY, C. M., LARSON, S. B., DAY J., McPherson A. 1997. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure.* **5(2)**:187-202.
- SCHRAG, J. D., YUNGE, L., SHAN, W. und CYGLER, M. 1991. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the Lipase from *Geotrichum candidum*. *Nature* **351**: 761-764.
- SCHROEDER, W. A., SHELTON, J. B., SHELTON, J. R. 1969. An examination of conditions for the cleavage of polypeptide chains with cyanogen bromide: application to catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* **130(1)**:551-556.
- SCHUBERT, P. 1990. Molekulare Organisation des PHB-Operons und Charakterisierung des PHB-Synthasegens in *Alcaligenes eutrophus*. Dissertation, Universität Göttingen.
- SCHUBERT, P., KRÜGER, N. und STEINBÜCHEL, A. 1991. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate)-PHB-, biosynthetic operon: identification of the N-terminus of PHB-Synthase and identification of the promotor. *J. Bacteriol.* **173**: 168-175.
- SCHUBERT, P., STEINBÜCHEL, A. und SCHLEGEL, H. G. 1988. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 5837-5847.
- SCHUBOT, F. D., KATAEVA, I. A., BLUM, D. L., SHAH, A. K., LJUNGDAHL, L. G., ROSE, J. P. und WANG, B. C. 2001. Structural basis for the substrate specificity of the feruloyl esterase domain of the cellulosomal xylanase Z from *Clostridium thermocellum*. *Biochemistry.* **40(42)**:12524-12532.
- SCHULZ und TOFT 1991. Abstract eines Vortrages, gehalten auf dem 8th Annual Meeting of International Society of Chemical Ecology (ISCE) vom 2.-7. Juli 1991 in Dijon.
- SCHUSTER, E. und SCHLEGEL, H. G. 1967. Chemolithotrophes Wachstum von *Hydrogenomonas* H16 im Chemostat mit elektrolitischer Knallgaserzeugung. *Arch. Mikrobiol.* **58**: 380-409.
- SCOTT, M. 1988. A simple *in situ* cyanogen bromide cleavage method to obtain internal amino acid sequence of protein electroblotted to polyvinylidene difluoride membranes. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* **155**: 1353-1360.
- SEBASTIAN, J. und KOLATTUKUDY, P. E. 1988. Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere. *Arch. Biochem. Biophys.* **263(1)**: 77-85.
- SEBASTIAN, J., CHANDRA, A. K. und KOLATTUKUDY, P. E. 1987. Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere. *J. Bacteriol.* **169(1)**: 131-136.
- SEEBACH, D., BRUNNER, A., BURGER, H. M., SCHNEIDER, J. und REUSCH, R. N. 1994. Isolation and 1H-NMR spectroscopic identification of poly(3-hydroxybutanoate) from prokaryotic and eukaryotic organisms. Determination of the absolute configuration (*R*) of the monomeric unit 3-hydroxybutanoic acid from *Escherichia coli* and spinach. *EUR. J. BIOCHEM.* **224(2)**: 317-328.
- SEEBACH, D., BÜRGER, H. M., MÜLLER, H. M., LENGWEILER, U. D., BECK, A. K., SYKES, K. E., BARKER, P. A. und BARHAM, P. J. 1994. Synthesis of linear oligomers of (*R*)-3-hydroxybutyrate and solid-state structural investigations by electron microscopy and X-ray scattering. *Helv. Chim. Acta.* **77**: 1099-1123.
- SEEBACH, D. und FRITZ, M. G. 1999. Detection, synthesis, structure, and function of oligo(3-hydroxyalkanoates): contributions by synthetic organic chemists. *Int. J. Biol. Macromol.* **25(1-3)**:217-236.
- SELF, S. J., HUNTER, C. N. und LEATHERBARROW, R. J. 1990. Molecular cloning, sequencing and expression of cytochrome c2 from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* **265(2)**: 599-604.
- SENIOR, P. J. und DAWES, E. A. 1971. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **125**: 55-66.
- SENIOR, P. J. und DAWES, E. A. 1973. The regulation of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* **134**: 225-238.
- SHARMA, R. und RAY, A. R. 1995. Polyhydroxybutyrate, its copolymers and blends. *J.M.S.-Rev. Makromol. Chem. Phys.* **C35(2)**: 327-359.
- SHERWOOD, M. 1983. Bacterial plastics comes to market. *BioTechnology* **1**: 388-389.
- SHIBATA, H., KATO, H. und ODA, J. 1998. Random mutagenesis on the *Pseudomonas* lipase activator protein, LipB: exploring amino acid residues required for its function. *Protein Eng.* **11(6)**: 467-472.

