

**Entwicklung und Evaluierung von Assaysystemen zur
Identifizierung des Substratspektrums von
Epoxidhydrolasen, Aufreinigung und
Charakterisierung einer Epoxidhydrolase aus
Rhodococcus ruber DSM44319**

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von Kai Doderer
geb. am 30. November 1972 in Ulm.

Hauptberichter: Prof. Dr. R. D. Schmid
Mitberichter: Prof. Dr. D. H. Wolf
Vorsitzender: Prof. Dr. H. Bertagnolli
Tag der mündlichen Prüfung: 9. Dezember 2003

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart

2003

Wer nur Chemie versteht, versteht auch die nicht recht.

Georg Christoph Lichtenberg (1742 bis 1799)

Danksagung

Prof. Dr. Rolf D. Schmid danke ich für die Überlassung des Themas und seinem stetigen Interesse an meiner Arbeit. In den vergangenen Jahren hatte ich die Gelegenheit viel von ihm zu lernen.

Mein Dank gilt der Arbeitsgruppe Biokatalyse und dem gesamten Institut für gute und fruchtbare Arbeitsbedingungen und Unterstützung.

Mein Besonderer Dank gilt Frau Dr. Sabine Lutz-Wahl, die mich auch nach Ihrer Zeit als Gruppenleiterin weiterhin fachlich und moralisch unterstützt hat.

Wesentliche Hilfe für mich waren die ständigen Anregungen, konstruktive Kritik und Diskussionsbereitschaft, nicht nur über die Arbeit, sondern auch über vieles mehr, von Dr. Ralf Petri, Dr. Erik Henke, Dr. Cornelius Bessler und Dr. Eckhart Bonacker und dafür gilt mein herzlichster Dank.

Außerhalb der Biokatalysegruppe gilt mein Dank vor allem Frau Dr. Jutta Schmitt, Frau Dipl. Biol. Jutta Secker, M. Eng. Sven Richter und Volker Nödinger, die für alle Fragen offen waren und mir immer weiterhelfen konnten.

Der Biokatalysegruppe möchte ich für eine gute und nette Arbeitsatmosphäre danken, hier besonders Frau Dr. Sandra Vorlová, Frau Dipl. Biol. Monika Rusnak, Frau Dipl. Lebensmittelchem. Nicole Beuttenmüller, Frau Dipl. Biol. (t.o.) Sabine Eiben, Dipl. Biol. (t.o.) Daniel Appel und Dipl. Chem. Steffen Maurer.

Ich danke Alexandra Ziegler und Frieder Mertz für ihren Einsatz in ihren Forschungspraktika und Bettina Meißburger für ihre Hilfe als „HIWIne“.

Cand. biol. (t.o.) Hendrik Schewe danke ich für seine Geduld mit mir als Betreuer und seine Mitarbeit im Weinsäure Projekt.

Markus Enzelberger danke ich für die Hilfe beim Weinsäure Projekt und seinen Anregungen und Hilfestellungen in seiner Zeit als Gruppenleiter.

Frau Dipl. Biol. (t.o.) Sandra Barth danke ich für ihr "Mitleiden" im Themenkomplex der Epoxidhydrolasen und für ihre Hilfe und fachlichen Rat bei den bioinformatischen Tätigkeiten.

Frau Dr. Valda Urlacher danke ich für ihre ständige Gesprächsbereitschaft und Anregungen und nicht zuletzt für die Korrektur der Arbeit.

Frau Dr. M. Keßeler und Herrn Dr. B. Hauer danke ich für die Ermöglichung der fruchtbaren Aufenthalte in Ludwigshafen bei der BASF AG. Andreas Schädler, Volker Wengert, Birgitt Paqué und Herrn Dr. T. Friedrich danke ich für die Unterstützung bei der Reinigung der Epoxidhydrolase aus *R. ruber* und die netten, unterhaltsamen Tage im Labor (Make it so). Diese Arbeit wurde von der BASF AG unterstützt.

Meiner Freundin Tanja möchte ich für ihre Unterstützung und unendliche Geduld danken, die mir vor allem im letzten halben Jahr sehr viel Kraft gegeben hat.

Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester, insbesondere meiner Mutter, ohne deren Hartnäckigkeit ich vielleicht nie studiert hätte.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungen	XIII
Kurzzusammenfassung der Arbeit	XVII
Abstract	XVIII
A Einleitung	1
1 Epoxidhydrolasen	1
2 Paradigmenwechsel in der Biotechnologie	9
3 Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität	12
4 Rhodococci	16
5 Weinsäure	18
6 Zielsetzung	22
B Material und Methoden	23
1 Material	23
1.1 Geräte	23
1.2 Chemikalien und Enzyme	24
1.3 Kommerzielle Kits	27
1.4 Verbrauchsmaterialien	28
1.5 Primer	28
1.6 Mikroorganismen und Plasmide	29

1.6.1	Organismen	29
1.6.2	Plasmide	29
2	Stammhaltung und Kultivierung	30
2.1	Stammhaltung und Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen	30
2.1.1	Stammhaltung	30
2.1.2	Kultivierung und Anzuchtbedingungen	30
2.1.3	Messung der Zelldichte	31
2.2	Stammhaltung und Kultivierung von <i>Streptomyces</i> Stämmen	31
2.2.1	Stammhaltung von <i>Streptomyces antibioticus</i> TÜ4	31
2.2.2	Kultivierung von <i>Streptomyces antibioticus</i> TÜ4	31
2.3	Stammhaltung und Kultivierung von <i>Rhodococcus ruber</i> DSM44319	32
2.3.1	Stammhaltung von <i>Rhodococcus ruber</i> DSM44319	32
2.3.2	Kultivierung von <i>Rhodococcus ruber</i> DSM44319	33
2.4	Automatische Zellvereinzelnung mit dem Pickroboter	33
2.5	Induktion und Expression	33
2.5.1	Induktion und Expression von pET20b+ Konstrukten in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	33
2.5.2	Induktion und Expression der Cosmidgenbank in <i>E. coli</i> EPI100 TM	33
2.5.3	Induktion und Expression der Cosmid Genbank in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	34
2.6	Zellaufschluss und Zellernte	34
2.6.1	Zellernte	34
2.6.2	Zellaufschluss mit Ultraschall	34
2.6.3	Zellaufschluss in Mikrotiterplatten	34
2.6.4	Zellaufschluss in der Kugelmühle	35
2.6.5	Periplasma Aufschluss	35
3	Methoden zur Isolierung und Reinigung von DNA	36
3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
3.1.1	Isolierung der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> für Schnelltests	36
3.1.2	Isolierung reiner Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Spin-Mini)	37
3.1.3	Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Midi)	37
3.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	38
3.3	Alkoholfällung	38

3.3.1	DNA- Fällung mit Ethanol	38
3.3.2	DNA- Fällung mit Isopropanol	39
3.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	39
3.5	Gesamt-DNA Isolierung aus Bakterien	39
3.5.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Rhodococcus ruber</i> DSM44319	39
3.5.2	Gesamt-DNA Isolierung mit Anionenaustauschersäulen (Genomic-tip, Qiagen)	40
3.6	Charakterisierung von DNA-Molekülen	41
3.6.1	Restriktionsspaltung von DNA	41
3.6.2	Agarose-Gelelektrophorese	41
3.7	DNA-Sequenzierung	43
3.7.1	Giessen des Polyacrylamid-Gels	44
3.7.2	Ansatz	44
3.7.3	Sequenzierungsreaktion	45
3.7.4	Probenaufarbeitung	46
4	Klonierungsexperimente	46
4.1	Spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	46
4.2	Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase	48
4.3	Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase	48
4.4	Cosmidgenbank aus <i>Rhodococcus ruber</i> DSM44319	48
4.4.1	Erzeugung der Cosmidgenbank	48
4.4.2	Lagerung der Cosmidgenbank	49
4.4.3	Transfer der Cosmidgenbank in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	49
5	DNA-Transfer in Bakterien	49
5.1	Transformation nach der PEG/DMSO-Methode	49
5.1.1	Herstellung kompetenter Zellen	49
5.1.2	Transformation kompetenter Zellen	50
5.2	Transformation nach der RbCl-Methode	51
5.2.1	Herstellung kompetenter Zellen	51
5.2.2	Transformation kompetenter Zellen	51
5.3	Transformation mit Hilfe der Elektroporation	51

5.3.1	Präparation von kompetenten Elektroporations-Zellen	52
5.3.2	Transformation elektrokompenter Zellen	52
6	Proteinaufreinigung	53
6.1	Ammoniumsulfat-Fällung	53
6.2	Gelfiltrations-Chromatographie	53
6.3	Ionenaustausch-Chromatographie	54
6.3.1	Ionenaustausch-Chromatographie mit Q-Sepharose FF	55
6.3.2	Ionenaustausch-Chromatographie mit einer Mono-Q Chromatographiesäule	56
6.4	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)	56
6.4.1	Hydrophobe Chromatographie an Phenylsepharose FF	56
6.4.2	Hydrophobe Chromatographie mit einer TSK-Phenylsäule	57
7	Allgemeine biochemische Methoden	57
7.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	57
7.1.1	Herstellung des SDS-Gels und Durchführung der Elektrophorese	58
7.1.2	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	60
7.2	Proteinbestimmung	60
7.2.1	Bicinchoninsäure (BCA)-Test	60
7.2.2	Bradford-Test	61
7.3	Proteinblotting	61
7.4	N-terminale Sequenzierung	62
8	Synthese von <i>cis</i>-2,3-Oxirandicarbonsäure	63
8.1	Synthese von Dinatrium <i>cis</i> -2,3-Oxirandicarbonat	63
8.2	Synthese von Barium <i>cis</i> -2,3-Oxirandicarbonat	64
8.3	Synthese von <i>cis</i> -2,3-Oxirandicarbonsäure	64
9	Biotransformationen	65
9.1	Biotransformationen im Mikrotiterplattenformat	65
9.2	Biotransformationen im Milliliter Maßstab	65
10	Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität	66
10.1	Chirale Kapillargaschromatographie	66
10.1.1	Derivatisierung von Weinsäure	67

10.2	Nachweis von Diolen in Lösung mit Schiffsschem Reagenz	68
10.2.1	Durchführung des Tests	68
10.2.2	Validierung des Testformates	68
10.3	Nachweis durch Carboxyfluorescein	69
10.3.1	Durchführung des Fluoreszenztests	70
10.3.2	Validierung des Fluoreszenztests	70
10.4	Nachweis von Weinsäure	70
10.5	Nachweis der Bildung von Hydrobenzoin	71
C	Ergebnisse	72
1	Assayentwicklung	72
1.1	Vorbedingungen zur Assayentwicklung	72
1.2	Entwicklung eines Produktnachweises der Epoxidhydrolaseaktivität	72
1.2.1	Detektion der Spaltprodukte	73
1.2.2	Evaluierung des PSS Testformates	77
1.2.2.1	Validierung des PSS-Assays in Glas-MTP	78
1.2.2.2	Validierung des PSS-Assays in Polypropylen Mikrotiterplatten	81
1.2.3	Automatisierung des PSS-Assays	83
1.2.4	Nachweis der Epoxidhydrolaseaktivität von <i>S. antibioticus</i> TÜ4 mit dem PSS-Assay	83
1.3	Nachweis von Periodat mit Carboxyfluorescein	84
1.3.1	Validierung des PSC Testformates	86
1.3.2	Kosolventien im PSC-Assay	88
1.3.3	Automatisierung des PSC-Assays	89
2	Substratsuche für putative Epoxidhydrolasen aus <i>Bacillus subtilis</i>, <i>Corynebacterium glutamicum</i> und <i>Momordica Charantia</i>	90
2.1	Datenbanken Analyse	90
2.2	pQE-30 Konstrukte	92
2.2.1	Klonierung der pQE-30 Konstrukte	92
2.2.2	Heterologe Expression der Epoxidhydrolasen von <i>B. subtilis</i> , <i>C. glutamicum</i> und <i>M. charantia</i> in <i>E. coli</i>	94
2.3	pET20b+ Konstrukte	96

2.3.1	Klonierung der pET20b+ Konstrukte _____	96
2.3.2	Heterologe Expression der Epoxidhydrolasen von <i>B. subtilis</i> , <i>C. glutamicum</i> und <i>M. charantia</i> in <i>E. coli</i> _____	100
2.4	Epoxidhydrolaseaktivität der rekombinanten Epoxidhydrolasen _____	102
2.5	Sequenzvergleiche und Suche nach den katalytischen Aminosäuren der drei putativen Epoxidhydrolasen _____	103
3	Weinsäurebildende Epoxidhydrolase aus <i>Rhodococcus ruber</i> DSM44319 _____	105
3.1	Schnelltest zur Bestimmung des Weinsäuregehaltes einer Lösung _____	107
3.2	Aufbau der Cosmidgenbank aus chromosomaler DNA von <i>R. ruber</i> DSM44319 _____	109
3.3	Screening der Cosmidgenbank auf hydrolytische Aktivität _____	112
3.3.1	Expression in <i>E. coli</i> EPI100™ _____	112
3.3.2	Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3) _____	112
3.4	Aufreinigung, Charakterisierung und Bestimmung des N-Terminus der Epoxidhydrolase aus <i>R. ruber</i> DSM44319 _____	113
3.4.1	Lagerstabilität von <i>R. ruber</i> DSM44319 Zellextrakt _____	114
3.4.2	Steigerung der Ausgangsaktivität von <i>R. ruber</i> DSM44319 _____	114
3.4.3	Aufreinigung der nativen Epoxidhydrolase aus <i>R. ruber</i> DSM44319 _____	115
3.4.4	Sequenzierung der Epoxidhydrolase aus <i>R. ruber</i> DSM44319 _____	119
3.5	Vom N-Terminus und den Peptiden zur DNA Sequenz _____	122
3.6	Analyse der Hydrolase Sequenz aus <i>R. ruber</i> DSM44319 _____	125
3.7	Charakterisierung der Epoxidhydrolase aus <i>R. ruber</i> DSM44319 _____	126
D	Diskussion _____	131
1	Screeningsysteme in der Enzymkatalyse _____	131
1.1	Durchmusterung von Variantenbibliotheken _____	131
1.2	Durchmusterung von Stammsammlungen nach Enzymaktivitäten und Substratscreening _____	132
1.3	Entwicklung und Etablierung eines Assays auf Epoxidhydrolaseaktivität in Mikrotiterplatten unter Verwendung von Periodat und Schiffschem Reagenz (PSS-Assay) _____	133
1.4	Entwicklung und Etablierung eines Assays auf Epoxidhydrolaseaktivität in Mikrotiterplatten unter Verwendung von Periodat und Carboxyfluorescein (PSC-Assay) _____	135

2	Substratsuche für putative Epoxidhydrolasen	137
3	Weinsäurebildende Hydrolase aus <i>R. ruber</i> DSM44319	139
3.1	Screening der Genbank von <i>R. ruber</i> DSM44319 nach <i>cis</i> -2,3-Oxirandicarbonsäure Hydrolyse	139
3.2	Aufreinigung und Charakterisierung der Hydrolase aus <i>R. ruber</i> DSM44319	140
3.3	Funktion und Proteinsequenz der Hydrolase aus <i>R. ruber</i> DSM44319	142
E	Zusammenfassung	144
F	Literatur	147
G	Anhang	165
1	Messwerte des PSS-Assays	165
1.1	Messungen in Glas-MTP	165
1.2	Messungen in PP-MTP	166
2	Messwerte des PSC-Assays	168
3	Messwerte des Weinsäure Assays	170
4	Aminosäuresequenzen	170
4.1	Epoxidhydrolase aus <i>Bacillus subtilis</i> 168 (DSM 402)	170
4.2	Epoxidhydrolase aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	171
4.3	Epoxidhydrolase aus <i>Momordica charantia</i>	171
4.4	Epoxidhydrolase aus <i>R. ruber</i> DSM44319 und <i>R. rhodochrous</i> LMPG-18079	171
5	DNA-Sequenzen	171
5.1	Epoxidhydrolase aus <i>Bacillus subtilis</i> 168 (DSM 402)	171
5.1.1	pBS3000 Konstrukt	171
5.1.2	pETBS Konstrukt	172
5.2	Epoxidhydrolase aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	174
5.2.1	pCG3000 Konstrukt	174
5.2.2	pETCG Konstrukt	175
5.3	Epoxidhydrolase aus <i>Momordica charantia</i>	176

5.3.1	p93momo12H05 Konstrukt	176
5.3.2	pMO3000 Konstrukt	177
5.3.3	pETMO Konstrukt	178
5.4	Epoxidhydrolase aus <i>R. ruber</i> DSM44319 und <i>R. rhodochrous</i> LMPG-18079	179
H	Lebenslauf	181
I	Eidesstattliche Erklärung	182

Abkürzungen

<i>A.</i>	<i>Agrobacterium</i>
Abb.	Abbildung
AF	Aktive Fraktion
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
Bu	Butyl
c	stöchiometrische Konzentration [mol/ l]
<i>C.</i>	<i>Corynebacterium</i>
CCD	Charge Coupled Device
cEH	cytosolische Epoxidhydrolase
CIAP	Calf intestine-alkaline phosphatase
d	Tag (day)
Da	Dalton
dATP	3'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	3'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
dGTP	3'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	3'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig (double stranded)
DSM bzw. DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dTTP	3'-Desoxythymidin-5'-triphosphat

<i>E</i> -Wert	Enantioselektivität
E-Wert	Erwartungswert (für die zufällige Übereinstimmung zweier Sequenzen)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss (enantiomeric excess)
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EH	Epoxidhydrolase
eq	Reaktionsequivalente
Et	Ethyl
F	Farad (Kapazität eines Widerstands [$s A^2/ W$])
FACS	fluorescence activated cell sorting
FID	Flammenionisations-Detektor
g	Erdbeschleunigung [$9.81 g/m^2$], Gramm
GC	Gaschromatographie
Gl.	Gleichung
h	Stunde
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	High performance liquid chromatography
HTS	Hochdurchsatzscreening (high-throughput screening)
IEX	Ionenaustauschchromatographie (Ion exchange chromatography)
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	β -Galactosidasegen (<i>E. coli</i>)
LB	Luria Bertani-Medium
m	Meter
M	Molar [mol/l]
<i>M.</i>	<i>Momordica</i>
M/V	Masse pro Volumen
mA	Milliampère

Me	Methyl
mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
M _r	relative Molekülmasse [g/mol]
MTP	Mikrotiterplatte
Nal	Nalidixinsäure
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglycol
pH	pontentia hydrogenii, negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen (H ₃ O ⁺)
P _i	Phosphat
PP	Polypropylen
Pr	Propyl
PS	Polystyrol
PSC	Periodatspaltung und Detektion mit Carboxyfluorescein
PSS	Periodatspaltung mit Färbung durch Schiffssches Reagenz
<i>R.</i>	<i>Rhodococcus</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S.</i>	<i>Streptomyces</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfat)
ss	Einzelsträngig (single stranded)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Eisessig-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	N-tris[Hydroxymethyl]methyl-2-aminoethansulfonsäure

Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
VIS	sichtbarer Teil des elektromagnetischen Spektrums
W	Watt
λ	Wellenlänge in nm
ρ	Dichte [g/ml]
Ω	Ohm

Kurzzusammenfassung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war die Suche nach neuen Epoxidhydrolasen (EC 3.3.2.3), die in rekombinanter Form als Biokatalysatoren verwendet werden können. Die Suche nach neuen Epoxidhydrolaseaktivitäten kann auf zwei Wegen erfolgen.

Datenbanken, wie z. B. „GeneBank“, können auf DNA oder Protein Ebene durch Sequenzvergleiche mit Programmen, wie z. B. BLAST nach Sequenzen durchsucht werden, die bekannten Epoxidhydrolasen ähnlich sind. Im umgekehrten Fall kann eine unbekannte, aus einem Organismus isolierte Sequenz mit anderen verglichen werden und so die putative Funktion bestimmt werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurden drei putative Epoxidhydrolasen aus *B. subtilis*, *C. glutamicum* und *M. charantia*, die durch Sequenzvergleiche identifiziert wurden, untersucht. Durch die Analyse der Proteinsequenz kann nicht auf die Substratspezifität rückgeschlossen werden, deshalb musste die Funktionalität mit mehreren Epoxiden getestet werden. Dafür wurden zwei Produktnachweise in Mikrotiterplatten für *vicinale* Diole entwickelt. Der PSS (Periodatspaltung und Färbung mit Schiffschem Reagenz) und PSC (Periodatspaltung und Detektion mit Carboxyfluorescein) Assay. Mit dem PSS-Assay wurden die Produkte einer Periodatspaltung mit Pararosanilin in einer Farbreaktion nachgewiesen. Der PSS-Assay erlaubt den direkten Nachweis der 1,2-Diolen in wässriger Lösung in Gegenwart von Zelllysaten. Der PSS-Test wurde mit vier Substrat/Produkt Kombinationen validiert. In allen Fällen konnte ein Diolgehalt von mindestens 5 µmol/ml sicher detektiert werden. Die Standardfehler lagen unter 8%. Mit dem PSC-Assay wurde das nach der Spaltung verbliebene Periodat mit Carboxyfluorescein nachgewiesen. Der PSC-Assay wurde mit sieben verschiedenen Epoxiden und ihren korrespondierenden 1,2-Diolen validiert und es konnten Standardfehler von unter 4 % und ein Detektionslimit von <1 µmol/ml bestimmt werden. Somit ist der PSC Test zum Variantenscreening geeignet. Mit diesen beiden Assaysystemen wurden die drei obengenannten, rekombinant in *E. coli* produzierten, Epoxidhydrolasen untersucht. Dabei konnte keine Epoxidhydrolaseaktivität gegen alle getesteten Epoxide nachgewiesen werden.

L(+)-Weinsäure wird in einem Maßstab von 30000 t/a bei Preisen von 5 €/kg vorwiegend aus Rückständen der Weinerzeugung hergestellt. Die sich daraus ergebenden starken jahreszeitlichen Schwankungen machen eine von Naturstoff unabhängigen Zugang zu L(+)-Weinsäure attraktiv.

R. ruber DSM44319 ist in der Lage *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure zu L(+)-Weinsäure zu hydrolysieren.^{1,2} Das für die Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure verantwortliche Enzym wurde aus *R. ruber* DSM44319 durch eine mehrstufige Aufreinigung mit einem Reinigungsfaktor von rund 450 isoliert. Das aufgereinigte Protein wurde charakterisiert und die Teile der Proteinsequenz bestimmt. Mit diesen Fragmenten konnte bei einer Datenbanksuche in den US Patenten eine Hydrolase aus *R. rhodochrous* LMPG-18079 gefunden werden, die dieselbe Reaktion katalysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die patentierte Protein- und DNA-Sequenz aus *R. rhodochrous* LMPG-18079 und *R. ruber* DSM44319 identisch sind. Proteinsequenzvergleiche zwischen der *R. ruber* Sequenz mit bekannten Epoxidhydrolasen zeigten keine Ähnlichkeit. Jedoch zeigt diese Sequenz eine hohe Ähnlichkeit mit vielen Halogencarbonsäure Dehalogenasen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Hydrolase aufgrund ihrer Proteinsequenz als Halogencarbonsäure Dehalogenase (EC 3.8.1.5) einzustufen ist, obwohl sie in ihrer Funktionalität einer Epoxidhydrolase entspricht.

Abstract

Chiral epoxides and *vicinal* diols are versatile synthons for the synthesis of enantiopure organic chemicals. Enzymatic hydrolytic kinetic resolution of racemic epoxides (Fig. 1) represents one of the most promising strategies for the preparation of enantiopure epoxides and *vicinal* diols.

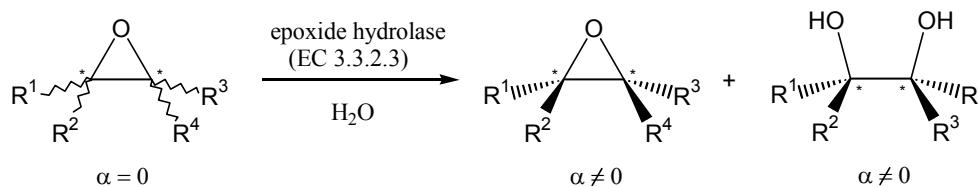


Fig. 1: Epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of an epoxide to a *vicinal* Diol.

Microbial epoxide hydrolases from both fungi and bacteria seem to be very promising for the preparative scale hydrolysis of epoxides.³ Although epoxide hydrolases are ubiquitous enzymes responsible for the detoxification of xenobiotics and involved in the synthesis of chemical messengers and secondary metabolites,⁴ the EHs from only a relatively small number of microorganisms have been explored in detail.

The mechanism of the epoxide ring-opening involves the attack of a nucleophilic carboxylate residue at one end of the epoxide which has been activated again by protonation. This leads to the formation of an α -hydroxyester intermediate which is covalently bound to active site of the enzyme. This intermediate is hydrolyzed by the nucleophilic attack of a water molecule which is activated by a histidine, followed by the release of the diol product and regeneration of the enzyme (Fig. 2).⁵⁻⁷

Evidence for the likelihood of this mechanism came from experiments involving ¹⁸O-labeled enzyme in unlabeled water and *vice versa*. For soluble rat epoxide hydrolase, Asp333, Asp495, His523⁸ and for microsomal epoxide hydrolase, Asp226, Asp352, His431 were identified to form the catalytic triad.⁹ However, it could be demonstrated that indeed not Asp352 but Glu404 is involved in the catalytic machinery and replacement of Glu404 by Asp leads to a strongly increased turnover rate.¹⁰ The enzymatic hydrolysis of terminal epoxides may proceed via attacking either the less shielded oxirane carbon leading to retention of configuration (most common) or at the stereogenic centre resulting in inversion of configuration.¹¹ The X-ray structures of only three epoxide hydrolases from *Agrobacterium radiobacter* AD1,¹² *Mus Musculus*¹³ and *Aspergillus*

niger LCP521¹⁴ are known up to now. They prove the proposed mechanism of epoxide hydrolases. In 2001 Archelas and Furstoss¹⁵ as well as Steinreiber and Faber¹⁶ reviewed applications of microbial epoxide hydrolases in organic synthesis.