- SHIMAMURA, E., KASUYA, K., KOBAYASHI, G., SHIOTANI, T., SHIMA, Y., und DOI, Y. 1994. Physical properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules* **27**: 878-880.
- SHINE, J. und DALGARNO, L. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1342-1346
- SHINE, J. und DALGARNO, L. 1975. Determination of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature*. **254**: 34-38.
- SHINOHE, T., NOJIRI, M., SAITO, T., STANISLAWSKI, T. und JENDROSSEK D. 1996. Determination of the active sites serine of the poly (3-hydroxybutyrate) depolymerases of *Pseudomonas lemoignei* (PhaZ5) and of *Alcaligenes faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **141(1)**:103-109.
- SHINOMIYA M, IWATA T, KASUYA K, DOI Y. 1997. Cloning of the gene for poly(3-hydroxybutyric acid) depolymerase of *Comamonas testosteroni* and functional analysis of its substrate-binding domain. *FEMS Microbiol. Lett.* **154(1)**: 89-94.
- SHINOMIYA, M., IWATA, T. und DOI, Y. 1998. The adsorption of substrate-binding domain of PHB depolymerases to the surface of poly(3-hydroxybutyric acid). *Int. J. Biol. Macromol.* **22(2)**: 129-135.
- SHIRAKI, M., SHIMADA, T., TATSUMICHI, M. und SAITO, T. 1995. Purification and characterization of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases. *J Environ. Polym. Degrad.* **3**: 13-21.
- SHIRAKURA, Y., FUKUI, T., SAITO, T., OKAMOTO, Y., NARIKAWA, T., KOIDE, K., TOMITA, K., TAKEMASA, T. und MASAMUNE, S. 1986. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T<sub>1</sub>. *Biochim. Biophys. Acta.* **880**: 46-53. SHIRAKURA, Y., FUKUI, T., TANIO, T., NAKAYAMA, K., MATSUNO, R. und TOMITA, K. 1983. An extracellular D(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase from *Alcaligenes faecalis*. *Biochim. Biophys. Acta* **748**: 331-339.
- SHUSTER, C. W. und DOUDOROFF, M. 1962. A cold-sensitive D(-)-β-hydroxybutyric acid dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **237**: 603-607.
- SIERRA, G. U. und GIBBONS, N. E. 1962. Role and oxidation pathway of poly-β-hydroxybutyric acid in *Micrococcus halodenitrificans*. *Can. J. Microbiol.* **8**: 255-269.
- SKERMAN, V. B. D., MCGOWAN, V. und SNEATH, P. H. A. (ED) 1980. Approved lists of bacterial names. *Journal Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 225-420.
- SLEPECKY, R. A. und LAW, J. H. 1960. A rapid spectrophotometric assay of alpha, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. *Analyt. Chem.* **32**: 1697-1699.
- SLEPECKY, R. A. und LAW, J. H. 1961. Synthesis and degradation of poly-β-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* **82**: 37-42.
- STAHMANN K.P., REVUELTA J.L. und SEULBERGER H. 2000. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production. *Appl Microbiol Biotechnol*;53(5):509-16.
- STEINBÜCHEL, A. 1991a. Polyhydroxyalkanoic acids. In: BYROM, D. (ed.): *Biomaterials: novel materials from biological sources*: 123-213. Macmillan Press, London.
- STEINBÜCHEL, A. 1991b. Polyhydroxyfettsäuren - thermoplastisch verformbare Polyester aus Bakterien. *Nachr. Chem. Tech. Lab.* **39**: 1112-1124.
- STEINBÜCHEL, A. 1993. Thermoplastisch verformbare und biologisch abbaubare Polyester aus Bakterien: Geeignete neue Werkstoffe aus nachwachsenden Rohstoffen? *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* **44**: 378-384.
- STEINBÜCHEL, A. 1996. Vortrag im Rahmen des International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates (ISBP), Davos, Schweiz.
- STEINBÜCHEL, A. und HEIN, S. 2001. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **71**: 81-123.
- STEINBÜCHEL, A. und PIEPER, U. 1992. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by mutant of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 1-6.
- STEINBÜCHEL, A. und SCHLEGEL, H. G. 1988. Biologisch abbaubare Kunststoffe: Bakterielle Poly-β-Hydroxyfettsäuren als Kunststoffe der Zukunft. Sonderpublikation. Labor 2000: 148-155.
- STEINBÜCHEL, A. und VALENTIN, H. E. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**: 219-228.
- STEINBÜCHEL, A., AERTS, K., BABEL, W., FÖLLER, C., LIEBERGESELL, M., MADKOUR, M. H., MAYER, F., PIEPER-FÜRST, U., PRIES, A., VALENTIN, H. E. und WIECZOREK, R. 1995. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can. J. Microbiol.* **41**: 94-105.
- STEINBÜCHEL, A., DEBZI, E. M., MARCHESSAULT, R. H. und TIMM, A. 1993. Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 443-449.
- STEINBÜCHEL, A., HUSTEDE, E., LIEBERGESELL, M., PIEPER, U., TIMM, A. und VALENTIN, H. 1992. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 217-230.
- STINSON, M. W. und MERRICK, J. M. 1974. Extracellular enzyme secretion by *Pseudomonas lemoignei*. *J. Bacteriol.* **119**: 152-161.
- STORMO, G. D., SCHNEIDER, T. D. und GOLD, L. M. 1982. Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **10(9)**:2971-2996.
- STUART, E. S., LENZ, R. W. und FULLER, R. C. 1995. The ordered macromolecular surface of polyester inclusion bodies in *Pseudomonas oleovorans*. *Can. J. Microbiol.* **41**: 84-93.