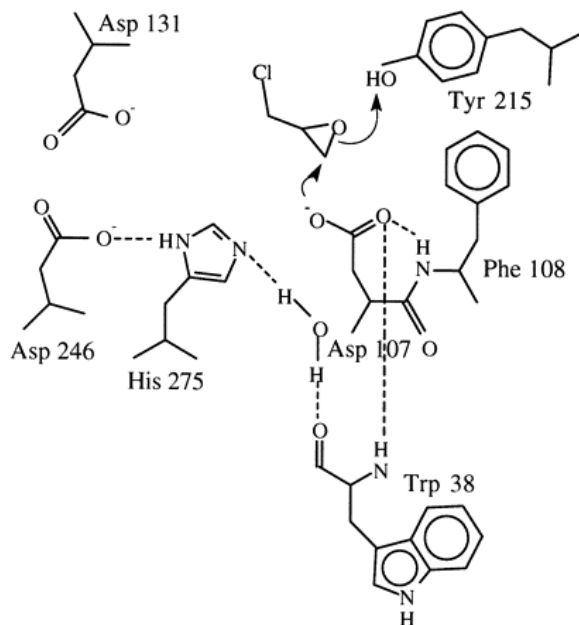


Fig. 2: Mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1.¹²

The aim of this work was the screening for new epoxide hydrolases which can be used for biocatalytic purposes.

In the first part of this work three putative epoxide hydrolases from *Bacillus subtilis* 168, *Corynebacterium glutamicum* and *Momordica charantia* should be examined, particularly for the capability to synthesise chiral epoxides and 1,2-diols of industrial interest. Therefore an assay system had to be set up which allows to screen a large number of enzymes for their hydrolytic activity against a wide variety of epoxides. With this assay the characterisation the three putative epoxide hydrolases from *Bacillus subtilis* 168, *Corynebacterium glutamicum* and *Momordica charantia* should be done. The genes encoding for the putative epoxide hydrolases were obtained by the BASF cooperation which was the industrial partner in this project.

In order to characterise the three putative epoxide hydrolases from *Bacillus subtilis* 168, *Corynebacterium glutamicum* and *Momordica charantia* two methods for the detection of vicinal diols were developed, both based on the oxidative cleavage of 1,2-diols with periodate.¹⁷ After the cleavage the detection of the amount of vicinal diol was done in two different ways. The

products of the oxidative cleavage are aldehydes and/or ketones. Aldehydes can be detected by a colouring reaction with pararosaniline (PSS-Assay: Periodate cleavage and Schiff reagent). The reaction scheme is shown in Fig. 3. This method enables the detection of the product formed by an epoxide hydrolase in the presence of cell extracts. The PSS-Assay was validated with four substrate/product combinations:

1. a aromatic epoxide and corresponding 1,2-diol (styrene oxide and 1,2-phenylethanediol),
2. a aliphatic epoxide and 1,2-diol (1,2-epoxybutane and 1,2-butanediol),
3. a cyclic epoxide and 1,2-diol (epoxycyclohexane and 1,2-cyclohexanediol),
4. a chlorinated epoxide and 1,2-diol (epichlorohydrin and 3-chloro-1,2-propanediol).

These combinations represent a wide variety of epoxides. Fig. 4 shows the standard curves of styrene oxide, 1,2-epoxybutane, epoxycyclohexane and epichlorohydrin and the corresponding *vicinal* diols. A linear increase of the absorption at 560 nm was obtained with a concentration of 0 to 15 mM (0 to 15 μmol diol in 100 μl solution to be tested) diol. The standard errors were reasonably low ranging within 2 to 9 %. The sensitivity was established by the determination of the standard deviation. For all substrate/product pairs the signal to noise ratio is larger than 3 for 5 to 25 μmol diol in 100 μl solution. Therefore the detection limit is 5 μmol for all tested substances. The PSS-Assay was automated using a Beckmann Pipetting robot and with this setup 960 tests per day could be carried out per day. The method targets the product of the enzymatic reaction rather than the substrates and thus results in a low number of false negatives. Furthermore, any epoxide which can be metabolized to a *vicinal* diol with at least one hydrogen substituent at the hydroxyl group can be tested.

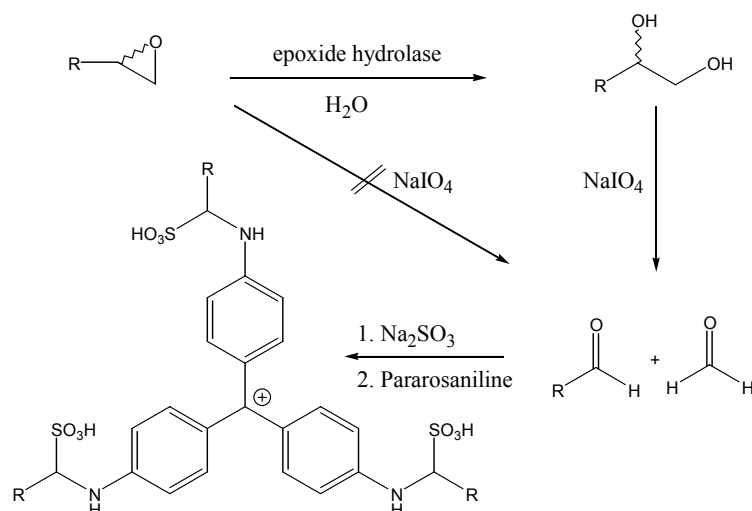


Fig. 3: Reaction scheme of PSS (Periodate cleavage and Schiff reagent) epoxide hydrolase activity assay.

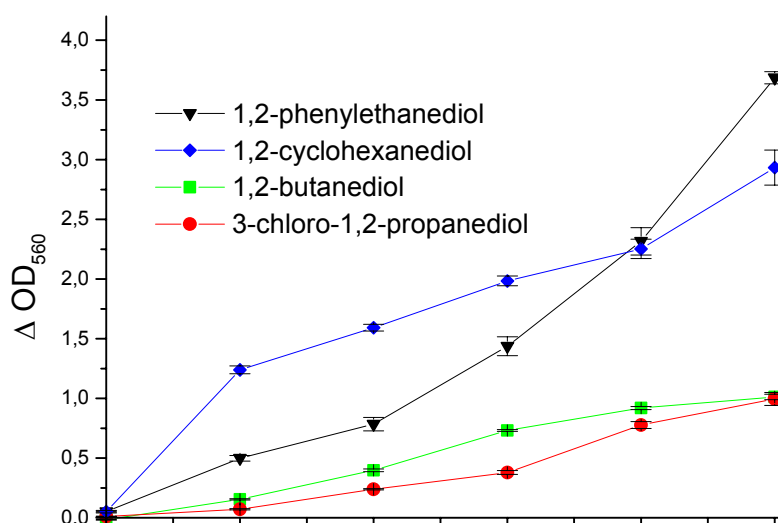


Fig. 4: Validation of the PSS-Assay in glass microtiterplates. Absorption at 560 nm is plotted against diol concentration [mM] of 1,2-phenylethanediol (black line), 1,2-cyclohexanediol (blue line), 1,2-butanediol (green line) and 3-chloro-1,2-propanediol (red line). With increasing diol concentration the epoxide concentration is decreasing correspondingly. All data points are corrected for unspecific background by means of negative control.

The new test format was used to analyze the epoxide hydrolase activity of *Streptomyces antibioticus* Tü4 cell extracts which were obtained after sonification and centrifugation of bacterial cultures. *S. antibioticus* Tü4 converts styrene oxide to 1-phenyl-1,2-ethanediol whereas 1,2-epoxybutane is not hydrolysed.¹⁸ Twenty μ L cell lysate were mixed with 80 μ L of a 31.25 mM styrene oxide solution or with 80 μ L of a 31.25 mM 1,2-epoxybutane in a polypropylene

microtiter plate well (25 mM final epoxide concentration) and incubated at room temperature. Both substrate solutions contained 5% (v/v) DMSO as cosolvent. Fig. 5 shows the increasing amount of 1-phenyl-1,2-ethanediol after 0, 3, 6 and 9 h incubation. 1,2-Epoxybutane is not metabolized.

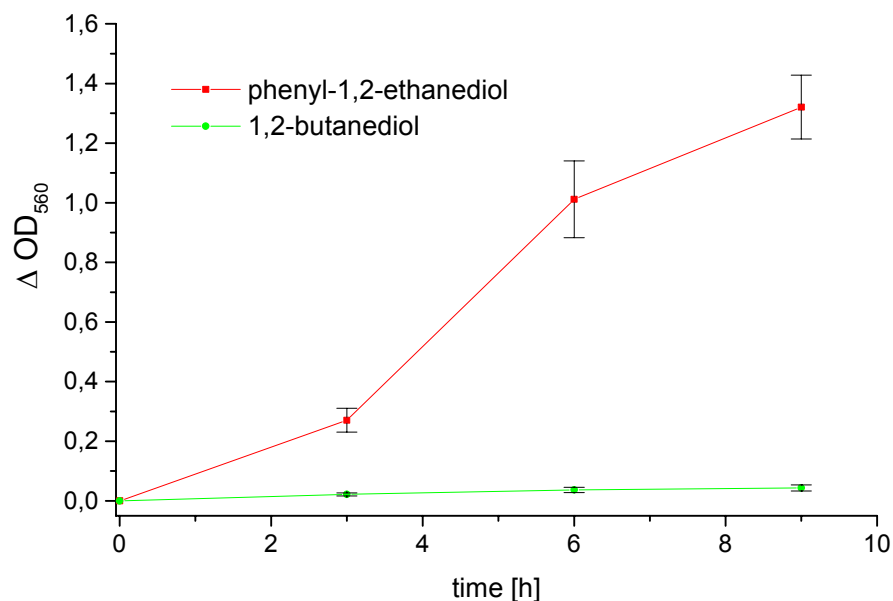


Fig. 5: Detection of epoxide hydrolase activity of *Streptomyces antibioticus* Tü4 cell lysate towards styrene oxide (red line) and 1,2-epoxybutane (green line) with the PSS-Assay.

The second method is based on the detection of excessive periodate after the cleavage by 5(6)-carboxyfluorescein. The fluorescence dye is destroyed by periodate and not destroyed by the substrate, product or other substances. Therefore the fluorescence is an indicator for the amount of *vicinal* diol in the test solution. A high amount of 1,2-diol leads to a low concentration of periodate, thus causing a high fluorescence and vice versa. Fig. 6 shows the reaction scheme.

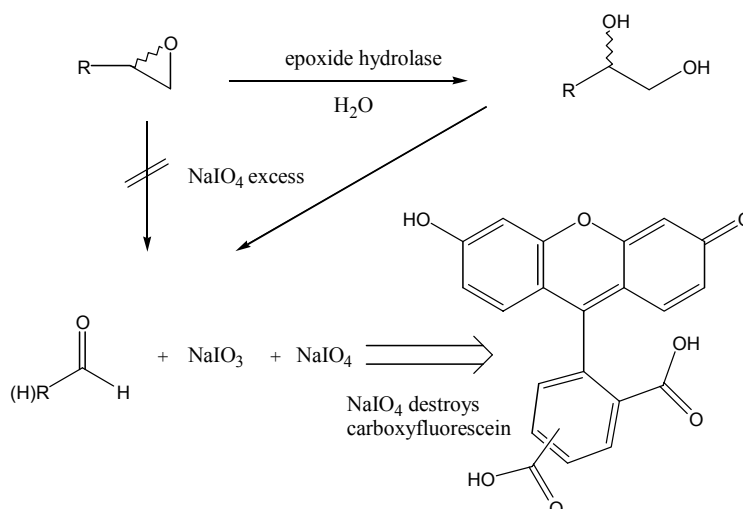


Fig. 6: Reaction scheme of PSC (Periodate cleavage and detection by carboxyfluorescein) epoxide hydrolase activity assay.

The PSC-Assay was validated with 7 substrate/product combinations in the same manner as the PSS-Assay. The 1,2-diols in the substrate/product combinations 1,2-epoxybutane/1,2-butanediol, 1,2-epoxyhexane/1,2-hexanediol, epichlorhydrin/3-chloro-1,2-propanediol, epoxy-cyclohexan/*trans*-1,2-cyclohexanediol, 2,3-epoxybutane/2,3-butanediol and stilbene oxide/hydrobenzoine could be detected with a standard error of 4% and a detection limit of $<1 \mu\text{mol}$.

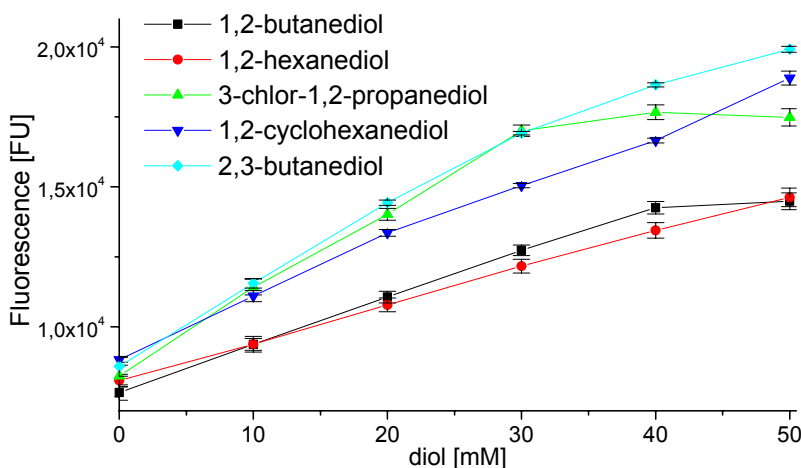


Fig. 7: Validation of the PSC-Assay in microtiterplates. The fluorescence at 515 nm (Excitation 480 nm) is plotted against the diol concentration [mM] of 1,2-butanediol (black line), 1,2-hexanediol (red line), 3-chloro-1,2-propanediol (green line), *trans*-1,2-cyclohexanediol (blue line) and 2,3-butanediol (turquoise line). With increasing diol concentration the epoxide concentration is decreasing correspondingly. All data points are corrected for unspecific background by means of negative control.

Although not all cosolvents can be used with the PSC-Assay and the product of the enzymatic reaction is not directly targeted, the lower detection limit, better standard error and less hands on time are big advantages of this assay.

Three putative epoxide hydrolases from *B. subtilis*, *C. glutamicum* und *M. charantia* were investigated. In the protein sequence of the putative epoxide hydrolase from *C. glutamicum* two of three amino acids from the catalytic triade, as well as the proton donor are missing. This leads to the conclusion that the gene from *C. glutamicum* is not a common epoxide hydrolase. All proteins were successfully recombinant expressed in *E. coli*. The resulting protein fractions were tested for epoxide hydrolase activity towards seven epoxides (see above) by the PSS and PSC-Assay. Thereby no epoxide hydrolase activity with all tested substrates could be detected.

In the second part of this work the aim was the determine the gene encoding for the hydrolase from *Rhodococcus ruber* DSM44319 which is capable of hydrolyzing *cis*-2,3-oxirane dicarboxylic acid to L(+)-tartaric acid.

L(+)-tartaric acid is produced in a scale of 30000 t/a mainly in Spain, France und Italy from residues of wine production. Prices fluctuate around 5 €/kg depending on the season and the wine harvest. Therefore a production method which is independent from natural raw material is desirable. *R. ruber* DSM44319 cells or cell extract hydrolyses *cis*-2,3-oxirane dicarboxylic acid with a high stereoselectivity to L(+)-tartaric (Fig. 8). The gene encoding for this hydrolase was not known at the beginning of this work.

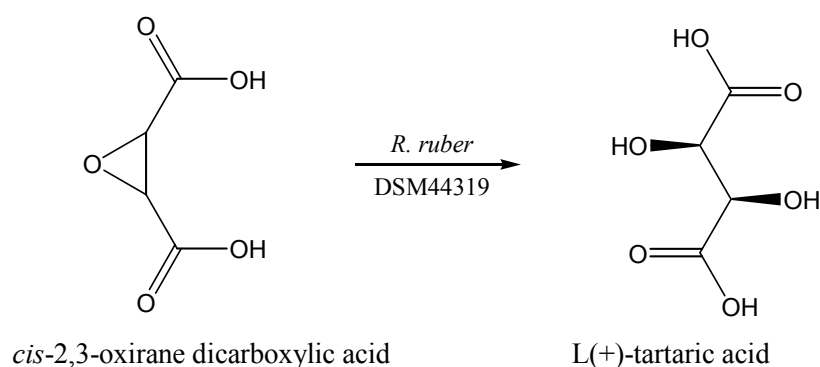


Fig. 8: Hydrolysis of *cis*-2,3-oxirane dicarboxylic acid to L(+)-tartaric acid by *R. ruber*.^{1,2}

The enzyme which is responsible for the hydrolysis of *cis*-2,3-oxirane dicarboxylic acid was purified from *R. ruber* DSM44319 cell extract. For this task a colourimetric test method of Maurer *et. al.*¹⁹ for tartaric acid in aqueous solution was adapted for microtiterplates. With this

assay the tartaric acid concentration could be determined in a range from 0 – 100 mM in the presence of *cis*-2,3-oxirane dicarboxylic acid with a detection limit of 2.5 mM and standard error of 4%. The specific activity of *R. ruber* DSM44139 cell extract was increased 32-fold by cultivation *R. ruber* in TSB medium with induction of the hydrolytic activity by addition of 7.5 mM *cis*-2,3-oxirane dicarboxylic acid to the medium. After addition of 20% (v/v) glycerol to the cell extract the storage stability at -20°C was increased from 2 days to 4 weeks. The purification procedure involved 10 standard steps (Fig. 9).

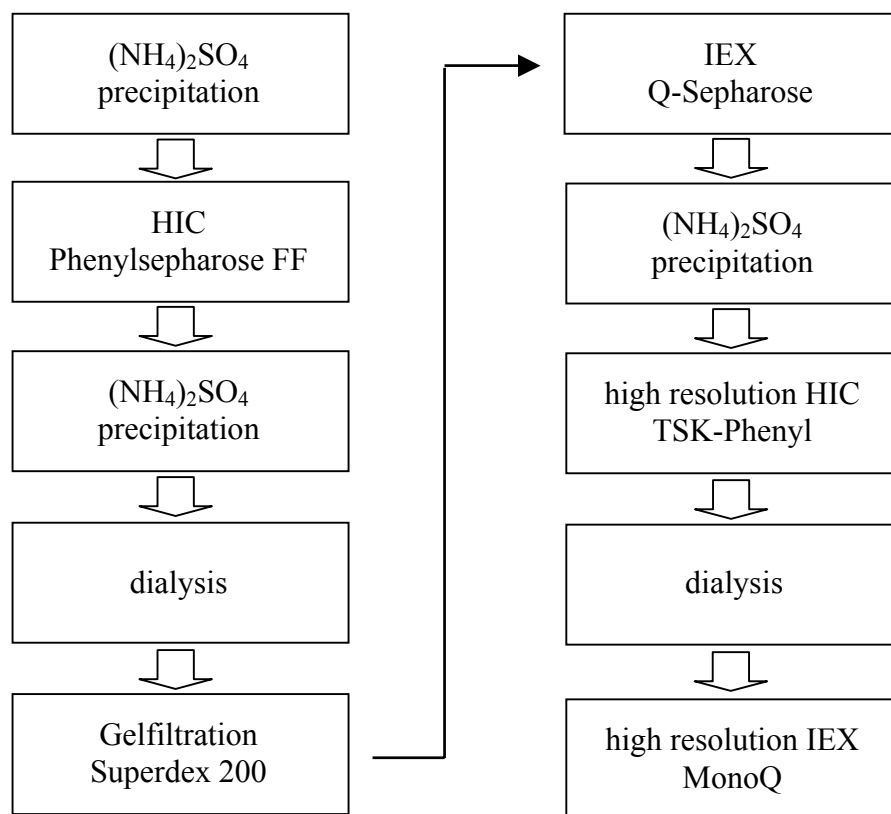


Fig. 9: Purification strategy for the hydrolase from *R. ruber* DSM44319.

After chromatographic separations all fraction were tested for hydrolytic activity towards *cis*-2,3-oxirane dicarboxylic acid, active fractions were pooled and used for the next purification method. After the last step, a high resolution anion exchange chromatography, four active fraction were received. In all fraction was a protein band with the molecular weight of approximately 34 kD visible on the SDS-PAGE (Fig. 10). The highest purification factor determined was 450 for active fraction IV from the last purification step. The yield was overall steps 2%. All parameters of the purification were summarized in Table 1.

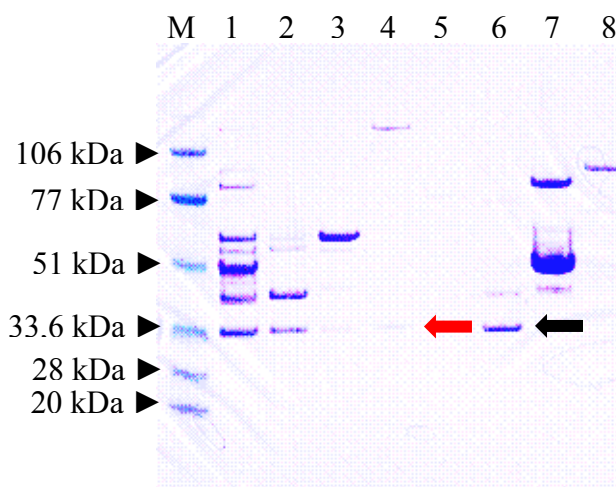


Fig. 10: SDS-PAGE of the last purification step. Lane 1: before high resolution IEX; Lane 2: active fraction I; Lane 3: active fraction II; Lane 4: active fraction III; Lane 5: active fraction IV; Lane 6: inactive fraction; Lane 7: inactive fraction; Lane 8: inactive fraction. The red arrow points on the protein band responding to the hydrolase. The black arrow points on an inactive protein band of the same molecular weight.

Table 1: Balance for the purification of the hydrolase from *R. ruber* DSM44319.

purification step	volume [ml]	volume activity [U/ml]	protein content [mg/ml]	spec. activity [U/mg]	total activity [U]	purification factor	yield [%]
0. cell extract	600,0	0,94	4,530	0,21	565,7	1,00	100,0
1. AF HIC	250,0	0,71	2,610	0,27	178,2	1,31	31,5
2. AF Gelfiltration	76,0	0,78	4,550	0,17	59,1	0,82	10,4
3. AF IEX	62,0	0,15	1,660	0,09	9,1	0,42	1,6
4. AF HIC (h)	5,5	0,10	1,230	0,08	0,5	0,39	0,1
5. AF (I) IEX (h)	4,2	2,86	0,084	34,02	12,0	163,48	2,1
AF (II) IEX (h)	3,3	1,64	0,063	26,06	5,4	125,21	1,0
AF (III) IEX (h)	4,0	0,74	0,024	30,87	3,0	148,33	0,5
AF (IV) IEX (h)	2,8	0,67	0,007	96,24	1,9	462,43	0,3

In several steps glycerol, that has a stabilizing effect on the protein could not be added, because it troubles the hydrophobic interaction chromatography, the hydrolase activity was not optimal stabilized all the time. This is one reason for the purification factors lower than 1.

The purified enzyme was characterized. It has a pH optimum of 8 and an temperature optimum of 40°C. L(+)-tartaric acid is formed with an ee value of >99% at 30°C. The inhibition of the enzyme by sodium chloride and sodium tungstate was determined. The protein band at app. 34 kD was blotted and the N-terminal amino acids were determined. After an digestion with Trypsin and chromatographic separation of the peptide fragments parts of the internal protein sequence was

determined. These peptide sequences were used for a database search and in the US patent database an epoxide hydrolase sequence from *R. rhodochrous* LMPG-18079 was found that showed a high similarity to the peptide fragments from *R. ruber* DSM44319 (Fig. 1). The hydrolase from *R. rhodochrous* LMPG-18079 showed also hydrolytic activity towards *cis*-2,3-oxirane dicarboxylic acid.^{20,21}

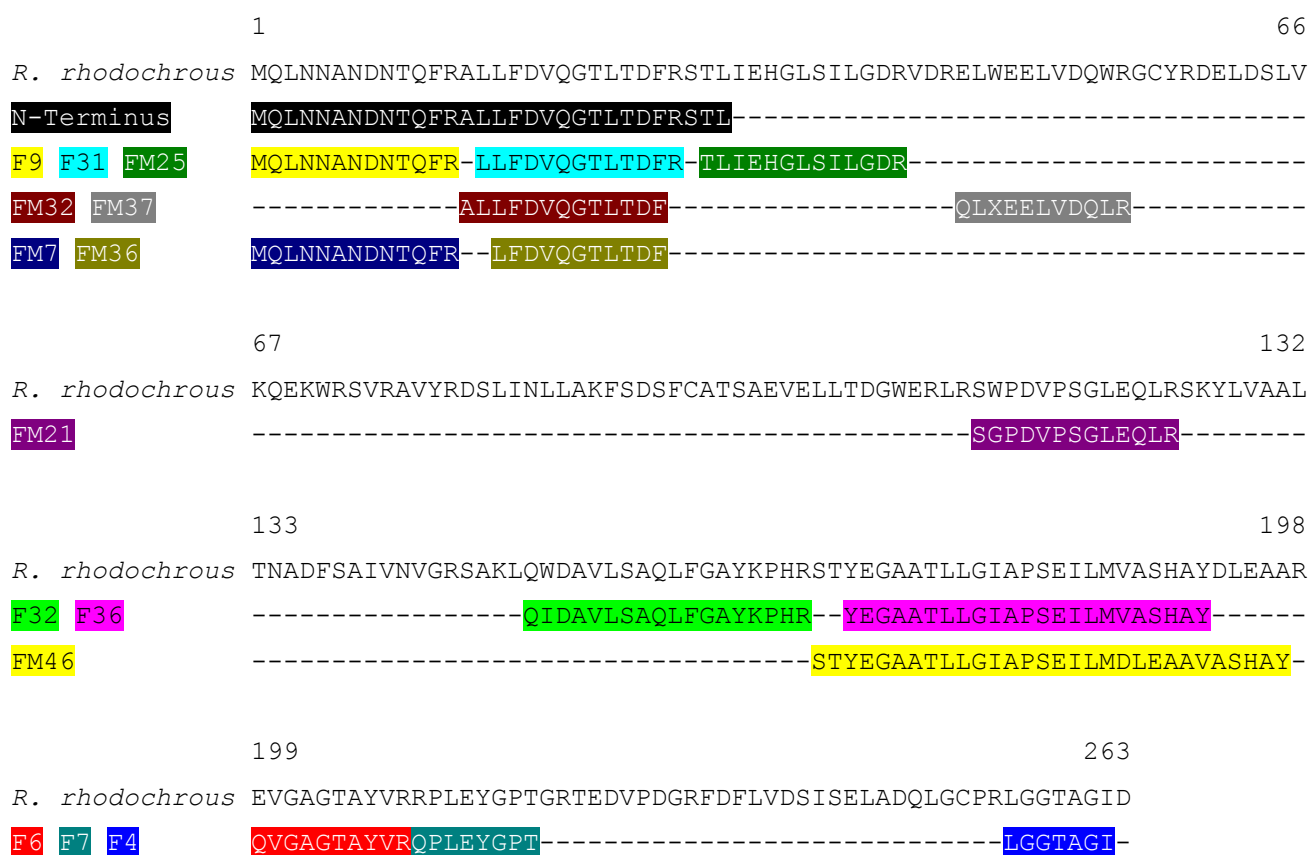


Fig. 11: Alignment of the peptide sequences of the hydrolase from *R. ruber* DSM44319 to the epoxide hydrolase sequence from *R. rhodochrous* LMPG-18079.^{20,21}

The investigation of the gene encoding for the protein showed that both genes from *R. rhodochrous* LMPG-18079 and from *R. ruber* DSM44319 are the same.

Protein alignments of complete Sequence of the hydrolase from *R. ruber* DSM44319 with known epoxide hydrolases showed that the hydrolase from *R. ruber* DSM44319 is not an epoxide hydrolase of a known type. The catalytic triade and proton donor were not conserved. The comparison of the protein sequence with protein sequences of haloacid dehalogenases (Fig. 12) gives the evidence that the investigated hydrolase is more likely to a haloacid dehalogenase than

to an epoxide hydrolase, although the function seems to prove that the hydrolase ins an epoxide hydrolase.

```

RR  MQLNNANDNTQFRALLFDVQGTLDTDFRSTLIEHGLSILGDRVDRELWEELVDQWRGQCYRD
XA  -----MIKAVVFDAYGTLFDVQS-----VADATERAYPGRGEYITQVWR-QKQL

RR  ELDSLVK-QEKWRSVRAVYRDSLINLLAKFSDSFCATSAEVELLTDGWERLRSWPDVPSG
XA  EYSWLRALMGRYADFWGVTREALAYTLGLG--LEPDESFLADMAQAYNRLTPYPDAAQC

RR  LEQLRSKYLVAALTNADFSAINVNGRS AKLQ--WDAVLSAQLFGAYKPHRSTYEGAATLL
XA  LAEL-APLKRAILSNGAPDMLQALVANAGLTDSFDAVISVDAKR VFKPHPDSYALVEEVL

RR  GIAPSEILMVASHAYDLEAAREVGAGTAYVR-LEYGPT-----GRTE
XA  GVTPAEVLFVSNNGFDVGGAKNFGFSVARVARLSQEALARELVSGTIAPLTMFKALRMRE

RR  DVPDGRFDFLVDSISELADQLGCPRLGGTAGID
XA  ETYAEAPDFVVPALGDL PRLVVRGMAG AHLPAV

```

Fig. 12: Protein alignment of the sequence from *R. ruber* DSM44319 (RR) with the protein sequence of the haloacid dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus*^{22,23} (XA). The nucleophilic residue is marked red, amino acids of the halo claw are marked yellow, amino acids of the oxianion hole and the substrate binding amino acids are marked blue and green.

A Einleitung

1 Epoxidhydrolasen

Optisch reine Epoxide sind wichtige Bausteine in der organischen Synthese. Verschiedene Wege zur Darstellung optisch reiner Epoxide wurden deshalb entwickelt. Zur asymmetrischen Synthese von Epoxiden wird von einer prochiralen Verbindung ausgegangen. Dabei gelangt man durch Verwendung eines chiralen Reagenz (Einsatz einer chiralen Persäure, eines chiralen Dioxiranes bzw. Oxaziridines oder eines chiralen Borates), eines chiralen Auxiliars oder eines chiralen Katalysators (metallisch oder nichtmetallisch) zu einem chiralen Epoxid.²⁴ Der bekannteste Weg zur Darstellung chiraler Epoxide ist die Sharpless-Oxidation ausgehend von Allylalkoholen zu den entsprechenden chiralen Glycidolen.²⁵ Eine weitere Methode ist das Verfahren nach Jacobsen und Katsuki, bei dem Übergangsmetallkatalysatoren verwendet werden. Hier beträgt der Enantiomerenüberschuss für *geminal*- und *trans*-substituierte Epoxide jedoch unter 60% *ee*.²⁶ Die direkte, stereospezifische Epoxidierung von Alkenen durch Monooxygenasen (P450-Systeme) ist ebenfalls bekannt, allerdings sind die Umsätze gering und die Enzyme benötigen einen Kofaktor.^{24,27-29}

Aus diesem Grund stellt die Racematspaltung mit Epoxidhydrolasen (EH) einen interessanten Zugang zu enantiomerenreinen Epoxiden und den entsprechenden Diolen dar.^{11,24,30-33} Epoxidhydrolasen bilden die Enzymklasse EC 3.3.2.3 und katalysieren die regio- und enantiospezifische Hydrolyse von Epoxiden. Dabei wird die Etherbindung in Epoxiden gespalten und es kommt zur Bildung von *vicinalen* Diolen. Die Reaktion verläuft über eine S_N2-spezifische Ringöffnung des Epoxids zum entsprechenden *trans*-konfigurierten 1,2-Diol (Abb. A.1).

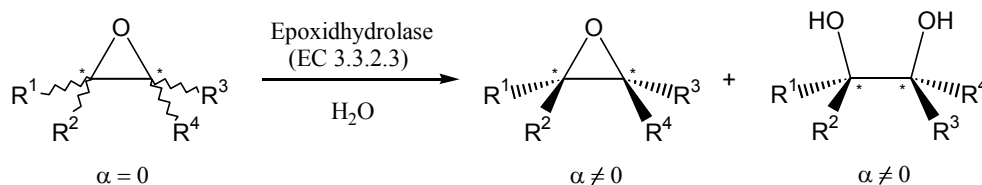


Abb. A.1: Hydrolyse eines Epoxids zu einem *vicinalen* Diol katalysiert durch eine Epoxidhydrolase.

Epoxidhydrolasen sind in der Natur allgegenwärtig. Sie wurden in Säugetieren,³⁴ Pflanzen,³⁵ Insekten,³⁶ Hefen,^{3,37} filamentösen Pilzen³⁸⁻⁴¹ und Bakterien^{11,42-51} nachgewiesen. Abgesehen von ihrer Funktion in verschiedenen biosynthetischen Kaskaden stellt der enzymatische Abbau von Epoxiden die wichtigste Funktion dar. Epoxide sind häufige Zwischenprodukte im Stoffwechsel von Xenobiotika und die Oxiranfunktion ist so reaktiv, dass sie mit den verschiedensten biologischen Nucleophilen reagiert. Der Abbau solcher potentiell schädlicher Zwischenprodukte ist daher von großer Wichtigkeit für lebende Zellen. Es scheint, dass Epoxidhydrolasen, zusammen mit Glutathiontransferasen als das Hauptwerkzeug in der Detoxifizierung von Epoxiden zu den wasserlöslicheren und somit leichter auszuscheidenden, Metaboliten (*vicinale* Dirole) angesehen werden können.⁵² Aufgrund der zentralen Rolle im Entgiftungsvorgang sind Epoxidhydrolasen aus Säugetieren in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. In Säugetieren wurden bis jetzt fünf verschiedene Gruppen von Epoxidhydrolasen beschrieben und nach ihrer enzymatischen Aktivität und ihrem biochemischen Verhalten eingeteilt.⁵³ Es gibt lösliche Epoxidhydrolasen (sEH, manchmal auch als cytosolische EH bezeichnet),⁵⁴ mikrosomale Epoxidhydrolasen (mEH),⁵⁵ Leukotriene A₄ Hydrolasen (LTA₄H),⁵⁶ Cholesterolepoxidhydrolasen⁵⁷ und Hepoxilinhydrolasen.⁵⁸ Mehrere Übersichtsartikel wurden zu diesem Thema veröffentlicht.^{4,55} Epoxidhydrolasen aus anderen Organismen sind nicht so eingehend untersucht. Für Epoxidhydrolasen in Pflanzen konnte gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle in der enantioselektiven Biosynthese von Lacton Aromastoffen⁵⁹ und im Aufbau von Cutin, einem Polymer in der Kutikula, spielen.⁶⁰ In Insekten bauen Epoxidhydrolasen die Juvenilhormone⁶¹ oder andere Pheromone mit Oxiranfunktionen ab und sind dadurch Regulatoren der Entwicklung und Fortpflanzung. Die beiden am besten untersuchten Klassen von Epoxidhydrolasen, die löslichen bzw. mikrosomalen Epoxidhydrolasen aus Säugetieren haben verschiedene Substratspezifitäten und Verteilungen in der Zelle und werden durch unterschiedliche Verbindungen induziert.⁶² Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von löslichen Epoxidhydrolasen und mikrosomalen Epoxidhydrolasen zeigt eine entfernte aber eindeutige phylogenetische Verwandtschaft zwischen den beiden Enzymgruppen.³³ Weiterhin zeigt ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von Epoxidhydrolasen, Halogen-carbonsäure Dehalogenasen (EC 3.8.1.2) und Halogenalkan Dehalogenasen (EC 3.8.1.5), dass alle diese hydrolytischen Enzyme in dieselbe Familie der α/β -Hydrolasen gehören.^{33,63}

Der Mechanismus der Oxiranringöffnung (s. Abb. A.2) durch eine Epoxidhydrolase verläuft über den Angriff eines nukleophilen Carboxylatrestes am Ring. Die Carboxylatfunktion wird in der

Regel von der Aminosäure Aspartat in seltenen Fällen auch von einem Glutamatrest gestellt. Das Sauerstoffatom des Oxiranringes wird durch einen Tyrosinrest protoniert. Dies führt zur Bildung eines α -Hydroxyesterintermediats, welches kovalent am aktiven Zentrum des Enzyms gebunden ist. Im nächsten Schritt erfolgt der nukleophile Angriff eines Wassermoleküls am Carbonylkohlenstoff des Nucleophils, das durch ein benachbartes Histidin aktiviert ist. Es kommt zur Freisetzung des Diols und zur Regeneration des Enzyms.⁵⁻⁷ Dieser Reaktionsmechanismus wurde durch Hydrolysereaktionen unter Verwendung von ^{18}O -markiertem Enzym in nicht markiertem Wasser, bzw. Hydrolysereaktionen mit nicht markiertem Enzym und ^{18}O -markiertem Wasser nach Analyse der Isotopenverteilung in den gebildeten Produkten untermauert.^{5,6} Für die cytosolische Epoxidhydrolase der Ratte wurde eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Asp333, Asp495 und His523⁸ und für die mEH aus Asp226, Asp352 und His431 angenommen.⁹ Allerdings wurde kürzlich gefunden, dass nicht Asp352, sondern Glu404 an der katalytischen Triade beteiligt ist, wobei der Austausch von Glu404 gegen Asp zu einer starken Umsatzsteigerung führte.¹⁰

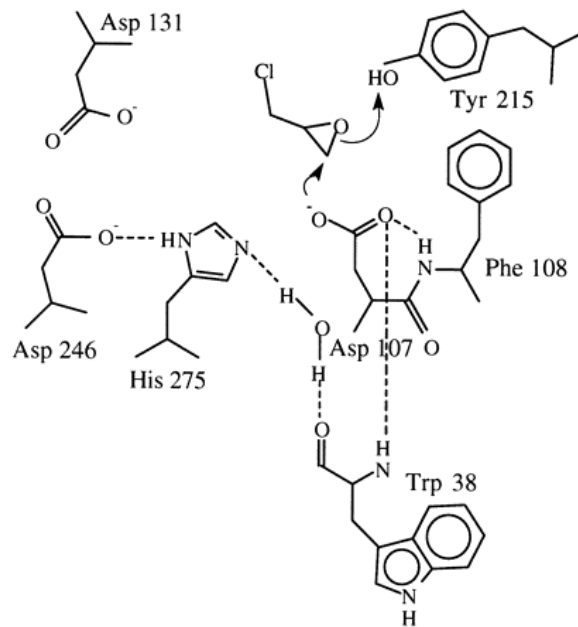


Abb. A.2: Reaktionsmechanismus der Epoxidhydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1.¹²

Die Strukturen der drei bis heute aufgeklärten Epoxidhydrolasen aus *Agrobacterium radiobacter* AD1,¹² *Mus Musculus*¹³ und *Aspergillus niger* LCP521¹⁴ beweisen ebenfalls diesen Hydrolysemechanismus. Ein Aminosäuresequenzvergleich der Epoxidhydrolasen (s. Abb. C.26) aus *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, *Mus musculus*, *Bacillus subtilis* 168, *Agrobacterium*

radiobacter AD1 und *Oryctolagus cuniculus* zeigen, dass die katalytische Triade und das für den Protonentransfer verantwortliche Tyrosin in allen Epoxidhydrolasen konserviert ist.⁶⁴ Die enzymatische Hydrolyse von terminalen Epoxiden verläuft meistens über den Angriff eines Nucleophils am sterisch weniger gehindertem Kohlenstoffatom, was zu einer Retention der Konfiguration führt oder, im selteneren Fall, über einen Angriff am Stereozentrum unter Inversion der Konfiguration (Abb. A.3).¹¹

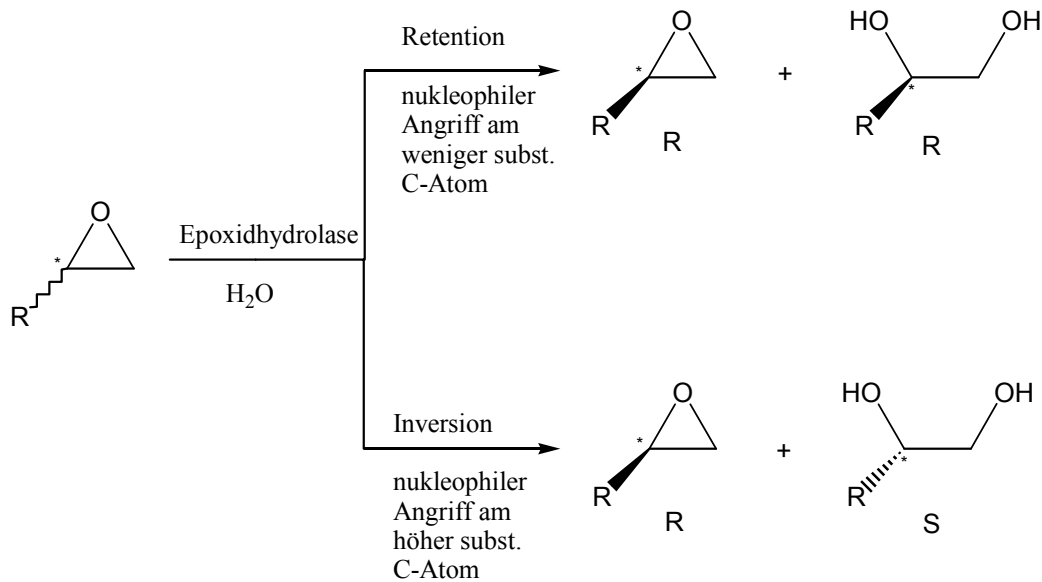


Abb. A.3: Enzymatische Epoxidhydrolyse unter Retention oder Inversion der Konfiguration.

Die erste Anwendung einer Epoxidhydrolase katalysierten Hydrolyse wurde 1969 beschrieben. Dabei wird die Darstellung von L(+)- und *meso*-Weinsäure mit einer Epoxidhydrolase aus einem *Pseudomonas putida* Stamm und einer Epoxidvorstufe beschrieben.⁶⁵ Bellucci *et al.* haben das synthetische Potential von Epoxidhydrolasen aus Säugern in den letzten Jahren untersucht und konnten zeigen, dass eine Vielzahl von Substraten, darunter racemische und prochirale aromatische so wie auch racemische aliphatische Epoxide, erfolgreich umgesetzt werden können. Diese Umsetzungen führen zu enantiomerenreinen, angereicherten Epoxiden und/oder zu den korrespondierenden *vicinalen* Diolen.⁶⁶⁻⁶⁸ Interessanterweise wird im Falle der *cis*- β -alkyl-substituierten Styroloxide jedes der beiden Enantiomere mit gegensätzlicher Regioselektivität angegriffen. Damit kommt es fast ausschließlich zur Bildung von (1*R*,2*R*) Diolen.⁶⁹

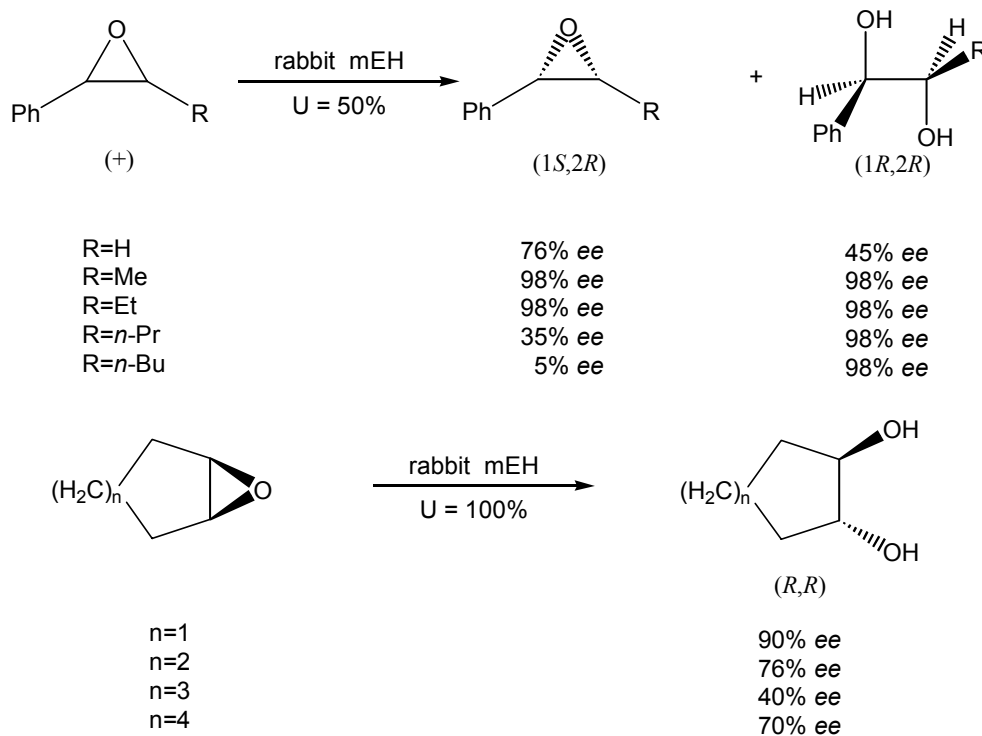


Abb. A.4: Enantioselective Hydrolyse von racemischen Epoxiden und stereoselective Hydrolyse von *meso*-Epoxiden.⁶⁶⁻⁶⁸

Obwohl einige interessante Biotransformationen mit diesen Epoxidhydrolasen durchgeführt wurden können Epoxidhydrolasen aus Säugern aufgrund der schlechten Verfügbarkeit nur in analytischen Maßstab verwendet werden.

Für Epoxidhydrolasen aus Mikroorganismen gilt diese Einschränkung in der Regel nicht. Viele Mikroorganismen mit Epoxidhydrolaseaktivität werden in der Literatur beschrieben. Niehaus und Schroepfer konnten eine enantioselective Hydrolyse von *cis*- und *trans*-9,10-Epoxystearinsäure mit *Pseudomonas* sp. durchführen.⁷⁰ Michaels *et al.* beobachteten die Hydrolyse von Epoxypalmitat durch *Bacillus megaterium*.⁷¹ De Bont *et al.*,⁷² Escoffier und Prome,⁷³ Jacobs *et al.*⁷⁴ und Nakamura *et al.*⁷⁵ beschrieben alle die enzymatische Hydrolyse von entweder kurzkettigen Epoxiden oder Epoxysteroiden mit *Nocardia* sp., *Mycobacterium aureum*, *Pseudomonas* sp. und *Corynebacterium* sp. Stämmen. Ähnliche Ergebnisse sind von einigen Pilzen beschrieben worden.⁷⁶ Der Durchbruch für den Einsatz von Epoxidhydrolasen in der Synthese von Feinchemikalien war die Beobachtung, dass sowohl Bakterien als auch Pilze sehr gut als Katalysatoren für die Auflösung von racemischen Epoxiden verwendet werden können, da diese einfach und praktisch unbegrenzt zu Verfügung stehen. Die Arbeitsgruppe Faber untersuchte die Enzympräparation SP409 aus *Rhodococcus* sp. von Novo auf ihre Hydrolyseaktivi-

täten. Dabei wurde entdeckt, dass neben Nitrilen mit dieser Enzympräparation auch eine Vielzahl von mono- und 1,1-disubstituierten Epoxiden mit moderaten Enantioselektivitäten hydrolysiert werden konnten.¹¹ Weitere Experimente mit 2-Alkyl-substituierten Epoxiden zeigten, dass die Unterscheidung zwischen den Enantiomeren von der Größe der beiden Alkylgruppen abhängt (s. Tab. A.1).⁷⁷ Durch zusätzliche Suche in Alken abbauenden Bakterien fand man weitere Bakterien mit Epoxidhydrolaseaktivität.⁴³ Eines davon, *Nocardia* EH1, zeigt eine hohe Enantioselektivität für 2-Methyl-1,2-epoxyheptan. Damit kann das enantiomerenreine *R*-Diol und *S*-Epoxid hergestellt werden. Auch mit anderen Nucleophilen als Wasser kann der Oxiranring gespalten werden. Die Zugabe von Azid zur Reaktionslösung führte stereoselektiv zu 1,2-Azidoalkoholen (s. Abb. A.5).⁴⁹

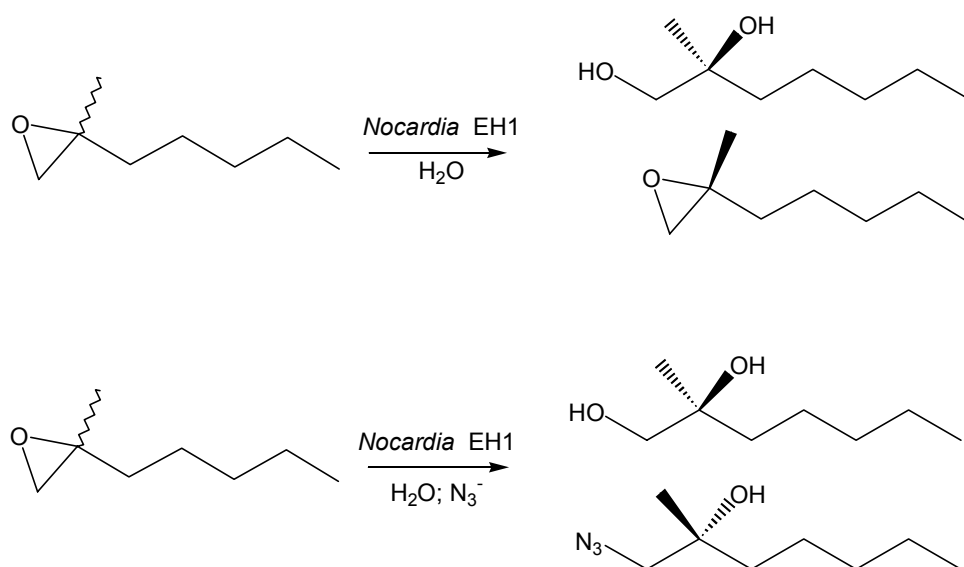
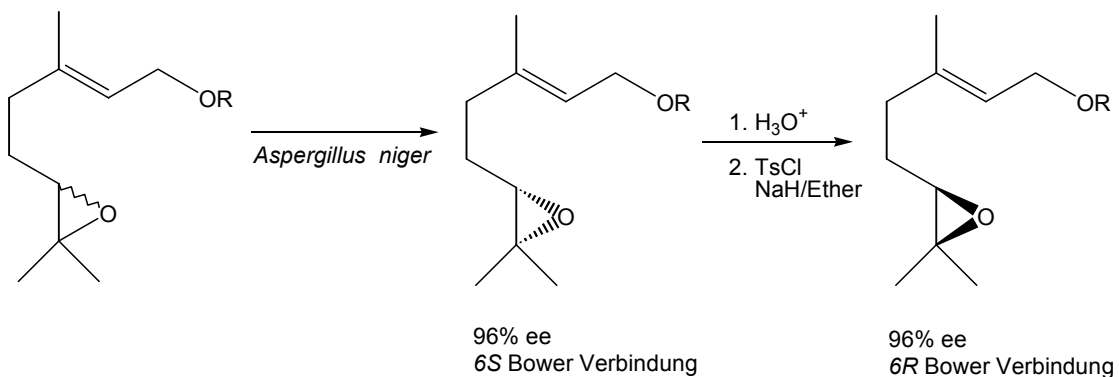


Abb. A.5: Epoxidspaltung mit *Nocardia* EH1. Ringöffnung mit einem Azidnucleophil zum 1,2-Azidoalkohol.