- STUART, E.S., FOSTER, L.J., LENZ, R.W., FULLER, R.C. 1996. Intracellular depolymerase functionality and location in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing polyhydroxyoctanoate. *Int. J. Biol. Macromol.* **19** (3): 171-176.
- STUER, W., JAEGER, K. E. und WINKLER, U. K. 1986. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **168**(3): 1070-1074.
- SUGGS, S. V., HIROSE, T., MIYAKE, T., KAWASHIMA, E. H., JOHNSON, M. J., ITAKURA, K. und WALLACE, R. B. 1981. In Brown, D.D. (ed.), *ICN-UCLA Symposia on Developmental Biology Using Purified Genes*. Academic Press Inc., New York, NY, Vol. 23, pp. 683-693.
- SUZEK, B. E., ERMOLAEVA, M. D., SCHREIBER, M. und SALZBERG, S. L. 2001. A probabilistic method for identifying start codons in bacterial genomes. *Bioinformatics.* **17**(12):1123-1130.
- SUZUKI, K., TAIYOJI, M., SUGAWARA, N., NIKAIKOU, N., HENRISSA, T. B. und WATANABE, T. 1999. The third chitinase gene (*chiC*) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem. J.* **343 Pt 3**: 587-596.
- SUZUKI, T., YAMANE, T. und SHIMIZU, S. 1986a. Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fully automatic fed-batch culture of methylotroph. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 322-329.
- SUZUKI, T., YAMANE, T. und SHIMIZU, S. 1986b. Kinetics and effect of nitrogen source feeding on production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 366-369.
- SUZUKI, T., YAMANE, T. und SHIMIZU, S. 1986c. Mass production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by fed-batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 370-374.
- SVENDSEN A. 2000. Lipase protein engineering. *Biochim. Biophys. Acta.* **1543**(2) :223-238.
- SVENDSEN, A., BORCH, K., BARFOED, M., NIELSEN, T. B., GORMSEN, E. und PATKAR, S. A. 1995. Biochemical properties of cloned lipases from the *Pseudomonas* family. *Biochim. Biophys. Acta.* **1259**(1): 9-17.
- TAIDI, B., MANSFIELD, D. A. und ANDERSON, A. J. 1995. Turnover of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**: 201-206.
- TAKAGI, M., NISHIOKA, M., KAKIHARA, H., KITABAYASHI, M., INOUE, H., KAWAKAMI, B., OKA, M. und IMANAKA, T. 1997. Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(11): 4504-4510.
- TAKEDA, M., KAMAGATA, Y., GHIORSE, W. C., HANADA, S., und KOIZUMI, J. 2002. *Caldimonas manganoxidans* gen. nov., sp. nov., a poly(3-hydroxybutyrate)-degrading, manganese-oxidizing thermophile. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:895-900.
- TAKEDA, M., KITASHIMA, K., ADACHI, K., HANAOKA, Y., SUZUKI, I. und Koizumi, J.-I. 2000. Cloning and expression of the gene encoding thermostable poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase. *J. Biosci. Bioengin.* **90**: 416-421.
- TAL, S. und OKON, Y. 1985. Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its funktion in *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* **31**: 608-613.
- TAL, S., SMIRNOW, P. und OKON, Y. 1990. Purification and characterization of D(-)- $\beta$ -hydroxybutyrate dehydrogenase from *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 645-649.
- TANAKA, Y., SAITO, T., FUKUI, T., TANIO, T. und TOMITA, K. 1981. Purification and properties of D(-)-3-hydroxybutyrate-dimer hydrolase from *Zoogloea ramigera* I-16-M. *Eur. J. Biochem.* **118**(1):177-182.
- TANG, S. J., SHAW, J. F., SUN, K. H., SUN, G. H., CHANG, T. Y., LIN, C. K., LO, Y. C. und LEE, G.C. 2001. Recombinant expression and characterization of the *Candida rugosa* lip4 lipase in *Pichia pastoris*: comparison of glycosylation, activity, and stability. *Arch. Biochem. Biophys.* **387**(1): 93-98.
- TANIO, T., FUKUI, T., SHIRAKURA, Y., SAITO, T., TOMITA, K., KAIHO, T. und MASAMUNE, S. 1982. An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *Eur. J. Biochem.* **124**: 71-77.
- TARR, G. E. 1986. Manual Edman sequencing systems. In: SHIVELY, J. E. (Hrsg.), *Methods of protein microcharacterization, a practical handbook*: 155-194. Humana Press, Clifton, NJ.
- TECHNOW, U. 2000. Isolierung der Substratbindedomäne der extrazellulären PHB-Depolymerase A von *Pseudomonas lemoignei* aus rekombinanten *Escherichia coli* und Anreicherung und Charakterisierung des Aktivators im intrazellulären PHB-Abbau von *Rhodospirillum rubrum*. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- TERPE, K., KERKHOFF, K., PLUTA, E. und JENDROSSEK, D. 1999. Relationship between succinate transport and production of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Pseudomonas lemoignei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(4):1703-1709.
- THOMPSON, D. und LARSON, G. 1992. Western blots using stained protein gels. *Biotechniques.* **12**(5): 656-658.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. und HIGGINS D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. und GIBSON, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research.* **22**:4673-4680.
- THONY, B. und HENNECKE, H. 1989. The -24/-12 promoter comes of age. *FEMS Microbiol. Rev.* **5**(4):341-57.
- TIMM, A. 1989. Zusammensetzung von Poly(Hydroxyalkanoaten) in Bakterien in Abhängigkeit vom Substrat. Diplomarbeit, Universität Göttingen.
- TIMM, A. 1992. Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Synthese von Poly(hydroxyfettsäuren) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Dissertation, Universität Göttingen.
- TIMM, A. und STEINBÜCHEL, A. 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent Pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3360-3367.

- TIMM, A. und STEINBÜCHEL, A. 1992. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Eur. J. Biochem. **209**: 15-30.
- TIMMINS, M. R., LENZ, R. W. und FULLER, R. C. 1997. Heterogenous kinetic of the enzymatic degradation of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates). Polymer. **38**: 551-562.
- TINOCO, I. J. R., BORER, P. N., DENGLER, B., LEVIN, M. D., UHLENBECK, O. C., CROTHERS, D. M. und BRALLA, J. 1973. Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. Nat. New Biol. **246(150)**: 40-41.
- TOMASI, G., SCANDOLA, M., BRIESE, B.-H. und JENDROSSEK, D. 1996. Enzymatic degradation of bacterial poly(3-hydroxybutyrate) by a depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*. Macromolecules. **29**: 507-513.
- TOMME, P., GILKES, N. R., GUARNA, M. M., HAYNES, C. A., HASENWINKLE, D., JERVIS, E., JOHNSON, P., McINTOSH, L., WARREN, R. A. und KILBURN, D. G. 1996. Cellulose-binding domains. Versatile affinity tags for inexpensive large-scale purification, concentration, and immobilization of fusion proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. **799**:418-424.
- TOMME, P., WARREN, R. A. und GILKES, N.R. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. Adv. Microb. Physiol. **37**: 1-81.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., und GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacralamid gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4354.
- UEDA, M., FUJIWARA, A., KAWAGUCHI, T. und ARAI, M. 1995. Purification and some properties of six chitinases from *Aeromonas* sp. no. 10S-24. Biosci, Biotechnol, Biochem. **59(11)**:2162-2164.
- UEDA, S., SANO, K., GAO, D., TOMIHARI, N., YAMANE, T. und ENDO, I. 2002. Purification and properties of D-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase of *Paracoccus denitrificans*. FEMS Microbiol. Lett. **206(2)**: 179-184.
- UEFUJI, M., KASUYA, K., und DOI, Y. 1997. Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate]: secretion and properties of PHB depolymerase from *Pseudomonas stutzeri*. Polym. Degrad. Stab. **58**: 275-281.
- UPPENBERG, J., HANSEN, M. T., PATKAR, S. und JONES, T. A. 1994. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. Structure. **2(4)**: 293-308.
- VALENTIN, H. E., BROYLES, D. L., CASAGRANDE, L. A., COLBURN, S. M., CREELY, W. L., DELAQUIL, P. A., FELTON, H. M., GONZALEZ, K. A., HOUMIEL, K. L., LUTKE, K., MAHADEO, D. A., MITSKY, T. A., PADGETTE, S. R., REISER, S. E., SLATER, S., STARK, D. M., STOCK, R. T., STONE, D. A., TAYLOR, N. B., THORNE, G. M., TRAN, M. und GRUYS, K. J. 1999. PHA production, from bacteria to plants. Int. J. Biol. Macromol. **25(1-3)**:303-6.
- VALENTIN, H. E., SCHÖNEBAUM, A. und STEINBÜCHEL, A. 1992. Identification of 4-hydroxyvaleric acid as a constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**: 507-514.
- VALENTINE, R. C., SHAPIRO, P. M. und STADTMAN, E. R. 1968. Regulation of glutamine synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from *Escherichia coli*. Biochem. **7**: 2143-2152.
- VAN NIEL, C.B. 1944. The culture, general physiology, morphology and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. Bact. Rev. **8**: 1-118
- VAN NULAND, N.A., WIERSMA, J.A., VAN DER SPOEL, D., DE GROOT, B.L., SCHEEK, R.M., ROBILLARD, G.T. 1996. Phosphorylation-induced torsion-angle strain in the active center of HPr, detected by NMR and restrained molecular dynamics refinement. Protein Sci. **5** (3): 442-446.
- VAN POUDEROYEN, G., EGGERT, T., JAEGER, K. E. und DIJKSTRA, B. W. 2001. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: a minimal alpha/beta hydrolase fold enzyme. J. Mol. Biol. **309(1)**: 215-226.
- VOET, D. und VOET, J. G. 1995. Biochemistry (second edition). New York: John Wiley and Sons.
- VON HEIJNE, G. 1983. Patterns of amino acids near signal-sequence cleaving sites. Eur. J. Biochem. **133**: 17-21.
- WALLEN, L. L. und ROHWEDDER, W. K. 1974. Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate from activated sludge. Environ. Sci. Technol. **8**: 576-579.
- WANG, W. S. und LUNDGREN, D. G. 1969. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in the chemolithotrophic bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. **97**: 947-950.
- WANG, Y., INAGAWA, Y., SAITO, T., KASUYA, K.-I., DOI, Y. und INOUE, Y. 2002. Enzymatic Hydrolysis of Bacterial Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate)s by Poly(3-hydroxyalkanoate) Depolymerase from *Acidovorax* Sp. TP4. Biomacromolecules. ASAP Article.
- WATANABE, T., OYANAGI, W., SUZUKI, K., OHNISHI, K. und TANAKA, H. 1992. Structure of the gene encoding chitinase D of *Bacillus circulans* WL-12 and possible homology of the enzyme to other prokaryotic chitinases and class III plant chitinases. J. Bacteriol. **174(2)**: 408-414.
- WEBER, K. und OSBORN, M. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. **244**: 4406-4412.61-68
- WEEKE, B. 1973. Rocket immunoelectrophoresis In: Scand. J. Immunol. vol. 2 chapter 2.
- WHITEHORN, E.A., LIVAK, K. J. und PETTEWAY, S. R. JR. 1985. The effects of hybrid ribosome-binding-site variants on the expression of human interferon-beta in *Escherichia coli*. Gene. **36(3)**:375-379.
- WIECZOREK, R. 1997. Regulation der Expression von *phaP* in *Alcaligenes eutrophus*. Dissertation, Universität Münster.
- WIECZOREK, R., PRIES, A., STEINBÜCHEL, A. und MAYER, F. 1995. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. **177**: 2425-2435.
- WIECZOREK, R., STEINBÜCHEL, A. und SCHMIDT, B. 1996. Occurrence of polyhydroxyalkanoic acid granule-associated proteins related to the *Alcaligenes eutrophus* H16 GA24 protein in other bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **135**: 23-30.