Die Synthese von *S*-Frontalin, einem Pheromon des Pinienkäfers, wurde mit einem *ee*-Wert von 94 % durchgeführt. Dabei wurde die vorletzte Stufe mit einer Epoxidhydrolase stereochemisch angereichert (s. Abb. A.7).⁵⁰ Die bevorzugten Substrate für bakterielle Epoxidhydrolasen sind meist aliphatische Epoxide. Das gilt nicht für Epoxidhydrolasen aus Pilzen. Mit der Epoxidhydrolase aus *Aspergillus niger* LCP521 ist es möglich beide Enantiomere der Bower Verbindung (*ee* > 96%) herzustellen. Die Bower Verbindung ist ein potentes Analogon zum Juvenilhormon von Insekten. Dabei zeigt die 6*R* Bower Verbindung 10-fach höhere Aktivität als Juvenilhormon des gelben Mehlwurms *Tenebrio molitor* als die 6*S* Bower Verbindung.⁷⁸ Die Synthese ist in Abb. A.6 dargestellt.

Tab. A.1: Bakterielle Epoxidhydrolasen: enantioselective Hydrolyse von racemischen Epoxiden.

R ₁	R ₂	Bakterium	E-Wert
H	C ₆ H ₁₃	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 11216	~3
H	CH ₂ -O-CH ₂ -Ph	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 11216	~1
CH ₃	C ₅ H ₁₁	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 11216	105
CH ₃	C ₇ H ₁₅	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 11216	125
CH ₃	C ₉ H ₁₉	<i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 11216	>200
CH ₃	C ₅ H ₁₁	<i>Rhodococcus equi</i> IFO 3730	194
CH ₃	C ₅ H ₁₁	<i>Mycobacterium paraffinicum</i> NCIMB 10420	49
CH ₃	C ₇ H ₁₅	<i>Rhodococcus equi</i> IFO 3730	>200
CH ₃	C ₇ H ₁₅	<i>Mycobacterium paraffinicum</i> NCIMB 10420	>200
CH ₃	C ₉ H ₁₉	<i>Rhodococcus equi</i> IFO 3730	>200
CH ₃	C ₉ H ₁₉	<i>Mycobacterium paraffinicum</i> NCIMB 10420	>200
CH ₃	(CH ₂) ₃ -CH=CH ₂	<i>Rhodococcus equi</i> IFO 3730	39
CH ₃	CH ₂ -O-CH ₂ -Ph	<i>Mycobacterium paraffinicum</i> NCIMB 10420	>200

**Abb. A.6:** Synthese des *R*- und *S*-Enantiomers der Bower Verbindung mit *Aspergillus niger* LCP521.⁷⁸

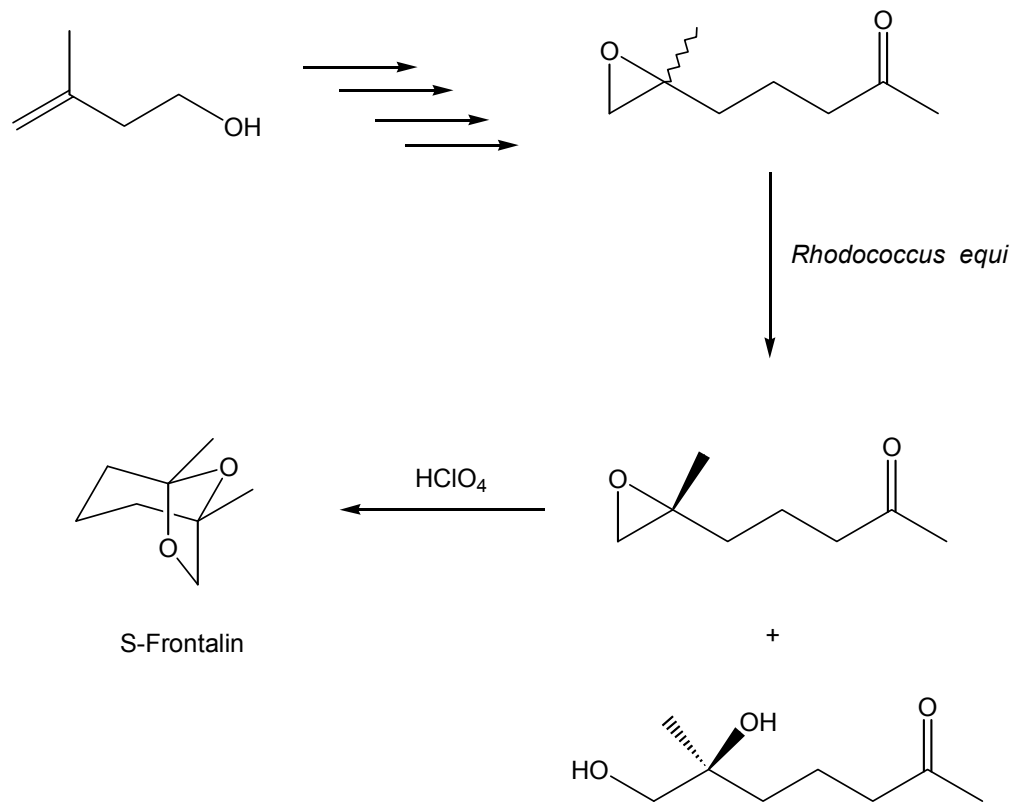


Abb. A.7: Synthese von S-Frontalin.^{50,79}

Als weitere Beispiele für Epoxidhydrolasen aus Bakterien und Pilzen sind folgende Bakterienstämme mit Epoxidhydrolaseaktivität zu nennen: *Rhodococcus* sp. NCIMB11216,^{42,44,47,77} *Rhodococcus equi* IFO3730,⁵⁰ *Rhodococcus ruber* DSM43338,⁴³ *Mycobacterium paraffinicum* NCIMB10420,⁴³ *Corynebacterium* sp. UPT9,⁴⁵ *Corynebacterium* sp. C12,⁶⁴ *Agrobacterium radiobacter* AD1,^{74,80,81} *Chryseomonas luteola*⁸² und *Nocardia* sp. (EH1, H8, TB1).^{51,83-86} Einige der bakteriellen Epoxidhydrolasen, wie z. B. die Epoxidhydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1, wurden aufgereinigt. Das die Epoxidhydrolase kodierende Gen wurde bestimmt, sequenziert und in *E. coli* überexprimiert. Das Enzym besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDa und die katalytische Triade besteht aus den Aminosäuren Asp107, His275 und Asp246 (Abb. A.2).^{80,81} Die Epoxidhydrolase aus *Corynebacterium* sp. C12 wurde ebenfalls aufgereinigt. Sie ist ein Multimer (wahrscheinlich Tetramer) und jede Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 32 kDa. Das für die Epoxidhydrolase kodierende Gen wurde sequenziert. Ein Sequenzvergleich zeigte eine hohe Homologie zu verschiedenen Säugetier- und pflanzlichen Epoxidhydrolasen, aber auch zu Dehalogenasen und einer Esterase aus *Pseudomonas fluorescens*.⁶⁴ Die Epoxidhydrolase aus *Nocardia* sp. EH1 wurde nach einer vierstufigen Aufreinigung rein erhalten.

Sie ist ein Monomer und besitzt ein Molekulargewicht von 34 kDa, ein pH-Optimum bei pH 8-9 und ein Temperaturoptimum bei 35-40°C. Das aufgereinigte Enzym zeigt eine geringere Stabilität als in ganzen Zellen. Der Zusatz von Tween 80 oder Triton X-100 führte zu einer Stabilisierung des Enzyms.⁸⁵ In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wird eine Epoxidhydrolase aus *Rhodococcus erythropolis* DCL14 beschrieben, die über ein Wachstumsscreening in Gegenwart eines Monoterpens gefunden wurde und Limonen-1,2-epoxid enantioselektiv spaltet. Diese Epoxidhydrolase besitzt nur ein sehr begrenztes Substratspektrum. Das Enzym wurde aufgereinigt: es scheint einer neuen Klasse von Epoxidhydrolasen anzugehören. Die Molekularmasse beträgt nur 17 kDa. Deshalb wird angenommen, dass sie nicht zu den Enzymen mit α/β -Hydrolasefaltung gehört, da hierzu mindestens eine Molekularmasse von ca. 25 kDa notwendig ist.⁸⁷

Auch aus verschiedenen Hefen sind Epoxidhydrolasen bekannt. Hier ist z. B. die Hefe *Rhodotorula glutinis* zu nennen, welche eine Vielzahl von aryl-, alkyl- und alicyclischen Epoxiden mit hoher Enantioselektivität umsetzen kann.^{3,37,88} Einige untersuchte Reaktionen sind in Abb. A.8 zu finden. Weitere Epoxidhydrolasen sind aus *Rhodotorula araucariae* CBS6031 und *Rhodospiridium torulooides* CBS0349 bekannt.⁸²

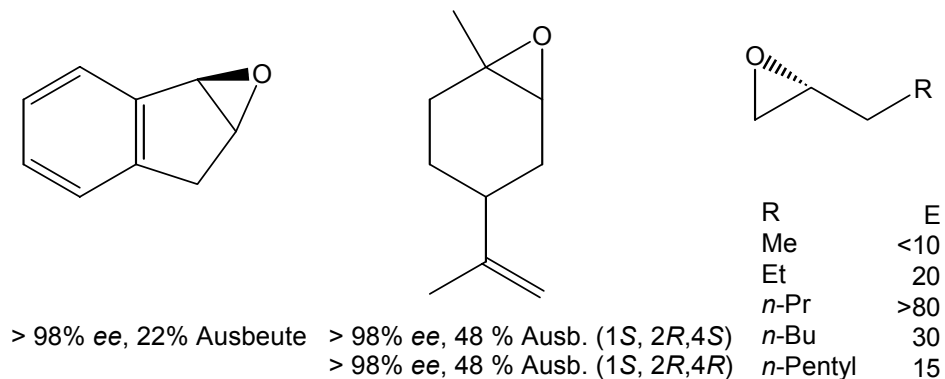


Abb. A.8: Beispiele für Racematspaltungen mit *Rhodotorula glutinis*.

2 Paradigmenwechsel in der Biotechnologie

Der Fortschritt in der Biotechnologie wird durch die Suche und Entdeckung von technisch anwendbarer Biologie bestimmt. Dieser Prozess beginnt üblicherweise mit einer Zusammenstellung von geeignetem biologischen Material, gefolgt von einer Durchmusterung des Materials nach den

gewünschten Eigenschaften. Aus der Trefferliste wird dann der oder die Beste ausgesucht und damit ein technischer Prozess entwickelt, der zu einem Produkt führt. Das Konzept der technisch anwendbaren Biologie war und ist immer noch gültig und bleibt das grundlegende Denkmuster der industriellen Biotechnologie überhaupt. Die wissenschaftlichen und technologischen Fortschritte der letzten 10 Jahre haben jedoch den Zugang zu anwendbarer Biologie stark verändert. Das geht soweit, dass die bisherigen Suchstrategien neu bewertet und oftmals durch neue Strategien ersetzt werden müssen.⁸⁹

Der Wechsel der Strategie ist so grundlegend, dass der Begriff „Paradigmenwechsel“ angebracht erscheint. Der Begriff Paradigma wird immer häufiger und oft willkürlich, in verschiedensten Zusammenhängen, verwendet. Thomas Kuhns verstand unter diesem Begriff: „die ganze Konstellation aus Vorstellungen, Werten, Techniken usw., die von einer gegebenen Gruppe geteilt werden“⁹⁰ und die diese wissenschaftliche Gruppe definiert und von anderen abgrenzt. In den Jahren danach wurden dem Begriff Paradigma noch zusätzliche Bedeutungen hinzugefügt: „Die Axiome, Annahmen oder andere grundlegende Dinge, die es uns ermöglichen eine „aussagekräftige“ Ordnung zu erstellen. Es ist wie eine Karte der Wirklichkeit, nicht wie die Wirklichkeit selbst, aber die Ordnung die uns hilft den Weg zu finden. Daher steht der Begriff zum einen für diejenigen Experimente oder Prozeduren, welche jedes Mitglied der wissenschaftlichen Gruppe als notwendige Methode zur Qualitätssicherung der wissenschaftlichen Arbeit, anerkennt. Zum andern ist der Begriff weiter gefasst und steht im Zusammenhang mit dem Vorstellungssystem oder der Karte der Wirklichkeit: „die Linse durch die man sieht“.⁹¹ Mit einer praktischeren Herangehensweise kann der Begriff Paradigma als „feste theoretische Grundlagen, die erfolgreich mit den empirischen Werten in Einklang gebracht werden können und die wichtige Probleme gelöst haben“ definiert werden.⁹² Das bedeutet, dass für einen Paradigmenwechsel eine grundlegende Neuorientierung der Methodik nötig ist, so dass alte Fragen mit neuen Lösungsansätzen angegangen werden können. Der Paradigmenwechsel in der Biotechnologie kann als Übergang von der traditionellen Biologie zur Bioinformatik bezeichnet werden.⁸⁹

Die Suchstrategie der traditionellen Biologie basiert auf Stammsammlungen, systematischen Untersuchungen und Experimenten, mit denen das Wissen systematisch organisiert und Konzepte erstellt werden können. Die Resultate dieses Vorgehens können durch die beschwerliche Entdeckung der Antibiotika und später die Entwicklung der Enzyminhibitionstests gezeigt werden.⁹³

Die Suchstrategie der Bioinformatik basiert auf dem Sammeln und Aufbewahren von Daten und das sogenannte „Data mining“, d. h. Bereitstellung und Einbindung von Datenbanken um Wissen

(das Verständnis für die Relevanz eines Themenkomplexes) zu erzeugen.⁹⁴ Die Suchstrategie der Bioinformatik wird durch einige Faktoren begünstigt: a) technologischer Fortschritt in z. B. Computertechnik, Labortechnik etc.; b) Druck zur Verringerung der Entwicklungskosten; c) Bedarf nach kürzeren Entwicklungszyklen usw.⁸⁹ Bis zum heutigen Zeitpunkt sind Datenbanken mit Informationen über DNA (Genome), RNA, Proteinsequenzen, Proteomen, Strukturen, Biotransformationen und Metabolomen angelegt.

Als Genomik wird das Sequenzieren von Genomen und die Ableitung von theoretischer Information aus der Analyse dieser Sequenzen mit verschiedenen bioinformatischen Methoden bezeichnet. Verbesserungen der DNA Sequenzieretechnologie ermöglichen seit einigen Jahren die Sequenzierung von Genomen im großen Stil.⁹⁵ Viele verschiedene Strategien mit unterschiedlichsten Zeit- und Kostenstrukturen sind möglich. Sequenzieraten von bis zu 23 Mb pro Monat, wie z. B. in „Human genome project“, können erreicht werden.⁹⁶ In der TIGR CMR (<http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/CMRGenomes.spl>) sind bis dato 106 Genome von Prokaryonten komplett und ein weiteres teilweise sequenziert.

Zusätzlich zur Sequenzieretechnik wird durch die Bioinformatik eine große Palette an Werkzeugen bereitgestellt um die erhaltenen Daten zu analysieren. Alle diese „tools“ dienen dazu Gene und die Funktionen ihrer Genprodukte zu identifizieren. Das bekannteste „tool“ ist das Programm BLAST. BLAST ist frei erhältlich und gibt die Möglichkeit schnell und einfach Gene und deren Funktionen, durch Sequenzvergleich auf DNA- oder Proteinebene, zu erkennen. Viele andere „tools“ mit den unterschiedlichsten Vor- und Nachteilen sind bekannt. *Nucleic Acids Research* widmet diesem Thema sogar eine eigene Ausgabe, die sich nur mit den für die Molekular-Biologie relevanten Datenbanken und Analysewerkzeugen beschäftigt. Alle Tätigkeiten auf diesem Gebiet führten bis heute zu über 30.000 neuer Gene.⁹⁷

Die detaillierten Eigenschaften der auf diese Weise erhaltenen Gene können durch die Sequenzanalyse nicht abgeleitet werden,⁹⁷ die funktionelle Expression dieser Gene bleibt also zwingend nötig um ihre Eigenschaften zu bestimmen.

Gegenüber der klassischen Vorgehensweise, von der beobachteten Funktion eines Organismus zum rekombinanten Biokatalysator, bietet der „neue“ Zugang, über die Sequenzierung von Genomen oder Metagenomen, trotz allem einige Vorteile. Hier kann gleichzeitig nach verschiedensten Funktionen gesucht werden und vor allem sind auch Gene von Organismen erfassbar, die nur schwer oder gar nicht kultivierbar sind.⁹⁸ Nachteil ist, dass die Substrate und die Eigen-

schaften der heterolog exprimierten Genprodukte meist nicht bekannt sind und so der Erfolg oder besser die Gründe für den Misserfolg der Experimente nicht eingeschränkt werden kann.

3 Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität

Um Epoxidhydrolaseaktivität nachzuweisen und um die Enantioselektivität der Epoxidhydrolase zu bestimmen sind verschiedene Methoden aus der Literatur bekannt. Die Nachweise der Aktivität bzw. Selektivität beruhen auf:

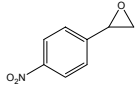
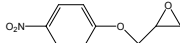
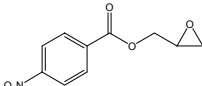
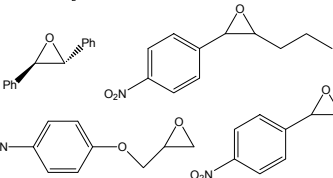
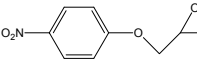
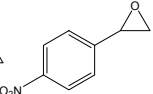
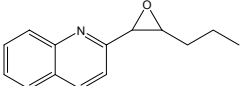
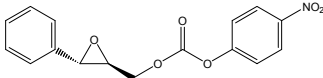
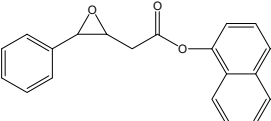
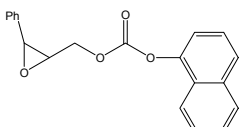
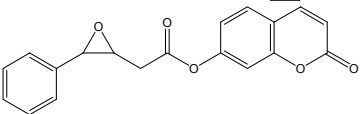
- Kapillargaschromatographie an chiralen Phasen (chirale GC),^{42,77,99-104}
- Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC),^{68,69,100,104-112}
- Spektrophotometrie (UV/VIS¹¹³⁻¹¹⁶ oder Fluoreszenz^{113,117-121}).

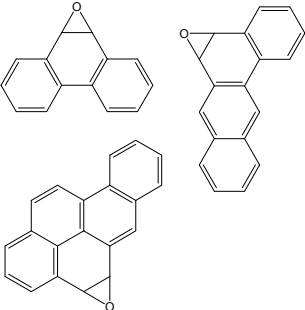
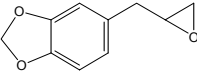
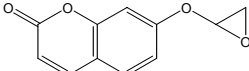
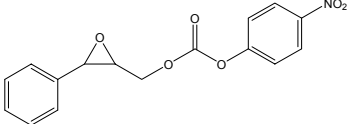
HPLC- und GC-Methoden sind wegen der großen Anzahl von anfallenden Proben und ihrer Aufarbeitung zeitaufwendig und deshalb für hohen Durchsatz nicht geeignet. Interessanter erscheinen deshalb Nachweisverfahren, die es erlauben, in einer Bibliothek direkt in Mikrotiterplatten oder auf Agarplatten die Epoxidhydrolaseaktivität nachzuweisen. Spektrophotometrische Methoden sind aufgrund ihrer Einfachheit und der geringen Messzeit am besten für eine Automatisierung geeignet. Diese bieten auch den Vorteil der Möglichkeit einer raschen Quantifizierung der Enzymaktivität durch Messung einer Enzymkinetik. Die meisten Assaysysteme für Epoxidhydrolasen beruhen auf der Messung der Abnahme der Absorption im UV-Bereich bei der Hydrolyse. In den bekannten Systemen sind die Absorptionskoeffizienten oft klein und geringe Aktivitätsunterschiede deshalb nicht messbar, vor allem unter dem Aspekt, dass im Zellaufschluss eine Vielzahl anderer in diesem Wellenlängenbereich ebenfalls absorbierender Substanzen enthalten sind.^{105,114,115} Einige Assaysysteme sind zusammen mit den untersuchten Epoxidhydrolaseklassen in Tab. A.2 aufgeführt.

Ein weiteres generelles Testprinzip ist die Freisetzung eines Chromophors bzw. Fluorophors nach der Spaltung des Oxiranringes zum Diol. Ein Beispiel für die Freisetzung eines Chromophors ist die Verbindung (2*S*,3*S*)- und (2*R*,3*R*)-4-Nitrophenyl-2,3-epoxy-3-phenyl-propyl-carbonat ((*S*)- bzw. (*R*)-NEPC). Diese Substrate besitzen zwei funktionelle Gruppen, eine Epoxidfunktion und eine Carbonatfunktion. Diese beiden funktionellen Gruppen sind so positioniert, dass bei der Hydrolyse des Epoxids eine spontane Zyklisierung zu einem fünf oder sechs gliedrigen Carbonat stattfinden kann. Dabei wird *p*-Nitrophenol als Chromophor abgespalten, welches photometrisch bestimmt wird und damit als Reporter benutzt werden kann. Das zyklische Carbonat reagiert

dann, unter Abspaltung von Kohlendioxid, zu einem Triol weiter. Allerdings ist bei der Verwendung von NEPC zu beachten, dass die Carbonatfunktion auch durch Lipasen und Esterasen, als auch durch Glutathion-*S*-transferasen gespalten werden kann. Der NEPC-Assay kann deshalb nur für aufgereinigte Epoxidhydrolasen oder für Präparationen ohne andere hydrolytische Aktivitäten verwendet werden. Der NEPC-Test ist nur sensitiv gegenüber cytosolischen Epoxidhydrolasen, gegenüber mikrosomalen Epoxidhydrolasen wurde nur eine geringe Enzymaktivität gefunden.¹¹³

Tab. A.2: Beispiele für Epoxidhydrolasesubstrate die mit spektroskopischen Methoden nachgewiesen werden können.

Verbindung	Epoxidhydrolase	Verfahren	Literatur
	mEH	HPLC	100
	mEH	HPLC	105,114
	mEH	Fluoreszenz HPLC	106
	cEH	UV/VIS (Absorptions- abnahme)	121
			
			
			
	cEH	UV/VIS HPLC	113
	cEH	Freisetzung von 1-Naphtol und Reaktion mit Fast Red RR:	von 113
		Nachweis der Aduktbildung (UV/VIS)	
	cEH	Fluoreszenz von Umbelliferon	113

	mEH	UV/VIS Fluoreszenz	118,120
	mEH	UV/VIS	57
	mEH	Fluoreszenz, Diol nicht isolierbar*, Darstellung des Epoxids über P450-System	117,119
	cEH	UV/VIS Freisetzung von p-Nitrophenol (auch von ande- ren hydroly- tischen Enzymen freigesetzt)	113

* Halbwertszeit in Wasser 5 min, stabil in org. LM

Ein Beispiel für die Freisetzung eines Fluorophors ist die Verwendung von 7-Oxiranyloxychromen-2-on. Hier wird nach der Spaltung des Oxiranringes das entstehende Halbacetal hydrolysiert und Umbelliferon freigesetzt. Umbelliferon kann dann durch seine Fluoreszenz nachgewiesen werden.¹¹³ Die Nachteile dieses Testsystems ist die Instabilität des Epoxides in Wasser (Halbwertszeit 5 min) und die schlechte Verfügbarkeit des 7-Oxiranyloxychromen-2-ons. Die Instabilität konnte von Reymond *et al.* durch die Verwendung von 7-(2-Oxiranyl-ethoxy)-3,8a-dihydrochromen-2-on gelöst werden. Das nach der Hydrolyse des Oxiranringes vorliegende Diol wird mit NaIO_4 gespalten und der resultierende Aldehyd erfährt eine spontane β -Eliminierung und es wird Umbelliferon gebildet.¹²² Das Reaktionsschema ist in Abb. A.9 dargestellt.