- WILDE, E. 1962. Untersuchungen über Wachstum und Speicherstoffsynthese von *Hydrogenomonas*. Arch. Mikrobiol. **43**: 109-137.
- WILLIAMSON, D. H. und WILKINSON, J. F. 1958. The isolation and estimation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. J. Gen. Microbiol. **19**: 198-209.
- WINKLER, U. K. und STUCKMANN, M. 1979. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. **138**: 663-670.
- WONG, S. L. 1995. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. Curr. Opin. Biotechnol. **6**(5): 517-522.
- WONG, S. L., YE, R., NATHOO, S. 1994. Engineering and production of streptokinase in a *Bacillus subtilis* expression-secretion system. Appl. Environ. Microbiol. **60**(2): 517-23.
- WU, K., CHUNG, L., REVILL, W. P., KATZ, L. und REEVES, C. D. 2000. The FK520 gene cluster of *Streptomyces hygrosopicus* var. *ascofomiceticus* (ATCC14891) contains genes for biosynthesis of unusual polyketide extender units. Gene. **251**(1):81-90.
- WU, S.-C und WONG, S.-L. 1999. Development of improved pUB110-based vectors for expression and secretion studies in *Bacillus subtilis*. J. Biotechnol. **72**: 185-195
- YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H. und NISHIUCHI, Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and one *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. Microbiol. Immunol. **39**: 897-904.
- YAMADA, K., MUKAI, K. und DOI, Y. 1993. Enzymatic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas pickettii*. Int. J. Biol. Macromol. **15**: 215-220.
- YAMASHITA, K., AOYAGI, Y., ABE, H. und DOI, Y. 2001. Analysis of adsorption function of polyhydroxybutyrate depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1 by using a quartz crystal microbalance. Biomacromolecules. **2**(1): 25-28.
- YE, R., KIM, J. H., KIM, B. G., SZARKA, S., SIHOTA, E. und WONG, S. L. 1999. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Bioeng. **62**(1): 87-96.
- YOON, S. C. und CHOI, M. H. 1999. Local sequence dependence of polyhydroxyalkanoic acid degradation in *Hydrogenophaga pseudoflava*. J. Biol. Chem. **274**(53):37800-37808.
- YORK, G. M., STUBBE, J. und SINSKEY, A. J. 2001. New insight into the role of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate. J. Bacteriol. **183**(7): 2394-2397.
- YORK, G. M., STUBBE, J. und SINSKEY, A. J. 2002. The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. J. Bacteriol. **184**(1): 59-66.
- ZHANG, H., OBIAS, V., GONYER, K. und DENNIS, D. 1994. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. Appl. Environ. Microbiol. **60**(4): 1198-1205.
- ZHANG, K., SHIRAKI, M. und SAITO, T. 1997. Purification of an extracellular D-(-)-3-hydroxybutyrate oligomer hydrolase from *Pseudomonas* sp. strain A1 and cloning and sequencing of its gene. J. Bacteriol. **179**(1): 72-77.
- ZUKER, M. und STIEGLER, P. 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. Nucleic Acids Res. **9**(1): 133-148.



## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Priv. Doz. Dr. D. Jendrossek, der mir frühzeitig selbständiges wissenschaftliches Arbeiten ermöglichte, und mir mit Rat und Tat, eigenen Erfahrungen und einer steten Diskussionsbereitschaft zur Seite stand. Es ist sein Verdienst, daß ich mir auch an weniger erfolgreichen Tagen die wissenschaftliche Neugier und damit offene Augen für Unbekanntes bewahren konnte. Ich danke ihm für sein Vertrauen ebenso wie für seine Geduld (und Ungeduld!). Seine Befürwortung einer interdisziplinären Zusammenarbeit mit verschiedensten Arbeitsgruppen trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit und der Erweiterung nicht nur des wissenschaftlichen Horizontes bei. Seiner kritischen Durchsicht des umfangreichen Manuskriptes bin ich zu Dank verpflichtet.

Den Professoren H. G. Schlegel, G. Gottschalk und Prof. F. Mayer möchte ich für das Wecken meines Interesses an der Biochemie, Genetik und Morphologie der Mikroorganismen, danken. Ihnen und Prof. H.-J. Knackmuss sei auch für die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung und aufrichtige Diskussionsbereitschaft im Zusammenhang mit der nun vorliegenden Arbeit gedankt.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes gilt mein Dank für die Gewährung eines Stipendiums.

Dr. Letizia Focarete danke ich für ihre Kooperationsbereitschaft. Ihr freundlich energisches Wesen und ihr Optimismus halfen, so manches mißlungene Experiment zu vergessen und einen neuen Ansatz zu wagen. Die Entdeckung von PhaZ7 wäre ohne die inspirierenden Diskussionen an den Abenden so mancher langer Labortage und gemeinsam bewältigte Mißgeschicke nicht denkbar gewesen. Auch für ihre kompetente Einführung in die Problematik der Polymerchemie/-analytik bin ich ihr dankbar.

Allen ehemaligen Mitgliedern der Göttinger Labore 44 und 48 sei für ihre Unterstützung als auch den manchmal erforderlichen Trost und die Freude über gemeinsame „Erfolge“ gedankt. Meike Andermann und Andreas Schirmer, deren routiniertes Arbeiten und stete Hilfsbereitschaft mich faszinierten, möchte ich unbedingt erwähnen. Ganz besonders danke ich auch Till Sander und Ulrike Technow, welche mit großem Einsatz (oft nächtelang) mit mir um die Reinigung des depolymerisierenden Systems aus *R. rubrum* gerungen haben.

Beim Gedanken an Göttinger Tage komme ich nicht umhin, zwei Namen zu nennen, die damals schon Institution für uns Doktoranden geworden sind: Manfred Hellwig (der „Engel des Großpraktikums und Retter in der Not“) und K. H. (Charlie) Bertram von der Werkstatt, ohne deren Unterstützung mancher experimentelle Aufbau hätte nicht umgesetzt werden können.

Allen Mitgliedern des Lehrstuhles von Prof. G. Gottschalk (stellvertretend seien C. Seiffert, K. Weiss, R. Daniel, J. Brodersen, H. J. Abken, C. Hemmerling, R. Schmitz sowie V. u. B. Müller genannt), des ehemaligen Lehrstuhles von Prof. Schlegel (B. Kusian, M. Reh, Prof. B. Bowien, Tom und Tanja) sowie Dr. H. U. Moesch und weiteren Mitgliedern der Abteilung von Prof. G. Braus danke ich für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und das Vertrauen bei der Benutzung ihrer apparativen Einrichtungen.

Ludwig Völkel und Helge Bode, die mir die Pforten der Organischen Chemie offenhielten, danke ich für ihre wertvolle Zeit.

Dr. P. Waser, Dr. M. Fritz sowie Prof. D. Seebach gilt mein Dank für die Unterstützung meiner Substrattests. Dr. M. Kowalczyk sei für die fruchtbare Diskussion und die Durchführung der ESI-MS gedankt.

Ebenso danke ich Dr. H. Weber (ProSeq; FHG), Dr. B. Schmidt und Volker Nödinger für die Unterstützung in der Peptidanalytik, J. Schmucker (FHG) für die Einweisung am MALDI-TOF-Massenspektrometer und die Unterstützung bei der Durchführung entsprechender Analysen sowie Dr. J. Altenbuchner für die freundliche Überlassung verschiedener Plasmide.

Den Angehörigen des Institutes für technische Biochemie, die zugunsten meiner Experimente einige Zeit auf ihre Titristat-Anlage verzichten mussten und mich als Fremdarbeiter in ihren heiligen Hallen akzeptierten und nach besten Kräften unterstützten sei hier herzlich gedankt. Für die Einführung in die Pick- und Pipetierrobotertechnik und damit für einige Wochen ersparte Arbeit und für das offene Ohr bei „seltsamen Ideen“ danke ich Markus Enzelberger vom ITB. Auch den Angehörigen der anderen Institute des Zentrums für Bioverfahrenstechnik, welche äußerst hilfsbereit ihre Unterstützung gewährten, gilt mein Dank.

Allen Mitgliedern des Institutes für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, insbesondere den Teilnehmern des täglichen „Kaffeekränzchens“ danke ich für die Hilfe bei der Lösung vielfältigster Probleme. Sibylle Bürger (die so manches Sequenzreaktionsaliquot für mich opferte), Nathalie Trachtmann und Jörg Rauh gilt Dank für viele fruchtbare Diskussionen.

Simone Reinhardt gab mir als „Naig´schmeckt´m“ eine Chance, half mir durch ihr freundliches aufgeschlossenes (und schlagfertiges) Wesen schneller im „Ländle“ heimisch zu werden. Sie brachte mir neben der schwäbischen Sprache und Kultur auch eine Unmenge an praktischen Labortricks bei. Unbezahlbar war ihre Unterstützung nicht nur während der experimentellen Arbeit sondern auch in der Endphase der Niederschrift meiner Arbeit.

Allen Freunden, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, möchte ich herzlich für die Unterstützung und jede gebotene Ablenkung in schwierigen Situationen danken.

Meiner und Sybilles Familie danke ich für die stets bedingungslose Unterstützung.

Sybille gilt letztlich mein Dank für in sehr hilfreichen Diskussionen geopfert Stunden, eine erfolgreiche Einweisung in die Geheimnisse der Analytik, viele hervorragende Ideen zur Lösung experimenteller Fragestellungen, die Animation zum Abbau von Stresshormonen durch physische Betätigung und ihr Verständnis und Vertrauen.