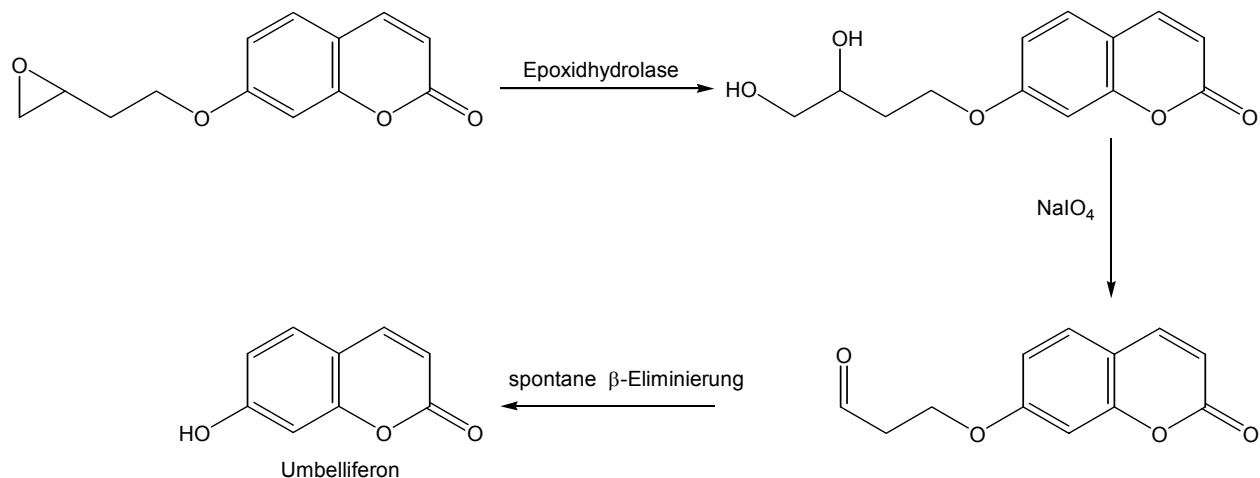


Abb. A.9: Nachweis der Epoxidhydrolaseaktivität durch Freisetzung von Umbelliferon aus 7-(2-Oxiranyl-ethoxy)-3,8a-dihydro-chromen-2-on nach Periodatspaltung.

Alle bisher beschriebenen Testsysteme zum Nachweis der Epoxidhydrolaseaktivität haben den gemeinsamen Nachteil, dass die Aktivitätsmessung nur mit einem bestimmten Substrat durchgeführt werden kann. Für die Charakterisierung der Epoxidhydrolaseaktivität gegenüber anderer Epoxide sind diese Methoden deshalb nicht geeignet.

Ein Lösungsansatz zur Charakterisierung der Epoxidhydrolaseaktivität gegenüber vieler verschiedener Epoxide ist der Nachweis von nicht umgesetzten Epoxid mit 4-(*p*-Nitrobenzyl)-pyridin. 4-(*p*-Nitrobenzyl)-pyridin reagiert mit alkylierenden Substanzen, wie z. B. Epoxiden zu einem blauen wasserunlöslichen Farbstoff.^{81,123-132} Ein Hauptnachteil dieses Testsystems liegt in der Wasserunlöslichkeit des gebildeten Farbstoffes. Um die Bildung photometrisch zu erfassen muss mit organischen Kosolventien bis zu 50 % (V/V) gearbeitet werden. Der zweite grundlegende Nachteil dieses Verfahrens ist, dass dabei die Epoxidhydrolaseaktivität durch das verbleibende Substrat, d. h. im Rückschluss, bestimmt wird. Die Bildung anderer Produkte als *vicinale* Diole durch die reaktiven Epoxide wird fälschlicherweise als Epoxidhydrolaseaktivität angezeigt. Der vielversprechendste Ansatz für einen Epoxidhydrolaseaktivitätstest wurde vor kurzem von Reymond *et al.* beschrieben.¹³³ Dabei wird das in der Enzymreaktion gebildete *vicinale* Diol mit Natriumperodat versetzt. Dadurch wird das *vicinale* Diol in zwei Aldehyde, bzw. Ketone gespalten und Periodat zu Iodat reduziert. Das überschüssige Periodat wird dann mit L-Adrenalin zurücktitriert. L-Adrenalin reagiert mit Periodat zu farbigen Adrenochrom, welches dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt werden kann (Abb. A.10).

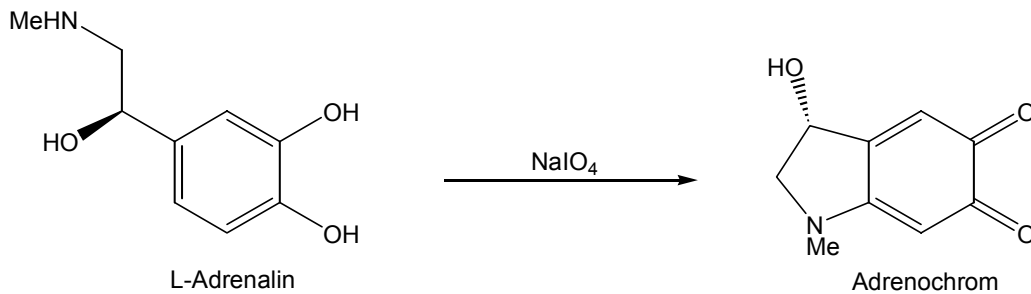


Abb. A.10: Oxidation von L-Adrenalin zu Adrenochrom mit Natriumperiodat.

Da hier der Nachweis über den Verbrauch von Natriumperiodat geführt wird, besteht die Möglichkeit die Epoxidhydrolaseaktivität für jedes denkbare Epoxid in Form einer Endpunktbestimmung durchzuführen. Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass Natriumperiodat auch durch andere Bestandteile der Enzymlösung zu Natriumiodat reduziert werden kann und so eine zu hohe Epoxidhydrolaseaktivität vortäuschen kann, was unter Umständen die Verwendung von aufgereinigten, bzw. angereinigten Enzymlösungen notwendig macht.

4 Rhodococci

Die actinomyceten Gattung *Rhodococcus* ist aus verschiedenen Gründen interessant. Viele Rhodococci Spezies sind in der Lage eine ganze Vielfalt umweltverschmutzender Substanzen abzubauen oder Verbindungen, die für viele Anwendungen nutzbar sind, aufzubauen. *Rhodococci* sind aerobe, Gram-positive, unbewegliche, mycolathaltige nocardioforme Actinomyceten.¹³⁴ Der Ausdruck „nocardioform“ beschreibt die Morphologie und bezieht sich auf ein mycelartiges Wachstum mit Aufbrechen in stäbchenförmige oder kokkoide Elemente.¹³⁵ Zur Zeit gibt es 12 etablierte Rhodococci Spezies, nämlich *R. coprophilus*, *R. equi*, *R. fascians*, *R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. marinonascens*, *R. opacus*, *R. percolatus*, *R. rhodnii*, *R. rhodochrous*, *R. ruber* und *R. zopfii*.¹³⁶ 16S rDNA und DNA-DNA Reassoziierungsexperimente zeigen, dass die Gattung *Rhodococcus* eine ziemlich divergente Gattung ist, die sich in fünf Äste aufteilt.¹³⁷ Der erste Ast enthält *R. erythropolis*, *R. globerulus*, *R. marinonascens* und *R. opacus*, der zweite enthält *R. rhodochrous*, *R. ruber* und *R. coprophilus*, während *R. rhodnii*, *R. fascians* und *R. equi* je auf ihrem eigenen, getrennten Ast im phylogenetischen Baum liegen. Rhodococci wurden aus den verschiedensten Quellen isoliert, wie z. B. Böden, Steinen, Bohrlöchern, Grundwasser, Meeres-sedimenten, Tierkot, Insekteninnereien, gesunde und kranke Tiere und Pflanzen.^{134,138}

Rhodococci verursachen Krankheiten bei Pflanzen und Tieren. Die Bedeutung von Infektionen durch Rhodococci beim Menschen wächst, sowohl in der Zahl der auftretenden Infektionen, als auch der Zahl der Fälle, die als solche erkannt werden.^{139,140} *R. equi* ist der wichtigste humanpathogene *Rhodococcus*, der meistens bei immunsuppressiven Patienten auftritt.¹⁴¹⁻¹⁴⁵ Die häufigste beim Menschen ausgelöste Krankheit ist die Lungenentzündung oder Abszesse in der Lunge. Gezeigte Symptome sind in der Regel Fieber, Husten und Brustschmerzen.^{139,146} Es werden auch sehr seltene Fälle von anderen pathogenen Rhodococci berichtet, aber sie sind von untergeordneter Bedeutung.¹⁴⁷ *R. equi* ist nicht zwingend pathogen, Takai *et al.* fanden avirulente Stämme in japanischen Bodenproben.¹⁴⁸

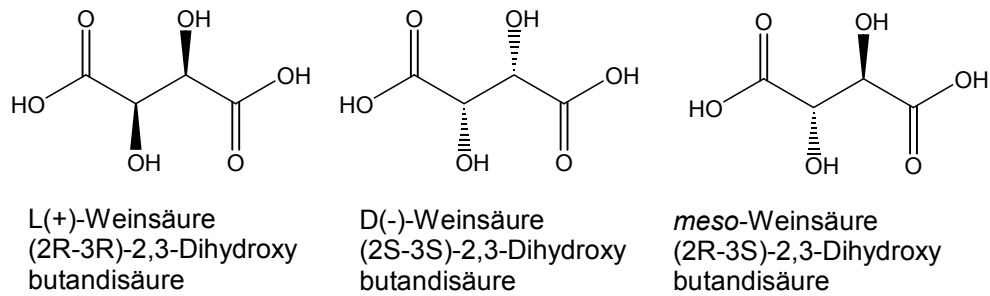
Das wirtschaftliche Potential der *Rhodococcus* Spezies wird zunehmend erkannt. Die große Bandbreite von Verbindungen, die von Rhodococci entweder umgesetzt oder abgebaut werden machen sie zu nützlichen, bzw. potenziell nützlichen Mikroorganismen in der Biotechnologie. Sie haben die Fähigkeit mehrere Produkte herzustellen, wie z. B. Tenside, Flockungsmittel, Amide und Polymere.¹³⁶ Dieses wachsende Interesse ist direkt an den eingereichten Patenten ablesbar. Finnerty¹⁴⁰ berichtet von 10 Patenten über Rhodococci bis 1990, Warhurst und Fewson¹⁴⁹ berichten von 20 zusätzlich eingereichten Patenten in den folgenden zwei Jahren, während von 1993 bis 1996 weitere 80 Patente am World Patent Index eingereicht wurden. Der wichtigste biotechnologische Prozess mit einem *Rhodococcus* ist die Synthese von Acrylamid aus Acetonitril mit *R. rhodochrous* J1 von Nitto Chemistry Industry Company Ltd (Japan) mit einem Volumen von 30000 t/a.¹⁵⁰ Dies ist das erste, erfolgreiche Beispiel für einen biotechnologischen Prozess zur Herstellung eines chemischen Massenproduktes. Verschiedene andere Amide wie z. B. die Vitamine Nicotinamid und *p*-Aminobenzoesäure und die antimycobacteriell wirksamen Substanzen iso-Nicotinsäureydrizin und Pyrazinamid können mit der Nitrilase aus *R. rhodochrous* J1 produziert werden.^{150,151} Die Produktion von Poly(3-hydroxyalkan)säuren kann mit *R. ruber* durchgeführt werden.¹⁵² Der Kopolyester aus 3-Hydroxybutyrat und 3-Hydroxyvalerate ist ein biologisch abbaubares Polymer, das unter dem Markennamen BIOPOL von Zeneca Bio Products mit dem Bakterium *Alcaigenes eutrophus* hergestellt wird.¹⁵³ *R. ruber* kann ein ähnliches Kopolymer produzieren und hat dabei den Vorteil auf billigeren Medien zu wachsen. Wie diese Beispiele und die wachsende Zahl der neuen Patente zeigt, wird voraussichtlich die Zahl der Applikationen der Gattung *Rhodococcus* in der Biotechnologie in den kommenden Jahren steigen.

5 Weinsäure

Weinsäure ist die einfachste Dicarbonsäure gemischt mit einem *vicinalen* Diol (s. Abb. A.11). Es gibt drei Stereoisomere, L(+)-Weinsäure, D(-)-Weinsäure und *meso*-Weinsäure. Optisch aktive Formen sind nur L(+)- bzw. D(-)-Weinsäure, *meso*-Weinsäure ist aufgrund einer intramolekularen Spiegelebene prochiral. L(+)-Weinsäure hat eine Molekularmasse von $M_r = 150,09$ g/mol und kristallisiert aus wässriger Lösung in Form von großen, farblosen Nadeln mit einer Dichte von 1,7568 g/ml und einem Schmelzpunkt von 169 – 170°C. Der farblose Feststoff hat einen stark saueren Geschmack und zersetzt sich ab einer Temperatur über 220°C zu einer karamellartigen Substanz. L(+)-Weinsäure ist sehr gut in Wasser, gut in Ethanol und schlecht in Diethylether löslich (s. Tab. A.3). Die Wasserlöslichkeit ist stark Temperaturabhängig (s. Tab. A.4). Alle hier beschriebenen Eigenschaften gelten sowohl für reine L(+)- wie D(-)-Weinsäure, eine Übersicht der physikalischen Eigenschaften der Weinsäure Stereoisomere ist in Tab. A.3 dargestellt.

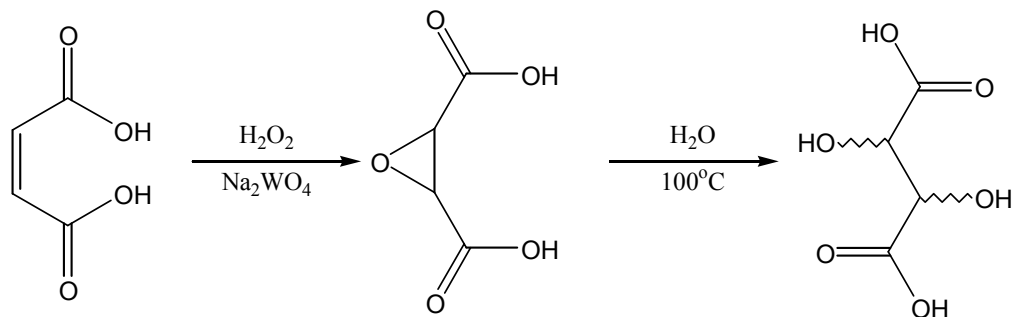
Tab. A.3: Physikalische Eigenschaften der Weinsäure Isomere.¹⁵⁴

	L(+)-,D(-)-Weinsäure	DL-Weinsäure	meso-Weinsäure
Kristallform	monokline Prismen	trikline Prismen	tetragonale Platten
Dichte in g/ml	1,7598	1,788	1,666
Schmelzpunkt in °C	169 – 170	206	159 – 160
Löslichkeit in g/100 g H ₂ O (25°C)	147	25	167
Löslichkeit in g/100 g Ethanol (25°C)	20,4	5,0	
Löslichkeit in g/100g Diethylether	0,3	1	
Löslichkeit als Kaliumbitartrate in g/100 g H ₂ O (20°C)	0,57	0,56	13,2
Löslichkeit des Calciumsalzes in g/100 g H ₂ O (20°C)	0,026	0,004	0,034
pK _{s1}	2,96	2,96	3,11
pK _{s2}	4,24	4,24	4,8

**Abb. A.11:** Die drei Stereoisomere der Weinsäure.**Tab. A.4:** Temperaturabhängigkeit der Löslichkeit von L(+)- und D(-)-Weinsäure.

T in °C	0	5	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Löslichkeit in g/100 g H ₂ O	115	120	125	139	156	176	195	218	244	273	307	343

Von den drei Weinsäure Isomeren werden nur L(+)-Weinsäure und in geringem Umfang DL-Weinsäure in industriellem Maßstab hergestellt. DL-Weinsäure wird in einem chemischen Verfahren aus Maleinsäure, bzw. ihren Salzen hergestellt.¹⁵⁵ Maleinsäure wird in wässriger Lösung mit 35% Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Natriumwolframat zu *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure epoxidiert, welches dann durch Erhitzen in DL-Weinsäure hydrolysiert wird (s. Abb. A.12). DL-Weinsäure wird zur Zeit kommerziell in kleinem Maßstab in Südafrika nach diesem Verfahren hergestellt.¹⁵⁶

**Abb. A.12:** Darstellung von DL-Weinsäure (Church *et al.*).¹⁵⁵

L(+)-Weinsäure wird in einem Maßstab von 30000 t/a bei Preisen von ~5 €/kg vorwiegend in Spanien, Frankreich und Italien hergestellt. Die Ausgangsmaterialien sind ausschließlich Rückstände aus der Weinerzeugung. Deshalb ist die L(+)-Weinsäure Produktion direkt von den Weinernten abhängig und somit starken jahreszeitlichen Schwankungen ausgesetzt. L(+)-Weinsäure liegt in diesen Rückständen hauptsächlich als Kaliumbitartrat, und in geringerem Umfang als

Calciumtartrat vor. Abhängig vom Kaliumbitartrat Anteil wird in Weinstein, Bodensatz und getrocknetem Bodensatz unterschieden.¹⁵⁷ Alle Prozesse zur Produktion von Weinsäure starten mit der Fällung von Calciumtartrat mit Schwefelsäure. Zwei konkurrierende Verfahren wurden eingesetzt um die Ausgangsstoffe zu Calciumtartrat umzusetzen: Das Scheurer - Kestner Säure Verfahren und das Scheele – Lowitz neutral Verfahren, verbessert durch die Desfosses Variante. Heutzutage wird nur noch die kostengünstigere neutral Variante technisch eingesetzt. Dabei werden die Ausgangsmaterialien gemahlen, getrocknet und danach mit gebranntem Kalk neutralisiert. Durch Zugabe von Calciumchlorid wird die Fällung von Calciumtartrat vervollständigt. Der Niederschlag wird nach Filtration gewaschen und dann mit Schwefelsäure behandelt. Dabei wird Weinsäure gebildet und schwerlösliches Calciumsulfat bleibt zurück. Die Weinsäurelösung wird aufkonzentriert bis sich Weinsäurekristalle bilden. Das Rohprodukt wird wieder in Wasser gelöst und durch Aktivkohlefilter filtriert, worauf das Filtrat dann erneut aufkonzentriert wird bis sich Kristalle bilden. Das Produkt wird danach getrocknet und gemahlen.

Eine Alternativroute ist die biokatalytische Spaltung von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure. Die Darstellung dieser Zwischenstufe ist ebenfalls biokatalytisch unter Einsatz von *Paecilomyces sp.* oder *Aspergillus fumigatus* möglich, allerdings nur in Ausbeuten von 39%.¹⁵⁸ Deshalb ist eine Wolfram- oder Molybdän-katalysierte Reaktion von Maleinsäureanhydrid und Wasserstoffperoxid,¹⁵⁹ anschließende chromatografische Entfernung des Katalysators¹⁶⁰ und biokatalytische Hydrolyse des entstandenen Epoxids zur L(+)-Weinsäure günstiger. Für diese Biotransformation wurden verschiedene Stämme beschrieben (s. Tab. A.5).

Tab. A.5: Verschiedene Stämme oder Enzyme zur Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure.

Stamm	Stammsammlung	g/l(Ausbeute)	Literatur
<i>Achromobacter tartarogenes</i> nov. spec.	Ferm-P2507	155 (91%)	2
<i>Achromobacter epoxylyticus</i> nov. spec.	Ferm-P2508	100 (88%)	
<i>Achromobacter acinus</i> nov. spec.	Ferm-P2509	100 (89%)	
<i>Achromobacter sercatus</i> nov. spec.	Ferm-P2510	96 (86%)	
<i>Alcaligenes epoxylyticus</i> nov. spec.	Ferm-P2511	100 (88%)	
<i>Alcaligenes margaritae</i> nov. spec.	Ferm-P2512	93 (81%)	
<i>Rhizobium validum</i> KB97		432 (99%)	161
<i>Nocardia tartaricans</i> (reklassifiziert <i>Rhodococcus ruber</i>)	ATCC 31191 (Ferm-P2882, DSM 44319)	212 (97%)	1

L(+)-Weinsäure und seine Derivate werden in der Lebensmittel-, Pharmazeutischen- und Wein-erzeugenden-Industrie verwendet.^{154,162,163} Einige Anwendungen sind in Tab. A.6 aufgeführt.

Tab. A.6: Anwendungen von L(+)-Weinsäure und seinen Derivaten.

Weinsäure bzw. Derivate	Anwendung
L(+)-Weinsäure	Ansäuerungsmittel von Most, Süßigkeiten, Bonbons, Konfi- ture, Fruchtsäfte, Eiscreme etc. Konservierungsmittel für Früchte, Obst und Fisch Antioxidationsmittel in Ölen und Fetten Herstellung von kohlenensäurehaltigen Getränken Als Säuerungsmittel in Tabletten In der Zementindustrie als Zusatz zu Gips Metallindustrie beim Reinigen und Polieren von Metallen
Kaliumbitartrat	Beschleunigung der Weinsteinbildung in der Weinindustrie Bestandteil von Laxanzien
Kalium-Natriumtartrat	Galvanisierung Elektronik und Piezoelektronik Herstellung von Silberspiegeln Zigarettenpapier Produktion Bestandteil von Laxanzien
Kaliumantimonyltartrat	Bestandteil von Hustensäften als Schleimlöser Beizemittel in der Lederherstellung
Tartrate von Fettsäure mono- bzw. diglyceride	Emulgator in der Gebäckherstellung

6 Zielsetzung

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten drei putative Epoxidhydrolasen aus *Bacillus subtilis* 168, *Corynebacterium glutamicum* und *Momordica charantia* auf ihr Potential als Biokatalysatoren, zur Darstellung industriell wichtiger chiraler Epoxide und 1,2-Diole, untersucht werden. Dazu musste ein Assaysystem aufgebaut werden, das schnell die Epoxidhydrolaseaktivität mit allen möglichen Substraten bestimmen kann. Mit diesem Test sollten die putativen Epoxidhydrolasen aus *Bacillus subtilis* 168, *Corynebacterium glutamicum* und *Momordica charantia* nach Epoxidhydrolaseaktivität untersucht und das Substratspektrum charakterisiert werden.

L(+)-Weinsäure wird in einem Maßstab von 30000 t/a bei Preisen von 5 €/kg vorwiegend in Spanien, Frankreich und Italien aus Rückständen der Weinerzeugung hergestellt. Die sich daraus ergebenden starken jahreszeitlichen Schwankungen machen einen von Naturstoff unabhängigen Zugang zu L(+)-Weinsäure attraktiv.

Ein interessanter, möglicher Zugang zu L(+)-Weinsäure ist die Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure. Dabei wird das substituierte Oxiran durch eine Epoxidhydrolase stereoselektiv zu L(+)-Weinsäure umgesetzt. *R. ruber* DSM44319 ist in der Lage, sowohl in Form ganzer Zellen, als auch in Form von Zellextrakt *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure zu L(+)-Weinsäure zu hydrolysieren (Abb. C.27).^{1,2}

Das für die Hydrolyse verantwortliche Gen war zu Beginn der Arbeit nicht bekannt und sollte identifiziert und isoliert werden.

B Material und Methoden

1 Material

1.1 Geräte

Agarose-gelelektrophorese	DNA Sub Cell™ Mini Sub™ DNA Cell, Mini Sub™ Cell GT Video Copy Processor P66E BWM 9X Monitor UV-Leuchttisch	BioRad Mitsubishi Javelin Electronics MWG-Biotech
DNA-Sequencer	377 DNA Sequencer	Applied Biosystems
Elektroporation	Gene Pulser®, Pulse Controller	BioRad
Fluorimeter	Fluostar	BMG
Gefriertrockner	Lyovac GT 2	Finn-Aqua
Homogenisator	Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel
Inkubatoren	HT-Inkubator (30°C, 37°C) Certomat R Incubator (42°C) WTE UM 500	Infors AG Braun Binder Memmert
Mikroskop	Axiolab E	Zeiss
Mikrowellengerät	Micro-Chef FM A935	Moulinex
Kugelmühle	MM 2000	Retsch, Haan
Kugelmühle	SCP-100-CMG Desintegrator	Innomed Konsult AB
Objektive	Achroplan 10x/0,25, 40x/0,65, 100x/1,0	Zeiss
PAGE	Minigel-Twin G42 Model 583 Gel Dryer Phast System	Biometra® BioRad Pharmacia
PCR	Mastercycler Gradient DNA Thermocycler Robocycle Gradient 40	Eppendorf Perkin Elmer Stratagene
pH-Meter	Digital pH Meter pH525	WTW
Pickroboter	BioPick	BioRobotics Ltd., Cambridge
Power Suppliers	Power Pac 3000, Power Pac 300, Model 200/2.0 Power Supply	BioRad
Protein Blotter	Trans Blot SD	BioRad
Protein Sequenzierer	491 Protein Sequencer 140 C Microgradient System Power Macintosh 7200/90	Applied Biosystems Applied Biosystems Apple Macintosh
Sonifier	Sonifier 250 Sonorex Super RK 514 H	Branson Bandelin

SpeedVac	Concentrator 5301	Eppendorf
Spektrophotometer	Biochrom 4060	Pharmacia Biotech
UV/VIS	Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Thermomixer	Thermomixer 5436	Eppendorf
Ultrafiltrationssystem	8050 Amicon	Amicon
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen	Basic, MC1 Research RC 210 D Precision Advanced	Sartorius OHAUS.
Wasserbad	Wasserbad B3	Haake-Fisons
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5417 C Eppendorf Zentrifuge 5415 R Eppendorf 5810 R Universal 30 F KR 22 i (Rotor: AK 500-11, 155 mm) G412 Sorvall RC-5B (Rotor: SA 600)	Eppendorf Eppendorf Eppendorf Hettich Jouan Jouan Du Pont Instruments

1.2 Chemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Enzyme (Tab. B.1) von Fluka bezogen.

Tab. B.1: Chemikalien und Enzyme.

Substanz	Hersteller
1 kb extension-Ladder	MBI Fermentas
1 kb-Ladder	MBI Fermentas
1,2-Butandiol	
1,2-Cyclohexandiol	
1,2-Epoxybutan	
1,2-Epoxyhexan	
1,2-Hexandiol	
1,2-Phenylethandiol	
2,3-Butandiol	
2,3-Epoxybutan	
2-Mercaptol	
3-Chlor-1,2-propandiol	
Aceton	
Acrylamid (30 % ((M/V)); 0,7 %((M/V)) Bisacrylamid)	Roth
Agar	
Agar (Bioselect)	Gibco
Agarose	Serva

Ammoniumchlorid	
Ammoniummolybdat	
Ammoniumpersulfat (APS)	
Ammoniumsulfat	
Ammoniumvanadat	
Ampicillin (Na-Salz)	
Bariumchlorid Dihydrat	
Borsäure	
Bromphenolblau	
Calciumchlorid	
Carboxyfluorescein	
Casaminoacids	
Chloramphenicol	
CIAP	MBI Fermentas
<i>cis</i> -Stilbenoxid	
Complete™	Roche
Coomassie Brilliant Blue R250	
Diethylether	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	
dNTPs	MBI Fermentas
Eisen(III)chlorid	
Eisessig	
Epichlorhydrin	
Epoxy cyclohexan	
Ethanol	
Ethidiumbromid	
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	
Glucose	
Glycerin	
Glycerol	
Glycin	
Guanidin/HCl	
Harnstoff	
Hefeextrakt Difco	
HPLC-H ₂ O	
Hydrobenzoin	
Kaliumacetat	
Kaliumchlorid	
Kaliumdihydrogenphosphat	
Kaliumhydrogenphosphat dibasisch	
Kaliumsulfat	

Kanamycin	
Kupferchlorid	
LMP Agarose	
LMW-Standard	Bio-Rad
L-Prolin	
Lysozym	
Maganchlorid	
Magnesiumchlorid	
Magnesiumsulfat	
Maleinsäureanhydrid	
Mangansulfat	
Mannitol	
Methanol	
Mono-Q	Amersham Pharmacia
MOPS	
Natriumacetat	
Natriumborat	
Natriumchlorid	
Natriumdihydrogenphosphat	
Natriumdodecylsulfat	
Natriumhydrogenphosphat	
Natriumhydroxid	
Natriumperiodat	
Natriumsulfat	
Natriumsulfit	
Natriumvanadat	
Natriumwolframat Dihydrat	
N-tris[Hydroxymethyl]methyl-2-aminoethansulfonsäure (TES)	Sigma
Nutrient Broth Powder	Difco
PAGE-Plus 40%	Roth
Pararosanilin	
Pepton	Roth
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene
Phenylsepharose FF	Amersham Pharmacia
Polyethylenglycol 1000	Fluka, Merck, ICN, Roth
Polyethylenglycol 4000	
Polyethylenglycol 6000	
Proteinase K	
Q-Sepharose	Amersham Pharmacia
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
RNaseA	

Rubidiumchlorid	
Saccharose	
Salzsäure (36 %ig)	
Schiffsches Reagenz	
Schwefelsäure (96 %ig)	
Silica Gel	Sigma
Streptomycin	
Styroloxid	
Superdex 200	Amersham Pharmacia
T4-Ligase	MBI Fermentas
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas
Terminationsmix	Applied Biosystems
Tetramethylethylendiamin (EDTA)	
<i>trans</i> -Stilbenoxid	
Trimethylsulfoniumhydroxid (TEMED)	
Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan	
Triton X-100	
Tryptic Soja Broth	
Trypton	Difco
Wasserstoffperoxid (30 %)	
Zinkchlorid	
λ kb-Ladder	MBI Fermentas

1.3 Kommerzielle Kits

Alle verwendeten Kits und die jeweilige Herstellerfirma sind in Tab. B.2 aufgeführt.

Tab. B.2: Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
Spin-Mini-Plasmid-Präparations-Kit	Qiagen GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH
GenElute TM Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
pWEB Cosmid Cloning Kit	Biozym Diagnostik GmbH
BCA-Protein Detection Kit	Perbio Science Deutschland GmbH
Bradford	Bio-Rad Laboratories GmbH
TA Cloning Kit	Stratagene

1.4 Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Verbrauchsmaterialien und die jeweilige Herstellerfirma sind in Tab. B.3 aufgeführt.

Tab. B.3: Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Herstellerfirma
½ Mikro-Einmalplastikküvetten (10 x 4 x 45 mm)	Ratiolab
96 Well MTP, non treated, PP;	Nalgen Nunc International
96 Well MTP, non treated, schwarz, PS;	
Eppendorf-Reaktions-Gefäße 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml, 2.0 ml	Eppendorf
PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Labortechnik
PS MTP 96 well	Greiner Labortechnik
PVDF-Membran	Pall
Sterilfilter, Millex [®] -GS 0.22 µm	Millipore
Slide-A-lyzer	Perbio Science Deutschland GmbH

1.5 Primer

Alle verwendeten Primer wurden bei Sigma-Aldrich bezogen. In Tab. B.4 ist die Nukleotidsequenz und der jeweilige Name aufgeführt.

Tab. B.4: Verwendete Primer.

Name	Sequenz 5' - 3'
MomoF	CGGGATCCATGGACGCGATTGAGCACACCACCGTC
MomoR	GCGGTACCGTTCAGAATTTCTTGATGAAGTCATGG
pETBSF	CGATATCGAATTCAGACGGAGTTAAATGCCAGTTTG
pETBSR	CATAGATCTCGAGTTGGTTCTTAAGATATTCCAAAATC
pETCGF	CGGATCCATGGCCTTTTTTAGCTTTTCGACGTC
pETCGR	CGAATTCAGAAACGTGGTGCGCGGAACCTCTG
pETMOF	GGATAAGGATCCAATGGACGCGATTGAGCAC
pETMOR	GGTTATTCTCGAGGAATTTCTTGATGAAGTC
EHPATf	CAATGCAACTGAACAATGCG
EHPATr1	GATGTCAATCGATAACCGGC
EHPATr2	CGATTGATTGTCTCCCAGC
pQEIII/IV	CGGATAACAATTCACACAG
pQErev	GTTCTGAGGTCATTACTGG
T7P	TAATACGACTCACTATAGGG
T7T	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

1.6 Mikroorganismen und Plasmide

1.6.1 Organismen

Alle für alle Arbeiten verwendeten Stämme sind in Tab. B.5 aufgeführt.

Tab. B.5: Verwendete Mikroorganismen mit relevanten Eigenschaften und Resistenzen.

Stamm	Relevante Eigenschaften	Resistenz	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>DeoR endA1 gyrA96 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁻) <i>recA1 relA1 supE44 thi-1</i> Δ (<i>lacZYA-argFV169</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, F ⁻	Nal ^r	164
<i>E. coli</i> JM110	<i>RpsL</i> (Str ^r) <i>thr leu thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F' <i>traD36 proAB</i> [<i>laql</i> ^q Z Δ M15]	Str ^r	165
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)		166,167
<i>E. coli</i> EPI100 TM	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139 D(ara, leu)</i> 7697 <i>galU galK</i> λ <i>rpsL nupG</i>]		168
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Tet ^r	169
<i>R. ruber</i> DSM44319			DSMZ, Braunschweig
<i>S. antibioticus</i> TÜ4			170

1.6.2 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind zusammen mit den relevanten Genotypen und Resistenz in Tab. B.6 angegeben.

Tab. B.6: Verwendete Plasmide mit Genotypen und Resistenzen.

Plasmid	Merkmale	Resistenz	Referenz bzw. Anbieter
pUC18	P-lacZ, lac Z	Amp ^r	171
pBluescript SK(-)	P-lacZ, lac Z	Amp ^r	Stratagene
pQE-30	P-T5	Amp ^r	Qiagen
pET20b+	P-T7	Amp ^r	Novagen
pWEB	P-T7	Amp ^r	Epicentre, 172
pPCR2.1		Amp ^r	Stratagene

2 Stammhaltung und Kultivierung

2.1 Stammhaltung und Kultivierung von *E. coli* Stämmen

2.1.1 Stammhaltung

Verdünnungsausstriche der Stämme werden auf LB-Agarplatten (Tab. B.7) mit dem entsprechenden Antibiotikum angefertigt. Die Platten werden bei 37°C über Nacht inkubiert und bei ca. 10°C maximal 4 Wochen aufbewahrt. Für die Langzeitlagerung wird 1 Vol. Kultur mit 1 Vol. Glycerol (87 %) versetzt, durch Vortexen homogenisiert und bei – 80°C aufbewahrt.¹⁷³

Tab. B.7: LB-Medium.

Medium	Bestandteile	Anteil
Luria-Bertani-Medium	Trypton	10,0 g/l
(LB-Medium):	Hefeextrakt	5,0 g/l
Nur im Festmedium	NaCl	5,0 g/l
enthalten	Agar	15,0 g/l
		pH 7,5

2.1.2 Kultivierung und Anzuchtbedingungen

Zur Durchführung von Plasmidpräparationen in kleinem Maßstab werden 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum mit einer Einzelkolonie oder 10 µl Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA bzw.

zur Präparation kompetenter Zellen werden 50 ml LB-Medium in 250 ml Erlenmeyerkolben 1:100 angeimpft und im Schüttler bei 37°C bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert.

2.1.3 Messung der Zelldichte

Das Wachstum von *E. coli* wird durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 578 nm gegen Medium verfolgt. Für *E. coli* Kulturen gilt im Bereich OD₅₇₈ von 0 bis 0,3:

$$\text{Zelldichte [Zellen / ml]} = \text{OD}_{578} \times 5 \times 10^8 \times (\text{Zellen / ml}).$$

2.2 Stammhaltung und Kultivierung von *Streptomyces* Stämmen

2.2.1 Stammhaltung von *Streptomyces antibioticus* TÜ4

Zur Stammhaltung werden Streptomyceten auf Platten mit Sporulationsmedium (s.Tab. B.8) bei 30°C inkubiert und nach erfolgter Sporenbildung bei 4°C aufbewahrt. Für die Langzeitlagerung werden die Sporen mit 5 ml 10%iger Saccharoselösung pro Platte abgewaschen (gegebenenfalls werden 0.1% Triton X-100 zur besseren Löslichkeit hinzugefügt) und durch sterile Watte filtriert. Das Filtrat wird zentrifugiert (1000 g, 5 min, 4°C), in 1 ml 50%iger Glycerollösung resuspendiert und bei – 80°C gelagert.

2.2.2 Kultivierung von *Streptomyces antibioticus* TÜ4

Für die Kultivierung im Maßstab von 2-5 ml werden entweder eine homogenisierte Streptomyceten Einzelkolonie oder 20 µl Sporensuspension im Schüttler bei 30°C und 220 rpm 2-3 d kultiviert. Um ein disperses Wachstum zu ermöglichen wird das Reagenzglas zusätzlich mit einer Edelstahlfeder in den Abmessungen 20 mm x 0.3 mm versehen. Für größere Volumina werden mit Schikanen ausgestattete Schüttelkolben verwendet, wobei das Verhältnis des Mediumvolumens zur Größe des Schüttelkolbens 1:10 beträgt. Die Schüttelkolben werden 1:100 aus einer Vorkultur angeimpft und bei 30°C und 220 rpm 2-3 d kultiviert. Die Kultivierung erfolgt in TSB Medium (s. Tab. B.9).

Tab. B.8: Medien und Lösungen für die *Streptomyces*-Kultivierung.

Medium	Bestandteile	Anteil
Sporulationsmedium:	Saccharose	103,0 g
	MgCl ₂ * 7 H ₂ O	10,0 g
	Glucose	5,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	Agar	22,0 g
	TES	2,3 g
	Spurenelemente	2,0 ml
	dH ₂ O	ad 980 ml
	getrennte Zugabe von	
	CaCl ₂ (2,5 M)	20 ml
Spurenelemente:	FeCl ₃	200 mg
	Na ₂ B ₄ O ₇ * 10 H ₂ O	10 mg
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ * 4 H ₂ O	10 mg
	CuCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg
	MgCl ₂ * 4 H ₂ O	10 mg
	ZnCl ₂	40 mg
	ddH ₂ O	ad 1000 ml

Tab. B.9: TSB-Medium.

Medium	Bestandteile	Anteil
TSB:	Tryptic Soy Broth	30,0 g/l

2.3 Stammhaltung und Kultivierung von *Rhodococcus ruber* DSM44319

2.3.1 Stammhaltung von *Rhodococcus ruber* DSM44319

Verdünnungsausstriche von *R. ruber* DSM44319 werden auf LB-Agarplatten angefertigt. Die Platten werden bei 30°C 3 d inkubiert und bei ca. 10°C maximal 4 Wochen aufbewahrt. Für die

Langzeitlagerung wird 1 Vol. Kultur mit 1 Vol. Glycerol (87 %) versetzt, durch Vortexen homogenisiert und bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2 Kultivierung von *Rhodococcus ruber* DSM44319

50 ml TSB-Medium werden in einem 250 ml Schüttelkolben mit einer Einzelkolonie von *R. ruber* angeimpft und 2 d bei 30°C , 180 rpm kultiviert. Mit 5 ml dieser Vorkultur werden 500 ml TSB-Medium mit 0,1 % (M/V) *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure (7,5 mM) in einem 2 l Schüttelkolben mit Schikanen angeimpft und 2 – 3 d bei 30°C , 180 rpm kultiviert.

2.4 Automatische Zellvereinzelung mit dem Pickroboter

Um große Bibliotheken durchmustern zu können, müssen die einzelnen Klone in diskrete Reaktionskompartimente, wie z. B. in Mikrotiterplatten, vereinzelt werden.

Der Pickroboter BioPick nimmt über eine CCD-Kamera das Bild einer Agarplatte auf und erfasst mittels eines Bilderkennungssystems dabei die Lage einzelner Kolonien, welche dann von einer Nadel gepickt und in mit LB-Medium gefüllte Mikrotiterplatten überführt werden. Die Parameter wurden der Anzahl der Kolonien und ihrem Durchmesser angepasst.

2.5 Induktion und Expression

2.5.1 Induktion und Expression von pET20b+ Konstrukten in *E. coli* BL21(DE3)

50 – 100 ml LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin werden 1:100 aus einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer Zelldichte von 0,6 bis 0,8 bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Danach wird mit einer 1 M IPTG-Lösung 1:1000 induziert (Endkonzentration: 1 mM IPTG). Die Zellen werden weitere 4 h Stunden unter denselben Bedingungen kultiviert und danach geerntet (s. 2.6.1).

2.5.2 Induktion und Expression der Cosmidgenbank in *E. coli* EPI100™

Die in einer MTP gelagerte Cosmidgenbank wird mit einem 96 Nadel Replikator in eine frische MTP mit 200 μl LB-Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin als Selektionsmarker kopiert. Die Mikrotiterplatten werden dann bei 37°C und 220 rpm 20 h inkubiert und danach aufgeschlossen (s. 2.6.3) und auf hydrolytische Aktivität gegen *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure getestet (s. 10.4).

2.5.3 Induktion und Expression der Cosmid Genbank in *E. coli* BL21(DE3)

Die in einer MTP gelagerte Cosmid Genbank wird mit einem 96 Nadel Replikator in eine neue MTP mit 200 µl LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin als Selektionsmarker kopiert. Die Mikrotiterplatten werden dann bei 37°C und 220 rpm bis zu einer OD₅₆₀ von 0,3 inkubiert. Dann wird mit 100 mM IPTG-Lösung 1:100 induziert (Endkonzentration: 1 mM IPTG) und über Nacht bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Dann wird weiter vorgegangen wie in Kap. 2.5.2.

2.6 Zellaufschluss und Zellernte

2.6.1 Zellernte

Zellen aus Kulturen mit einem Volumen bis 50 ml werden mit 3300 g 20 min bei 4°C sedimentiert (Eppendorf 5810 R, Eppendorf) und das erhaltene Zellpellet sofort verwendet oder bei -20°C gelagert. Mit größeren Kulturvolumina wird mit 8000 g 20 min bei 4°C sedimentiert (Sorvall RC-5B, Rotor SA 600, du Pont Instruments) und das Zellpellet in geeignete Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.6.2 Zellaufschluss mit Ultraschall

1 g nasse Zellmasse wird in 10 ml Natriumphosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0) resuspendiert und 3 x 1 min mit jeweils einer Minute Pause auf Eis mit Ultraschall behandelt (80 W, Pulse 35% s⁻¹). Danach wird 20 min bei 3300 g und 4°C zentrifugiert (Eppendorf 5810 R, Eppendorf) um die Zelltrümmer zu entfernen.

2.6.3 Zellaufschluss in Mikrotiterplatten

Die Zellen werden durch Zentrifugation (10 min, 3000 x g, 4°C) sedimentiert (Eppendorf 5810 R, Eppendorf), in 200 µl Lysepuffer (Tab. B.10) resuspendiert und 1 h bei RT inkubiert. Danach wird durch einen Gefrier- (-80°C) Tau- (37°C) Zyklus aufgeschlossen. Die Zellfragmente werden, falls notwendig, anschließend durch Zentrifugation (10 min, 3000 x g, 4°C) abgetrennt.

Tab. B.10: Lysepuffer für den Zellaufschluss in Mikrotiterplatten.

Bestandteil	Menge
Lysozym	100 mg
DNase I (1 U/ μ l)	2 μ l
Complete TM	2 Stück
Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 8)	ad 100 ml

2.6.4 Zellaufschluss in der Kugelmühle

15 g nasse Zellmasse werden in 100 ml Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 8) suspendiert und mit 100 ml Glasperlen (\varnothing : 0,1 – 0,2 mm) in einer Kugelmühle (SCP-100-CMG Desintegrator, Innomed Konsult AB) 20 min bei 5000 rpm unter Eiskühlung aufgeschlossen. Danach wird die Lösung durch Filtration von den Glasperlen befreit und 20 min mit 3000 g bei 4°C zentrifugiert.

2.6.5 Periplasma Aufschluss

Um festzustellen, ob ein gewünschtes Genprodukt als lösliches Protein im Periplasma lokalisiert ist, muss die äußere Zellmembran ohne Schädigung der inneren Membran geöffnet werden. Bei der als „cold osmotic shock“ bezeichneten Methode¹⁷⁴ wird zunächst das Zellpellet in Puffer PA1 (Tab. B.11) aufgenommen (~1 g nasse Zellmasse/10 ml) und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 8000 g, 4°C) und vollständiger Entfernung des Überstandes wird das Pellet in eiskaltem Puffer PA2 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wird die auf diese Weise erhaltene Periplasmafraktion („osmotic shock fluid“) von den übrigen Zellbestandteilen getrennt.

Tab. B.11: Puffer für den „cold osmotic shock“.

Puffer	Bestandteile	Anteil
Puffer PA1:	Tris/HCl	10 mM
	EDTA	1 mM
	Saccharose	20 % (V/V)
		pH 8
Puffer PA2:	MgSO ₄	5 mM

3 Methoden zur Isolierung und Reinigung von DNA

3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3.1.1 Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* für Schnelltests

Mit dieser Methode wird Plasmid-DNA für Anwendungen isoliert, die weder besonders viel noch besonders reine DNA erfordern (z. B. analytischer Restriktionsverdau). Sie beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse.¹⁷⁵ Nach vollständiger Lyse der Zellmembran mit Hilfe von SDS wird die entfaltete RNA durch NaOH und RNaseA hydrolysiert, während die chromosomale DNA und die Plasmid-DNA denaturiert werden. Durch Absenken des pH-Wertes renaturiert die Plasmid-DNA, während die chromosomale DNA ein Netzwerk bildet, das zusammen mit den Proteinen ausfällt und abzentrifugiert werden kann. Die Plasmid-DNA kann anschließend durch Isopropanolfällung konzentriert und gereinigt werden.

1,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wird in einem Eppendorfgefäß 1 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer wird die Lösung nach vorsichtigem Schütteln klar. Nach Zugabe des Neutralisationspuffers und anschließendem Invertieren des Eppendorfgefäßes werden die Proteine und die chromosomale DNA gefällt. Anschließend wird 5 min bei Raumtemperatur und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 420 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 min bei Raumtemperatur wird die Probe 20 min bei 4°C und 14.000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird nochmals mit 200 µl 70 %igem EtOH gewaschen, zentrifugiert und im Vakuum getrocknet. Das Pellet wird in 20 µl TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Tab. B.12: Puffer für die Schnellisolierung von Plasmid-DNA.

Puffer	Bestandteile	Anteil
Resuspensionspuffer:	Tris/HCl (pH 7,5)	100 mM
	EDTA	10 mM
	RNaseI	250 µg/ml
Lysepuffer:	NaOH	0,2 M
	SDS	1,0 % (M/V)
Neutralisierungspuffer:	Kaliumacetat	29,4 g
	Eisessig	11,5 ml
	H ₂ O	28,5 ml
TE-Puffer:	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
		pH 8

3.1.2 Isolierung reiner Plasmid-DNA aus *E. coli* (Spin-Mini)

Die Spin-Mini-Plasmidpräparation wird durchgeführt um bis zu 20 µg sehr reiner Plasmid-DNA zu gewinnen (z. B. für Sequenzierung, PCR). Sie beruht ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Nach Abtrennung der anderen Zellbestandteile wird die Plasmid-DNA über eine Ionenaustauschersäule gereinigt.

2 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* werden 1 Minute bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Spin-Mini-Plasmidpräparation wird mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wird mit 50 µl TE-Puffer eluiert und direkt weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

3.1.3 Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* (Midi)

Um bis zu 100 µg Plasmid-DNA zu isolieren, wird die Midi-Plasmidpräparation eingesetzt. Nach einer alkalischen Lyse erfolgt die Reinigung der DNA über eine Anionenaustauschersäule mit anschließender Isopropanol-Fällung.

50 ml einer Übernachtskultur werden 15 min bei 5000 rpm (Hettich) zentrifugiert. Die Midi-Plasmidpräparation wird mit dem QIAGEN Midi Plasmid Purification Kit nach Angaben des

Herstellers durchgeführt. Die gereinigte DNA wird in 250 µl TE-Puffer aufgenommen und direkt weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

3.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Um DNA-Fragmente einer bestimmten Größe zu isolieren, wird nach der PCR oder dem Restriktionsverdau eine Gelelektrophorese durchgeführt. Nach dem Elektrophoreselauf wird auf einem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell das Agarosestück aus dem Gel geschnitten, welches das gewünschte DNA-Fragment enthält. Hierbei muss schnell gearbeitet werden, da UV-Licht auf DNA als Mutagen wirkt. Zur Isolierung qualitativ hochwertiger DNA wird die Spur mit dem Größenstandard abgetrennt und auf dem UV-Leuchttisch der Größenbereich, der das gewünschte DNA-Fragment enthält, markiert und dann das Gelstück auf der gleichen Höhe ausgeschnitten ohne die Ziel DNA dem UV-Licht auszusetzen. Das ausgeschnittene Gelstück kann nun bei -20°C aufbewahrt oder sofort mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit weiterverarbeitet werden. Diese Methode beruht auf der spezifischen Bindung von DNA an einer Silicagel-Matrix. Die Durchführung der DNA-Extraktion aus dem ausgeschnittenen Agarosestück erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

3.3 Alkoholfällung

Die Alkoholfällung ist eine einfache Möglichkeit zur Konzentrierung oder Reinigung von DNA. Dabei ist eine Fällung der DNA aus wässrigen Lösungen mit Hilfe von Ethanol oder Isopropanol üblich. In Anwesenheit von Alkohol und einwertigen Kationen bildet die DNA bei niedrigen Temperaturen ein Präzipitat, das sich durch Zentrifugieren pelletieren lässt.

3.3.1 DNA- Fällung mit Ethanol

Zu 1 Vol. gelöster DNA werden 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 4,8) und 2,5 Vol. Ethanol (100%; -20°C) gegeben. Durch vortexen wird die Lösung durchmischt und mindestens 20 min bei -20°C gehalten, um die Fällung zu ermöglichen. Nach Zentrifugation (20800 g, 20 min, 4°C) wird das Pellet mit Ethanol (70%, 0°C) gewaschen, nochmals zentrifugiert (20800 g, 5 min, 4°C), bei 60°C im Vakuum getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

3.3.2 DNA- Fällung mit Isopropanol

Diese Methode zur Konzentrierung wurde angewandt, wenn größere Volumina einer DNA-Lösung gefällt werden sollten.