**LEBENS LAUF**

- Anschrift:** Döffingerweg 2, 70569 Stuttgart; rene.handrick@gmx.de
- Geboren:** 26/10/1970 in Hoyerswerda (Sachsen)
- Staatsangehörigkeit:** deutsch
- Familienstand:** ledig
- Schulausbildung:**
- 1977-1987 Allgemeinbildende Zehnklassige Polytechnische Oberschule in Kamenz
- 1987-1989 Arbeiter und Bauernfakultät „Walter Ulbricht“/INSTITUT ZUR VORBEREITUNG AUF DAS AUSLANDSSTUDIUM der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Abitur am 01/07/1989, Prädikat „Sehr gut“ (Zertifikat: Russisch, Englisch)
- Studium:**
- WS1991/92-1996/97 Biologie (Diplom) an der Universität Göttingen
- 11/1995 Mündliche Diplomprüfung (Mikrobiologie, Biochemie, Physikalische Chemie)
- WS 1995/96-WS1996/97 Diplomarbeit am INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE UND GENETIK der Universität Göttingen (Arbeitsgruppe Dr. D. JENDROSSEK, Abteilung Prof. H.G. SCHLEGEL), Thema: „Untersuchungen zum intrazellulären Abbau von Poly(3-Hydroxybuttersäure) in Bakterien“
- 16/01/1997 Diplom im Fach Biologie
- Akademische Ausbildung:**
- WS 1997/98 Beginn der Dissertation zum Thema: „Neuartige Poly(3-hydroxybutyrat) Depolymerasen aus *Paucimonas lemoignei* und *Rhodospirillum rubrum*“ (Institut für Mikrobiologie und Genetik der Universität Göttingen, Arbeitsgruppe PD Dr. JENDROSSEK als Stipendiat des Graduiertenkollegs „Chemische Aktivitäten von Mikroorganismen“)
- 01/1998-01/2000 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 09/1998 Auf Einladung von Prof. T. SAITO Vortrag und Aufenthalt am Laboratory of Molecular Biology der KINAGAWA UNIVERSITY, Japan
- 07/1999 Wechsel der Arbeitsgruppe an die Universität Stuttgart, INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE/ZENTRUM FÜR BIOVERFAHRENSTECHNIK
- bis 06/2002 Fortführung der Promotionsarbeit an der Universität Stuttgart
- Publikationen:**
- Originalarbeiten:
- JENDROSSEK, D., SCHIRMER, A. und HANDRICK, R. (1997) Recent advances in characterization of bacterial PHA depolymerases. In: 1996 International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates (Eggink, G., Steinbüchel, A., Priorier, Y., Witholt, B., Eds.), Ottawa, Canada: NRC Research Press, 89-101.
  - HANDRICK R, REINHARDT S, JENDROSSEK D. (2000) Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. J. Bacteriol. 182:5916-18.
  - HANDRICK, R., REINHARDT, S., FOCARETE, M.L., SCANDOLA, M., ADAMUS, G., KOWALCZUK, M., JENDROSSEK, D. (2001) A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphous polyesters of short-chain-length hydroxyalkanoic acids. J. Biol. Chem. 276:36215-24.
  - REINHARDT, S., HANDRICK, R. und JENDROSSEK, D. (2002) The "PHB Depolymerase Inhibitor" (PDI) of *Paucimonas lemoignei* is a PHB depolymerase. *Biomacromol.* 3(4):823-827.
- Übersichtsartikel:
- HANDRICK, R. und JENDROSSEK, D. (1998) Extracellular und intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerases: homologies and differences. In: *Biochemical Principles and Mechanisms of Biodegradation and Biodegradation of Polymers* (Steinbüchel, A., Ed.), Weinheim: Wiley-VCH, 57-67.
  - JENDROSSEK, D. und HANDRICK, R. (2001) Diversität bakterieller PHB-Depolymerasen am Beispiel von *Paucimonas gen. nov. lemoignei* comb. nov. *BIOSpektrum* 6: 521-526.
  - JENDROSSEK, D. und HANDRICK, R. (2002) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual. Rev. Microbiol.* 56:403-432.
- Posterpräsentationen
- Vorträge auf
- Fachtagungen:
- International Symposium of Biological Polyesters:
- 1996 (Davos, Schweiz), Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)
- 1998 (Riken, Japan), Reisestipendium des Graduiertenkollegs
- 2000 (Boston-Cambridge, USA)
- Jahrestagungen der VAAM (1997 bis 2002 Posterpräsentationen/Vorträge)
- JENDROSSEK, D. und HANDRICK, R. Diversity of polyester depolymerases. Vortrag auf der Jahrestagung der VAAM, Göttingen, 1999.