1 Vol. DNA in Lösung wird mit 0,7 Vol. Isopropanol vermischt. Nach mindestens 15 min Fällung bei Raumtemperatur wird zentrifugiert (20800 g, 20 min, 4°C), das Pellet mit Ethanol (70%, 0°C) gewaschen, nochmals zentrifugiert (20800 g, 5 min, 4°C), bei 60°C im Vakuum getrocknet und in TE-Puffer resuspendiert.

3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration kann durch Messung der Absorption einer verdünnten Probe bei 260 nm gegen das Lösungsmittel als Referenz bestimmt werden. Bei Verwendung einer Schichtdicke von 10 mm ergibt sich daraus näherungsweise die Konzentration an DNA nach:

$$\text{doppelsträngige DNA-Moleküle: } c_{\text{dsDNA}} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{einzelsträngige DNA-Moleküle: } c_{\text{ssDNA}} = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 33 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

Durch den Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm kann eine Aussage über die Zusammensetzung und Qualität der isolierten DNA getroffen werden. Für eine reine DNA-Probe gilt:

$$\text{OD}_{260\text{nm}} / \text{OD}_{280\text{nm}} = 1,8$$

3.5 Gesamt-DNA Isolierung aus Bakterien

3.5.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *Rhodococcus ruber* DSM44319

Einer Übernachtskultur von *R. ruber* in TSB (s. Tab. B.9) werden 3 ml entnommen, abzentrifugiert (5 min, 3300 g, 4°C) und das Pellet in 500 µl PBS-Puffer (s. Tab. B.13) resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µl Glasperlen (Ø: 0,75 bis 1 mm) wird das Reaktionsgefäß in der Kugelmühle 30 min geschüttelt (Amplitude 100, Frequenz 1800 min⁻¹). Die Lösung wird von den Perlen abgenommen, zentrifugiert (5 min, 20000 g) und vom Pellet getrennt. Anschließend wird der Überstand mit 150 µl SDS-TE (s. Tab. B.13) versetzt und 5 min auf 65°C erhitzt. Nach Zugabe von 150 µl 5 M Kaliumacetat-Lösung wird der Überstand 30 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 20000 g, 4°C). Zum Überstand werden 200 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5) und 1 ml Isopropanol gegeben. Die DNA wird bei -80°C 10 min gefällt und abzentrifugiert (10 min, 20000 g, 4°C). Die leicht getrocknete DNA wird in

90 µl Wasser aufgenommen und mit 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5) und 200 µl Isopropanol erneut gefällt und abzentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in 100 µl TE-Puffer (s. Tab. B.12) aufgenommen und bei 37°C mindestens 1 h inkubiert.

3.5.2 Gesamt-DNA Isolierung mit Anionenaustauschersäulen (Genomic-tip, Qiagen)

Die Zellen werden 2 Tage in TSB-Medium (s. Tab. B.9) kultiviert. 1 ml der Kultur wird bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 1 ml Puffer B1 (Tab. B.13) unter Zusatz von Lysozym (2 mg/ml) und Proteinase K (0,5 mg/ml) resuspendiert und 30 - 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Glasperlen (Ø: 0,75 bis 1 mm) wird das Reaktionsgefäß in der Kugelmühle 20 min geschüttelt (Amplitude 100, Frequenz 1800 min⁻¹). Anschließend werden 350 µl Puffer B2 (s. Tab. B.13) zugegeben und weitere 30 - 60 min bei 50°C inkubiert. Die Lösung wird von den Perlen abgenommen, zentrifugiert (5 min, 20000 g) und vom Pellet getrennt. Nach Aufschluss und Lyse der Zellen wird die Lösung auf Genomic-tip 100/G Säulen gegeben und zur weiteren Isolierung und Reinigung entsprechend den Angaben des Herstellers vorgegangen. Das DNA-Pellet wird in 200 µl TE-Puffer (s. Tab. B.12) gelöst.

Tab. B.13: Puffer zur Gesamt-DNA Isolierung.

Puffer	Bestandteile	Anteil
Lysepuffer B1:	Tris/HCl (pH 8)	50 mM
	EDTA	50 mM
	Tween [®] -20	0,5 %(V/V)
	Triton [®] X-100	0,5 %(V/V)
Lysepuffer B2:	Guanidin/HCl	3 M
	Tween [®] -20	20 %(V/V)
PBS-Puffer:	Natriumphosphat	50 mM
	NaCl	50 mM
SDS-TE-Puffer:	Tris/HCl (pH 8)	10 mM
	EDTA	1 mM
	SDS	1 %(M/V)

3.6 Charakterisierung von DNA-Molekülen

3.6.1 Restriktionsspaltung von DNA

Die Restriktionsspaltungen werden nach den für jedes Enzym spezifischen vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Pro Spaltungsansatz werden 0,1 bis 10 µg DNA mit 1 bis 8 U Restriktionsenzym behandelt. Durch Zugabe der entsprechenden Menge an 10-fach konzentriertem Spaltungspuffer werden die für jedes Enzym optimalen Salzkonzentrationen eingestellt. Ein gleichzeitiger Verdau mit zwei Enzymen war möglich, wenn beide Enzyme im gleichen Puffer optimale Aktivität besaßen. Die Reaktionsansätze werden in einem Gesamtvolumen von 25 - 50 µl durchgeführt. Die Inkubationszeit der Spaltungsansätze beträgt 1 - 2 h bei der für das jeweilige Enzym empfohlenen optimalen Temperatur. Nach Beendigung der Spaltung erfolgte die Inaktivierung der Restriktionsenzyme durch 10 min Inkubation bei 72°C. Die so erhaltene Plasmid-DNA wird für weitere Klonierungsexperimente präzipitiert oder im Agarosegel elektrophoretisch analysiert.

3.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische oder präparative Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe (Molekulargewicht) erfolgt durch Elektrophorese in einem Agarosegel auf Grund der negativ geladenen Phosphatreste und kann wie jedes elektrisch geladene Makromolekül elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle im angelegten elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle ist von der Porengröße der Matrix (Agarosekonzentration), sowie der Größe und Konformation der DNA-Moleküle abhängig. Um die aufgetrennten DNA-Banden sichtbar zu machen, wird den Agarosegelen Ethidiumbromid zugegeben, welches in die DNA interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert. Hierbei ist zu beachten, dass das positiv geladene Ethidiumbromid entgegengesetzt zur DNA in Richtung der Kathode wandert, und dadurch kleinere DNA-Moleküle bei gleicher Konzentration ein schwächeres Signal geben. Vor dem Auftragen der DNA-Proben werden sie mit Bromphenolblau-Auftragsmix versetzt. Das Glycerin erhöht die Dichte der DNA-Lösung und lässt die Proben in die Taschen absinken. Der Farbstoff dient als Indikator und zeigt die zurückgelegte Laufstrecke im elektrischen Feld an. Die Größe von linear doppelsträngigen Molekülen wurde durch Vergleich mit einem internen Längenstandard bestimmt.^{173,176}

Die Agarose wird durch Aufkochen im Mikrowellengerät in 1 x TAE-Puffer gelöst und bei 70°C aufbewahrt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wird 0,7 %ige (50 kb – 5 kb) oder 1 %ige (< 5 kb) Agarose-Lösung verwendet. Die auf ca. 60°C abgekühlte Agarose-Lösung wird mit 0,01% (V/V) Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammer mit eingesetztem Probenaschenkamm gegossen. Das nach ~15 min polymerisierte Gel wird mit der Gelkammer in die Elektrophoresekammer eingesetzt, mit 1 x TAE-Puffer überschichtet und mit den DNA-Proben beladen. Als Größenstandard wird 1 kb-Ladder verwendet. Die Elektrophorese erfolgt bei 1 %igen analytischen Gelen bei 120 V für 30 min, bei präparativen Gelen bei 100 V für 45 min. Zur Detektion werden die DNA-Banden im Gel auf einem UV-Leuchttisch zur Fluoreszenz angeregt und photographisch dokumentiert.

Große DNA-Fragmente (50 kb – 10 kb) werden ohne Zugabe von Ethidiumbromid 22 h bei 35 V mit Pufferumwälzung aufgetrennt. Als Größenstandard wird λ kb-Ladder verwendet. Zur Detektion wird das Agarosegel nachträglich mit einer 0,1 % (V/V) Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und danach ebenfalls auf einem UV-Leuchttisch photographisch dokumentiert.

Tab. B.14: Puffer für DNA-Isolierung aus Agarose (Qiagen).

Puffer	Bestandteile	Anteil
1 %-Agarosegel:	Agarose	4 g
	1 x TAE	400 ml
0,7 %-Agarosegel:	Agarose	2,8 g
	1 x TAE	400 ml
50 x TAE-Puffer:	Tris	242 g
	Eisessig	57 ml
	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	100 ml
	ddH ₂ O	ad 1000 ml
6 x DNA-Auftragspuffer:	Glycerin	30 % (V/V)
	Bromphenolblau	0,2 % (M/V)
	EDTA	5 mM
		pH 7,5

3.7 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von DNA gibt es viele Methoden. Generell kann man drei unterschiedliche Methoden anwenden. Eine Methode basiert auf chemischen Reaktionen nach Maxam und Gilbert.¹⁷⁷ Diese Technik wird auch als "Chemische DNA-Sequenzierung" oder "Hydrazin-Dimethylsulfat-Methode" bezeichnet. Die beiden anderen Methoden sind enzymatische Methoden. Die klassische Methode nach Sanger,¹⁷⁸ die auch als "Enzymatische DNA-Sequenzierung", "Didesoxy-Sequenzierung" oder "Kettenabbruch-Verfahren" bezeichnet wird, beruht auf der enzymatischen Synthese einer komplementären Kopie des zu sequenzierenden, einzelsträngigen Matrizenstranges.¹⁷⁹ Hierbei werden unterschiedlich lange DNA-Fragmente durch kontrollierte Unterbrechung der Amplifikation mittels spezifischer Terminatoren (2',3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphate, ddNTPs), die zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden zum Reaktionsansatz gegeben werden, erzeugt. Da die ddNTPs an ihrer 3'-Position keine OH-Gruppe besitzen, kann ein entstehendes DNA-Fragment nach dem statistischen Einbau dieses Terminators nicht mehr durch Ausbildung weiterer Phosphodiester-Bindungen zum nächsten anzuhängenden 2'-Desoxyribonukleotid verlängert werden, und es kommt zum Kettenabbruch. In der Praxis werden 4 separate Reaktionen, jede mit einem anderen ddNTP als Terminator angesetzt und anschließend nebeneinander in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese der im Originalprotokoll durch radioaktiv markierte dNTPs sichtbar gemachten, neu synthetisierten Fragmente, kann vom Film des Gels (Autoradiographie) direkt die DNA-Sequenz abgelesen werden. Bei der automatischen DNA-Sequenzierung mit dem 377A-DNA-Sequencer von Applied Biosystems werden die 4 dNTPs mit 4 unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die durch 2 Argonlaser mit Emissionsbanden von 488 und 514 nm angeregt und zusammen in einer Spur des Gels aufgetragen werden.^{180,181} Diese Vierfarbentechnik erhöht sowohl den Durchsatz pro Gel als auch die Geschwindigkeit der Datenerfassung, die bereits während des Gellaufs durch einen angeschlossenen Rechner erfolgt.

Die modernste Methode bedient sich der AmpliTaq®-Polymerase FS und wird als "Cycle Sequencing" bezeichnet. Diese Methode erlaubt die zur PCR¹⁸² analoge zyklische Sequenzierung, bei der die enzymatische Sequenzierung mit einem Primer über mehrere Zyklen durchgeführt wird, was geringere Mengen Ausgangs-DNA erfordert, die Automatisierung vereinfacht und die Sequenzierung doppelsträngiger DNA ermöglicht. Die Ampli-Taq®-Polymerase FS ist ein hitzestabiles Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, wobei FS für Fluoreszenz-Sequenzierung

steht. Es handelt sich bei dieser Form um eine Doppelmutante der Wildtyp AmpliTaq®-Polymerase. Durch eine Mutation (G46D) verliert das Enzym seine 5'-3'-Nuklease-Aktivität. Die zweite Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms (F667Y) führt zu einer Veränderung seiner Akzeptanz gegenüber Didesoxynukleotiden. Diese können damit leichter eingebaut werden.

3.7.1 Giessen des Polyacrylamid-Gels

Um die exakte Erfassung der Fluoreszenzsignale während des Gellaufs zu gewährleisten, werden die Glasplatten vor dem Gießen des Gels gründlich mit einem Detergenz (Alkanox) gewaschen und mit HPLC-H₂O gespült. Danach werden sie mit Isopropanol (p.a.) nachbehandelt und mit einem fusselreifen Zellstofftuch (Kimwipe) trockengerieben. Anschließend werden die Abstandhalter platziert und die Glasplatten zusammengesetzt.

Es wird ein 5,25 %iges PAGE-PLUS Gel eingesetzt, mit dem eine Leseweite von 800 Basen erreicht werden kann.

3.7.2 Ansatz

Die Bestandteile (Tab. B.15) werden durch Rühren und Erwärmen (nicht über 50°C) gelöst und anschließend durch einen 0.2 µm Filter filtriert und entgast. Die Lösung wird in ein Becherglas überführt, 24 µl TEMED und 180 µl Ammoniumpersulfatlösung (10 %) zugegeben, vermischt und anschließend sofort zwischen die durch Spacer getrennten Glasplatten gegossen, der "Vorkamm" eingesetzt und die Platten mit Klammern während der zweistündigen Polymerisationszeit abgedichtet. Anschließend werden die Klammern entfernt, der "Vorkamm" durch einen "Haifischkamm" ersetzt und das Gel in den Sequenzierer eingebaut.

Tab. B.15: Ansatz für ein 50 ml Gel.

	Bestandteil	Anteil
Sequenziergelansatz:	Harnstoff	18,0 g
	40 %ige PAGE-PLUS Lösung	6,6 ml
	5 x TBE-Puffer	5,0 ml
	HPLC-H ₂ O	ad 50 ml
5 x TBE:	Tris	54,0 g
	Borsäure	27,5 g
	EDTA (0,5 M; pH 8,0)	20,0 ml
	ddH ₂ O	ad 1000 ml

3.7.3 Sequenzierungsreaktion

Mit dem Dye Terminator Cycle Sequencing Kit mit AmpliTaq®-DNA-Polymerase wird folgender Reaktionsansatz für die Sequenzierung verwendet (s. Tab. B.16).

Tab. B.16: Zusammensetzung der Sequenzierungsreaktion.

Komponente	Volumen pro Reaktion	Konzentration bzw. Menge
Terminator Ready Reaction Mix	4-8 µl	1 x
Primer	4 µl	4 pmol
DNA	2-6 µl	200 – 500 ng
ddH ₂ O	ad 20 µl	

Die Sequenzierungsreaktion wird in einem Thermocycler (Mastercycler Gradient/Eppendorf) unter den in Tab. B.17 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

Tab. B.17: PCR-Programm für die Sequenzierung.

Programmschritt (Wiederholung)	Denaturierung	Annealing	Extension
1	95°C, 7 min		
2 (25 x)	95°C, 40 sec	55°C, 30 sec	60°C, 4 min
3			60°C, 4 min

3.7.4 Probenaufarbeitung

Zunächst wird der PCR-Ansatz mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt. Die DNA wird durch Zugabe von 10 µl 3 M Na-Acetat und 250 µl 100% EtOH gefällt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Probe 30 min bei 16°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wird das Pellet mit 70% EtOH gewaschen und nochmals 10 min zentrifugiert. Die DNA wird im Eppendorf Concentrator getrocknet und anschließend in 4 µl Formamid/25 mM EDTA (4:1) aufgenommen. Die Proben werden 3 min bei 95°C denaturiert und nach kurzem Zentrifugieren in die Taschen des in das Sequenziergerät eingebauten Polyacrylamidgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt nach den vom Hersteller empfohlenen Programmparametern. Die bereits vom Rechner erfassten und prozessierten Sequenzdaten werden anschließend mittels geeigneter Software ausgewertet.

4 Klonierungsexperimente

4.1 Spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Ziel der PCR Reaktion, beschrieben von Mullis *et al.*,¹⁸² ist die beinahe exponentielle Vermehrung eines bestimmten DNA Moleküls (Template) unter *in vitro* Bedingungen. Dabei wird ein aus drei Reaktionsschritten bestehender Zyklus mehrfach durchlaufen. Der erste Reaktionsschritt besteht in der Denaturierung des doppelsträngigen Templates in die beiden Einzelstränge bei etwa 95°C. In dem zweiten Reaktionsschritt, dem Annealing, lagern sich die Primer an jeweils einen Einzelstrang an. Dieser Schritt verläuft bei einer Temperatur von etwa 45°C–70°C und ist von der Schmelztemperatur des Primer-Template-Adduktes abhängig. Hohe Schmelztemperaturen, wie sie bei der PCR GC-reicher DNA auftreten, können durch Zusatz verschiedener Chemikalien, wie beispielsweise DMSO, verringert werden. Als dritter Schritt erfolgt die Extension bei 72°C, bei der durch Verlängerung der Primer am 3'-Ende durch eine Polymerase zwei komplette Stränge synthetisiert werden. In Tab. B.19 ist die typische Zusammensetzung einer PCR Reaktion und in Tab. B.20 das dazugehörige PCR Programm angegeben.

Tab. B.18: Zusammensetzung des dNTP-Mixes.

dNTP-Mix:	Bestandteile	Anteil
	dATP (100 mM)	2,5 µl
	dCTP (100 mM)	2,5 µl
	dGTP (100 mM)	2,5 µl
	dTTP (100 mM)	2,5 µl
	ddH ₂ O	90,0 µl

Tab. B.19: Pipettierschema einer PCR.

Komponente	Volumen pro Reaktion	Konzentration bzw. Menge
10 x Polymerase Puffer	2,5 µl	1 x
dNTP-Mix	2,0 µl	0,2 mM
Primer A	1,0 µl	10 pmol
Primer B	1,0 µl	10 pmol
Template DNA	1,0 µl	≈ 100 ng
DNA Polymerase (Taq oder Pfu turbo)	1,0 µl	1 oder 2 U
MgCl ₂ (nur Taq)	2,0 µl	2 mM
ddH ₂ O	ad 25,0 µl	

Tab. B.20: PCR Programm.

Programmschritt	Denaturierung	Annealing	Extension
(Wiederholung)			
1	95°C, 3 min		
2 (25 x)	95°C, 1 min	45-70°C, 1 min	72°C, 1 min
3			72°C, 10 min

4.2 Ligation mit Hilfe der T4-DNA-Ligase

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 3'-OH und dem 5'-Phosphat-Ende doppelsträngiger DNA-Moleküle.

Zur Ligation wird in einem Eppendorfgemäß Vektor und Insert-Fragmente im geeigneten Verhältnis gemischt. Hierbei wird beachtet, dass die Insert-DNA im Vergleich zur Vektor-DNA etwa im 3 - 5 fachen Überschuss vorliegt. Man gibt 2 µl Ligase-Puffer (10 x) und 0.5 µl T4-DNA-Ligase zu und füllt auf ein maximales Volumen von 20 µl mit sterilem Wasser auf. Der Ansatz wird 1 h bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 16°C inkubiert.

4.3 Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Eine Dephosphorylierung mittels alkalischer Phosphatase (CIAP) wird dann durchgeführt, wenn eine Religation eines gespaltenen Vektors ohne Insertaufnahme verhindert werden sollte.

Hierzu wird nach Beendigung der Restriktion des Vektors 1 µl alkalische Phosphatase direkt zu diesem Ansatz gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird eine Gelelektrophorese durchgeführt und das gewünschte Fragment über eine Gelextraktion aufgereinigt.

4.4 Cosmidgenbank aus *Rhodococcus ruber* DSM44319

4.4.1 Erzeugung der Cosmidgenbank

Die Cosmidgenbank wird mit dem pWEB™ Cosmid Cloning Kit (Epicentre) erstellt. Dazu wird genomische DNA mechanisch in Stücke von 35 – 40 kb geschert. Danach werden die Enden der DNA-Bruchstücke mit einem Enzymmix aus T4 DNA Polymerase und T4 Polynukleotid Kinase aufgefüllt und dann in den bluntend linearisierten pWEB™ ligiert. Die DNA wird nun in Lambda Phagen Köpfe verpackt und in *E. coli* EPI100™ transduziert.

Mit 20 µg genomischer DNA aus *R. ruber* DSM44319 wird nach Herstellerangaben die „End-Repair Reaction“ durchgeführt. Danach wird die DNA in einem 1%igem niedrig schmelzenden Agarosegel aufgetrennt und der Größenbereich von 35 – 40 kb ausgeschnitten. Das Gelstück wird mit Gelase verdaut und die DNA durch eine Ethanol-fällung aufkonzentriert. Die Ligation wird dann mit ~0,25 µg Insert DNA nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die ligierte DNA wird dann nach Anleitung in die Phagenköpfe verpackt. Zur Transformation wird aus einer *E. coli* EPI100™ Übernachtskultur 50 ml LB-Medium, versetzt mit 10 mM MgSO₄ und 20 %(M/V)

Maltose, 1:100 inokuliert und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1,0 kultiviert. Zu 100 µl dieser Kultur werden 100 µl Phagenextrakt gegeben und 20 min bei RT inkubiert. Dann werden 800 µl LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C regeneriert. Das Ausplattieren auf Selektionsmedium erfolgt wie unter Abschnitt 5.1.2 beschrieben.

4.4.2 Lagerung der Cosmidgenbank

Die Kolonien der Cosmidgenbank werden in 96 Well Mikrotiterplatten mit 220 µl LB-Medium (+5 %(V/V) DMSO, 100 µg/ml Ampicillin) mit dem Pickroboter vereinzelt (s. 2.4). Die Mikrotiterplatte wird dann 20 h bei 37°C inkubiert und danach bei -80°C gelagert. Mikrotiterplatten die aufgetaut werden müssen, werden mit dem 96 Nadel Replattierer in frische Mikrotiterplatten (220 µl LB-Medium, 5 %(V/V) DMSO, 100 µg/ml Ampicillin) kopiert und die aufgetaute Platte verworfen.

4.4.3 Transfer der Cosmidgenbank in *E. coli* BL21(DE3)

Die in Mikrotiterplatten kultivierten Kolonien werden vereinigt. Die Zellen werden sedimentiert (3300 g, 5 min, 4°C) und die Cosmid-DNA dem QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert. Die so erhaltene Cosmid-DNA wird dann in elektrokompetente *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

5 DNA-Transfer in Bakterien

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme freier, löslicher DNA aus dem Medium durch ein Rezipienten Bakterium. *E. coli* besitzt kein natürliches Transformationssystem, das ihn zur aktiven Aufnahme freier DNA befähigt. Aus diesem Grund ist nur eine passive Aufnahme der DNA nach entsprechender Vorbehandlung der Zellen möglich.

5.1 Transformation nach der PEG/DMSO-Methode

5.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Für die DMSO-Methode zur Transformation von *E. coli* nach Chung *et al.*¹⁸³ werden 50 ml LB-Medium aus einer Vorkultur des entsprechenden *E. coli* Stammes 1:100 angeimpft. Das Wachstum erfolgt im Schüttler bei 37°C und 220 rpm etwa 2 h bis 4 h. Nach Erreichen einer OD₅₇₈ von

0.4-0.5 werden die Zellen zentrifugiert (3000 g, 10 min, 4°C). Anschließend wird das Zellpellet in 2 ml eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert und in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots können direkt zur Transformation eingesetzt oder nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert werden.

Tab. B.21: Puffer für Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen.

Puffer bzw. Medium	Bestandteile	Anteil
TSS-Medium	PEG 6000	10 % (M/V)
	DMSO	5 % (V/V)
	MgCl ₂	5 % (M/V)
	LB-Medium	ad 100 ml
TfbI	RbCl	12,1 g
	KOAc	5,6 g
	CaCl ₂	1,5 g
	MnCl ₂	10,0 g
	Glycerin	150 ml
	dH ₂ O	ad 1 l
		pH 5,8 (HOAc)
TfbII	MOPS	2,1 g
	CaCl ₂	11,0 g
	RbCl	1,2 g
	Glycerin	150 ml
	dH ₂ O	ad 1 l
		pH 6,5 (NaOH)
Psi Broth	Pepton	20,0 g
	Hefeextrakt	5,0 g
	MgSO ₄	5,0pH g 7,5

5.1.2 Transformation kompetenter Zellen

20-100 ng Plasmid DNA (~1 µl) oder 10 µl Ligationsansatz werden mit 200 µl kompetenten Zellen gemischt, 30 min auf Eis und 45 bis 75 s bei 42°C inkubiert. Anschließend werden 0,8 ml

LB-Medium hinzugegeben. Nach 1 h bei 37°C wird zentrifugiert (6000 g, 2 min, RT) und die überstehende Lösung bis auf etwa 100 µl verworfen. Das Pellet wird im verbliebenen Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert.

5.2 Transformation nach der RbCl-Methode

Eine weitere Möglichkeit zur Transformation von verschiedenen *E. coli* Stämmen besteht mit der Rubidiumchlorid Methode.¹⁸⁴

5.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

100 ml Psi Broth (s. Tab. B.21) werden mit 1 ml einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,5 bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Im Anschluss werden die Zellen 15 min auf Eis gekühlt und zentrifugiert (3000 g, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wird mit 40 ml TfbI (s. Tab. B.21) gewaschen, zentrifugiert (3000 g, 10 min, 4°C) und in 4 ml TfbII (s. Tab. B.21) resuspendiert. 0,05 ml Aliquots werden entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

5.2.2 Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation erfolgt analog zur Transformation mit DMSO kompetenten Zellaliquots (s. 5.1.2).

5.3 Transformation mit Hilfe der Elektroporation

Bei der Elektroporation wird die Bakterien-Membran durch Anlegen eines elektrischen Feldes kurzfristig permeabilisiert, d. h. die Potentialdifferenz verursacht eine Desorganisation von Membrankomponenten, was zur Entstehung von "Poren" in der Membran führt, die eine Aufnahme von freier DNA ins Zellinnere ermöglichen.¹⁸⁵

Bei der Durchführung der Elektroporation (Einpulstechnik) sind folgende Punkte zu beachten:

Da die Zelle während des Impulses direkten Kontakt mit dem umgebenden Medium hat, und somit ein Stoffaustausch möglich ist, soll die Zelle für die Dauer der Anlegung des elektrischen Feldes von isotonischem Medium umgeben sein. Gleichzeitig muss die Leitfähigkeit des Mediums sehr niedrig sein, da die Zellen bei der Elektroporation sehr hohen Feldstärken ausgesetzt

werden (ca. 10 kV/cm). Hohe Leitfähigkeit des Mediums kann in der Elektroporationsküvette zur Lichtbogenbildung oder zur Explosion führen. Die eingesetzte DNA sollte daher einen hohen Reinheitsgrad aufweisen und möglichst ionenfrei sein. Um eine hohe Mortalitätsrate zu vermeiden, sollten die Zellen unmittelbar nach der Elektroporation schnell in neues Medium überführt werden. Im Vergleich zur PEG/DMSO-Methode bzw. RbCl-Methode ist die Elektroporation erheblich effizienter (bis zu Faktor 100). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Transformationseffizienz nicht von der Größe des eingesetzten Plasmids abhängt.

5.3.1 Präparation von kompetenten Elektroporations-Zellen

100 ml LB-Medium werden 1:100 aus einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* überimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₅₇₈ von 0.5 - 0.7 inkubiert. Die Zellen werden bei 4°C 15 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird mit dem gleichen Volumen eiskalten 10 % (V/V) Glycerin resuspendiert und erneut bei 4°C 15 min bei 7000 rpm zentrifugiert. Der Wasch- und Zentrifugationsschritt wird nochmals durchgeführt. Nach Abschütten des Überstandes wird das Bakterienpellet in 2 ml eiskaltem Glycerin (87 %) vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wird dann bei 4°C 15 min bei 7000 rpm zentrifugiert und das Bakterienpellet in 2 ml eiskaltem 10 % (V/V) Glycerin aufgenommen. Die Zellen werden in 200 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.¹⁸⁵

5.3.2 Transformation elektrokompetenter Zellen

200 µl der Zellen werden auf Eis aufgetaut. 1 - 5 µl der zu transformierenden DNA (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA) werden mit den kompetenten Zellen gemischt, in eine trockene, eisgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Elektroporation bei 2 kV (10 kV/cm), 25 µF und 400 Ω. Sofort nach Impulsgabe wird 1 ml LB-Medium zum Transformationsansatz zugegeben, die Zellsuspension aus der Küvette in ein Eppendorfgefäß überführt und 45 - 60 min bei 37°C regeneriert. Das Ausplattieren auf Selektionsmedium erfolgte wie unter Abschnitt 5.1.2 beschrieben.

6 Proteinaufreinigung

Bei allen folgenden chromatographischen Proteinaufreinigungen wird die Proteinbestimmung photometrisch bei 280 nm durchgeführt.

6.1 Ammoniumsulfat-Fällung

Eine Aufkonzentrierung bzw. Vorreinigung der Epoxidhydrolase aus *Rhodococcus ruber* DSM44319 erfolgt durch Ammoniumsulfat-Fällung. Hierbei können Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit bei verschiedenen Salzkonzentrationen selektiv ausgefällt werden (sog. "salting-out-effect").¹⁸⁶ Die entsprechende Menge Ammoniumsulfat wird langsam, portionsweise unter Rühren zugegeben und der pH durch Zugabe von 1 M Phosphorsäure bzw. 1 M Natronlauge auf dem gewünschtem Wert gehalten. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis, wird 30 min bei 4°C mit 3000 g der voluminöse Niederschlag abzentrifugiert. Bei Ammoniumsulfat-Konzentrationen bis 40 % (M/V) verbleibt die Epoxidhydrolaseaktivität im Überstand, bei Konzentrationen bis 80 % (M/V) im Pellet. Das Pellet wird in rund 1/10 des Ausgangsvolumen Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 8) gelöst und dann gegen Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 8, 20 % (V/V) Glycerin) dialysiert (10 kDa Slide-A-Lyzer, 4°C).

6.2 Gelfiltrations-Chromatographie

Die Molekularsieb- oder Gelfiltrations-Chromatographie ist eine Methode zur Trennung von Makromolekülen aufgrund unterschiedlicher nativer Molekulargewichte. Die Materialien, die für diese Trennung eingesetzt werden, bestehen aus kleinen "Kügelchen" mit schwammartiger Struktur und Poren von einheitlicher Größe. Das Trennprinzip beruht darauf, dass kleinere Partikel durch die Poren in die Kugeln des Gelmaterials hineindiffundieren können und ihnen somit ein größeres Diffusionsvolumen zur Verfügung steht als größeren Partikeln, so dass sie langsamer von der Säule eluieren. Bei der Gelfiltrations-Chromatographie wird die Trennung von Proteinen in erster Linie durch die Länge der Säule, die Partikelgröße des Gelmaterials, das Probenvolumen, sowie die Flussrate beeinflusst. Diese Parameter müssen im jeweiligen Experiment sorgfältig aufeinander abgestimmt werden, um eine optimale Auftrennung zu erreichen. Generell lässt sich die Auflösung der Gelfiltration durch längere Säulen, langsamere

Durchflussgeschwindigkeit und feineres Matrixmaterial verbessern. Des Weiteren sollte das Volumen der gesamten Gelfiltrationssäule so gewählt werden, dass das Probenvolumen nicht mehr als 5 bis maximal 10 % des Gesamtvolumens ausmacht.^{187,188}

Zur Auftrennung der Proteinextrakte mittels Gelfiltrations-Chromatographie wird das Säulenmaterial Superdex 200 (Amersham Biosciences) verwendet. Superdex 200 hat einen Trennbereich für globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 bis 600 kDa. Die Gelfiltrationssäule weist bei einem Durchmesser von 2,6 cm eine Länge von 50 cm auf. Das Gesamtvolumen betrug etwa 240 ml. Das Packen der Säule erfolgt bei 4°C in zwei Schritten. Um Schichtenbildung zu vermeiden, wird das im Laufpuffer gequollene Matrixmaterial gleichmäßig in einem Zug in die Säule gegossen. Das Material kann zunächst unter Ausnutzung der Gravitationskraft sedimentieren. Anschließend wird das Säulenmaterial mit einer peristaltischen Pumpe (LBK Pump P-1, Pharmacia) bei einer Flussrate von 0,15 ml/min mit Laufpuffer weiter komprimiert. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass eine Bildung von Luftblasen vermieden werden kann. Die Säule muss sowohl zum Gießen des Säulenmaterials, als auch bei der Gelfiltration selbst, absolut gerade stehen. Vor jeder Gelfiltration wird die Säule mit mindestens zwei Säulenvolumina Laufpuffer (Tab. B.22) äquilibriert. Im Anschluss an die Proteinauftrennung wird das Säulenmaterial mit Regenerationspuffer gereinigt.

Tab. B.22: Für die Gelfiltration verwendete Puffer.

Puffer	Bestandteile	Anteil	pH
Laufpuffer	Kaliumphosphat	50 mM	8
	Glycerin	20 % (V/V)	
Regenerationspuffer	Kaliumphosphat	50 mM	8

Die Proteinlösung wird mit Hilfe einer Pumpe bei einer Flussrate von 0,15 ml/min auf die Säule geladen und bei einer Flussrate von 0,17 ml/min eluiert. Die Elution der Proteine wird mittels UV-Detektion (280 nm) verfolgt. Fraktionen mit einem Volumen von jeweils etwa 3 ml werden während der Elution mittels eines Fraktionssammlers aufgenommen.

6.3 Ionenaustausch-Chromatographie

Die Ionenaustausch-Chromatographie beruht auf einem reversiblen Austausch von in Lösung befindlichen Ionen mit elektrostatisch an einen unlöslichen Träger gebundenen Ionen. Im Falle

eines Anionen-Austauschers sind an das inerte Trägermaterial kovalent positiv geladene und im Falle eines Kationen-Austauschers negativ geladene funktionelle Gruppen gebunden. Ausmaß und Stärke der Bindung eines Proteins an den Ionenaustauscher hängen vom pH-Wert und der Ionenstärke des Puffers, dem isoelektrischem Punkt des Proteins und der Dichte der Ladungen auf der Matrix ab. Durch Ionenaustauscher-Chromatographie kann eine Probe in der Regel aufkonzentriert werden. Die Auswahl eines bestimmten Austauschermaterials erfolgt empirisch.^{189,190}

6.3.1 Ionenaustausch-Chromatographie mit Q-Sepharose FF

Zur Auftrennung der Proteinextrakte mittels Ionenaustausch-Chromatographie wird das Säulenmaterial Q-Sepharose FF (Amersham Biosciences) verwendet. Die verwendete Säule weist bei einem Durchmesser von 2,6 cm eine Länge von 20 cm auf. Das Gesamtvolumen beträgt etwa 100 ml. Die Säule wird mit zwei Säulenvolumen Laufpuffer (Tab. B.23) äquilibriert und danach die Proteinlösung (≤ 10 mg/ml) mit einer peristaltische Pumpe (LBK Pump P-1, Pharmacia) und einer Flussrate von 8 ml/min aufgetragen. Nach dem Waschen mit zwei Säulenvolumen Laufpuffer wird mit einem linearen Gradienten von drei Säulenvolumen Laufpuffer nach drei Säulenvolumen Elutionspuffer 1 und einer Flussrate von 4 ml/min eluiert. Zum Abschluss wird die Säule nochmals mit drei Säulenvolumen Elutionspuffer 1 gewaschen.

Tab. B.23: Für die Ionenaustausch-Chromatographie verwendete Puffer.

Puffer	Bestandteile	Anteil	pH
Laufpuffer	Kaliumphosphat	50 mM	8
	Glycerin	20 % (V/V)	
Elutionspuffer 1	Kaliumphosphat	50 mM	8
	NaCl	500 mM	
	Glycerin	20 % (V/V)	
Elutionspuffer 2	Kaliumphosphat	50 mM	8
	KCl	500 mM	
	Glycerin	20 % (V/V)	

6.3.2 Ionenaustausch-Chromatographie mit einer Mono-Q Chromatographiesäule

Die Mono-Q Chromatographiesäule (1 ml, Amersham Biosciences) wird in Laufpuffer (s. Tab. B.23) äquilibriert. Die Proteinlösung wird dann mit einer Konzentration ≤ 1 mg/ml aufgetragen. Die Elution erfolgt durch einen linearen Gradienten von Laufpuffer nach Elutionspuffer 2 mit einer Flussrate von 0,75 ml/min.

6.4 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die Hydrophobe Interaktionschromatographie trennt Proteine nach ihrer Hydrophobizität. Die Trennung beruht auf Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Bereichen des Proteins und der hydrophoben Oberfläche der Matrix. Diese Wechselwirkungen werden verstärkt durch hohe Salzkonzentrationen, wie z. B. Ammoniumsulfat. Proteine in Lösungen mit großer Ionenstärke binden an das Säulenmaterial und können dann mit einer Verringerung der Salzkonzentration fraktionsweise eluiert werden.¹⁹¹

6.4.1 Hydrophobe Chromatographie an Phenylsepharose FF

Zur Auftrennung der Proteinextrakte mittels hydrophober Chromatographie wurde das Säulenmaterial an Phenylsepharose FF (Amersham Biosciences) verwendet. Die verwendete Säule wies bei einem Durchmesser von 5 cm eine Länge von 15 cm auf. Das Gesamtvolumen betrug etwa 250 ml. Die Säule wird mit zwei Säulenvolumen Laufpuffer (Tab. B.24) äquilibriert und danach die Proteinlösung (≤ 10 mg/ml) mit einer peristaltischen Pumpe (LBK Pump P-1, Pharmacia) und einer Flussrate von 10 ml/min aufgetragen. Nach dem Waschen mit zwei Säulenvolumen Laufpuffer wird mit einem linearen Gradienten von drei Säulenvolumen Laufpuffer 1 nach drei Säulenvolumen Elutionspuffer 1 und einer Flussrate von 4 ml/min eluiert. Zum Abschluss wird die Säule nochmals mit drei Säulenvolumen Elutionspuffer 1 gewaschen.

Tab. B.24: Für die Hydrophobe Interaktionschromatographie verwendete Puffer.

Puffer	Bestandteile	Anteil	pH
Laufpuffer 1	Kaliumphosphat	50 mM	8
	(NH ₄) ₂ SO ₄	40 % (M/V)	
Laufpuffer 2	Kaliumphosphat	20 mM	8
	(NH ₄) ₂ SO ₄	40 % (M/V)	
	Glycerin	20 % (V/V)	
Elutionspuffer 1	Kaliumphosphat	50 mM	8
Elutionspuffer 2	Kaliumphosphat	2 mM	8
	Glycerin	20 % (V/V)	

6.4.2 Hydrophobe Chromatographie mit einer TSK-Phenylsäule

Die TSK-Phenyl Chromatographiesäule (Ø: 8 mm, 7,5 cm, 3,8 ml Säulenvolumen, Tosoh Biosep) wird in Laufpuffer 2 (s. Tab. B.24) äquilibriert. Die Proteinlösung wird dann mit Ammoniumsulfat auf 40 % (M/V) Sättigung eingestellt und eventuell auftretende Trübung abzentrifugiert (s. 6.1). Die Auftragskonzentration beträgt ≤ 1 mg/ml. Die Elution erfolgt durch einen linearen Gradienten von Laufpuffer 2 nach Elutionspuffer 2 (s. Tab. B.24) mit einer Flussrate von 0,8 ml/min.

7 Allgemeine biochemische Methoden

7.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Mittels PAGE können Proteine in analytischem oder präparativem Maßstab nach ihrer Größe (SDS-PAGE) aufgetrennt werden.¹⁹² Dabei wandern die Proteine unter dem Einfluss des angelegten elektrischen Feldes durch die Poren des Polyacrylamidgels, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe des Proteins, der Porengröße des Gels, der Ladung und der angelegten Spannung abhängen. Während die Auftrennung der Proteine bei der nativen PAGE im nicht-denaturierten Zustand erfolgt, werden die Proteine zur Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht durch Bindung des Detergenz SDS proportional zu ihrer Größe negativ geladen (ein SDS-

Molekül pro zwei Aminosäurereste) und denaturiert. Der Bereich in dem die Beweglichkeit eines Proteins im Polyacrylamidgel linear vom Logarithmus der Molmasse abhängt, ist bei dem verwendeten 12.5 %igen Gel auf eine Größe von 10 bis 75 kDa beschränkt.

7.1.1 Herstellung des SDS-Gels und Durchführung der Elektrophorese

Zunächst wird zwischen die beiden gründlich gereinigten, durch Abstandshalter getrennten, zusammengeklammerten Glasplatten luftblasenfrei die Trenngellösung (s. Tab. B.26) bis ca. 2,5 cm unter den oberen Rand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min Polymerisationszeit wird das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung (s. Tab. B.26) auf das mit dH₂O gespülte Trenngel gegossen und der Probenaschenkamm eingesetzt. Nach weiteren 30 min werden die Klammern, der Abstandshalter und der Probenaschenkamm vorsichtig entfernt und die Probenaschen gründlich mit dH₂O gespült.

Tab. B.25: Puffer und Lösungen für SDS-PAGE.

Puffer bzw. Medium	Bestandteile	Anteil
Lower Tris 4 x	Tris	182,3 g/l
	SDS	4 g/l
		pH 8,8
Upper Tris 4 x	Tris	60,55 g/l
	SDS	4 g/l
		pH 6,8
5 x Laufpuffer	Tris	15 g/l
	Glycin	72 g/l
	SDS	10 % (M/V)
		pH 8,3
5 x Probenpuffer	Tris/HCl (pH 6,8)	320 mM
	Glycerin	50 % (M/V)
	SDS	10 % (M/V)
	β-Mercaptoethanol	25 % (M/V)
	Bromphenolblau	0,1 % (M/V)

Tab. B.26: Zusammensetzung der Gellösungen.

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid (30 % (M/V))	3,33 ml	0,52 ml
Lower Tris 4 x	2,00 ml	
Upper Tris 4 x		2,00 ml
dH ₂ O	2,67 ml	2,47 ml
TEMED	4 µl	4 µl
Ammoniumpersulfat (10 % (M/V))	40 µl	40 µl

Das Gel wird in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut und Elektrodenpuffer eingefüllt. Die Proteinproben werden 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt bzw. Pellets in 100 µl resuspendiert und 5 min bei 95°C gekocht. Anschließend werden die Proben kurz abzentrifugiert, auf Eis gestellt und aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard werden 5 - 10 µl LMW-Standard (s. Tab. B.27) aufgetragen.

Tab. B.27: LMW-Standard (BIO-RAD).

Protein	Molekulargewicht
Phosphorylase b	97,4 kDa
Serumalbumin	66,2 kDa
Ovalbumin	45,0 kDa
Carbonic anhydrase	31,0 kDa
Trypsin inhibitor	21,5 kDa
Lysozym	14,0 kDa

Die Elektrophorese erfolgt für 10 min mit 10 mA (pro Gel) und anschließend mit 25 mA (pro Gel) bis die blaue BPB-Bande das Ende des Gels erreicht hat. Die Dauer der Elektrophorese kann in Abhängigkeit der zu trennenden Proteine variiert werden. Im Anschluss an die Elektrophorese werden die aufgetrennten Proteine im Gel angefärbt.

7.1.2 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Nach beendeter Elektrophorese werden die Glasplatten entfernt und das Gel 1 h in Coomassie-Färbelösung (s. Tab. B.28) gefärbt und anschließend in Entfärbelösung mindestens so lange entfärbt, bis deutliche Proteinbanden sichtbar sind bzw. das Gel klar wird. Zur Aufbewahrung wird das Gel luftblasenfrei zwischen ein Filterpapier und eine Cellophan-Folie gelegt und 2 h im Gelrockner bei 80°C im Vakuum getrocknet.

Tab. B.28: Puffer zur Coomassie-Färbung.

Puffer bzw. Medium	Bestandteile	Anteil
Färbelösung	Coomassie-Brillant	
	Blue R-250	0,1 % (M/V)
	Methanol	30 % (V/V)
	Eisessig	10 % (V/V)
	H ₂ O	ad 1000 ml
Entfärbelösung	Methanol	30 % (V/V)
	Eisessig	10 % (V/V)
	H ₂ O	ad 1000 ml

7.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird entweder der BCA-Kit der Firma Pierce oder der Bradford-Test der Firma BioRad gemäß der Anleitung des Herstellers verwendet.

7.2.1 Bicinchoninsäure (BCA)-Test

Dieser Test beruht auf der Reduktion von Cu²⁺- zu Cu⁺- Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung. Die Bildung der Cu⁺-Ionen wird durch das Bicinchoninsäurereagenz anhand eines Farbumschlags detektiert.¹⁹³ Der entstandene Chelatkomplex hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm, das linear mit der Proteinkonzentration korreliert. Mit Hilfe dieses Testes können Proteinmengen von 25–2000 µg/ml bestimmt werden. Zur Erstellung der Eichkurve wird das Referenzprotein BSA verwendet.

7.2.2 Bradford-Test

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösung nach Bradford erfolgte unter Verwendung des Proteintestes der Firma Bio-Rad. Der Test beruht auf der Verwendung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250, der mit hoher Spezifität an Proteine bindet. In einer sauren Lösung von an Proteine gebundenem Coomassie Brilliant Blue G-250 kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des ungebundenen Farbstoffes von 465 nm zu 595 nm.¹⁹⁴ Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich Proteinmengen im Bereich von 1-20 µg bestimmen.

7.3 Proteinblotting

Zum Proteinblotting wurden die erhaltenen SDS-Gele nicht gefärbt, sondern zunächst 15 min in Kathodenpuffer (s. Tab. B.29) äquilibriert. Gleichzeitig werden pro Gel 9 Filterpapiere und eine PVDF-Membran mit den Maßen 8 cm x 10 cm ausgeschnitten und in den in Tab. B.29 beschriebenen Lösungen äquilibriert:

Filterpapiere 1-3: 10 min in Anodenpuffer 1

Filterpapiere 4-6: 10 min in Anodenpuffer 2

Filterpapiere 7-9: 10 min in Kathodenpuffer

PVDF-Membran: 2-3 s in 100 % Methanol und dann 2-3 min in Anodenpuffer 1

Nach ausreichender Äquilibration werden Filterpapiere, PVDF-Membran und Gel in der Blotting-Kammer (die Anode befindet sich unten, die Kathode oben) in folgender Reihenfolge übereinandergeschichtet:

1. Filterpapiere 1-3
2. Filterpapiere 4-6
3. PVDF-Membran
4. Gel
5. Filterpapiere 7-9

Zwischen den Lagen vorhandene Luftblasen werden mit Hilfe eines Glasstabes entfernt. Geblottet wird für 45-60 min bei einer Spannung von 15 V. Die Membran wird anschließend für 1-5 min in Coomassie-Färbelösung (0,025 % (M/V) Coomassie Brillant Blue R-250 in 40 % Methanol (V/V)) gefärbt und anschließend so lange in 50 % Methanol (V/V in dH₂O) entfärbt, bis der Membranhintergrund nur noch schwach blau gefärbt war, und die Proteinbanden deutlich hervortreten. Die Membran wird nach mehrmaligem Spülen mit dH₂O an Luft getrocknet. Dann

können die Banden herausgeschnitten und bis zur Proteinsequenzierung bei -20°C gelagert werden.

Tab. B.29: Puffer und Lösungen zum Protein-Blotting.

Puffer bzw. Medium	Bestandteile	Anteil
Anodenpuffer 1	Tris/HCl	0,3 M
	Methanol	10 % (V/V)
		pH 10,4
Anodenpuffer 2	Tris/HCl	25 mM
	Methanol	10 % (V/V)
		pH 10,4
Kathodenpuffer	Tris/HCl	25 mM
	Methanol	10 % (V/V)
		pH 9,4

7.4 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung erfolgt im Anschluss an das Proteinblotting mit aus gefärbten PVDF-Membranen ausgeschnittenen Proteinbanden mit dem Procise Protein Sequenzer Modell 491 HT der Firma Applied Biosystems für N-terminale „Pulsed Liquid und Gas Phasen“ Sequenzierung von Proteinen und Peptiden, gemäß den Angaben des Herstellers. Mit diesem Gerät werden Primärstrukturen von Proteinen basierend auf dem Edman-Abbau bestimmt, der die schrittweise Bestimmung der Aminosäure-Sequenz vom aminoterminalen Ende her erlaubt. Die Reaktion erfolgt in 3 Schritten:

1. Modifizierung der N-terminalen Aminosäure mit Phenylisothiocyanat.
2. Abspaltung des Phenylthiocarbamyl-(PTC)-Derivates der Aminosäure von der Peptidkette und Überführung in das stabile 3-Phenyl-2-thiohydantoin (PTH)-Derivat, und
3. Identifikation des PTH-Derivates mittels HPLC.

Anschließend beginnt der nächste Zyklus des Edman-Abbaus mit dem um 1 Aminosäure verkürzten Peptid.¹⁹⁵

8 Synthese von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure

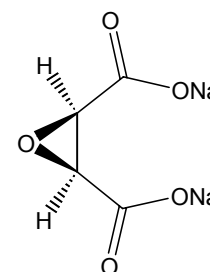
Zur Synthese von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure wird von Maleinsäureanhydrid ausgegangen.¹⁹⁶ Maleinsäureanhydrid wird mit Natronlauge hydrolysiert und teilweise neutralisiert. Nach der Zugabe des Katalysators Natriumwolframat wird die Epoxidierung mit Wasserstoffperoxid durchgeführt. Der pH wird dabei durch Zugabe von Natronlauge im Bereich von 4 bis 5 gehalten. Nach Beendigung der Reaktion wird das Gemisch komplett zur Trockne eingedampft und die Mischung aus Dinatrium *cis*-2,3-oxirandicarbonat und Natriumwolframat weiterverwendet.

Um den Katalysator zu entfernen wird das Dinatriumsalz in die Säure überführt und umkristallisiert. Dazu wird das Natriumsalz in Wasser gelöst und der pH Wert mit Natronlauge auf 9 eingestellt, danach wird die Dicarbonsäure mit Bariumchlorid gefällt. Das erhaltene Bariumsalz wird abfiltriert und getrocknet.

Zur Umkristallisation wird das Bariumsalz in Diethylether mit Magnesiumsulfat suspendiert und danach die freie Dicarbonsäure durch Zugabe von Schwefelsäure erzeugt. Die Bariumionen werden als schwerlösliches Bariumsulfat gefällt. Die *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure verbleibt im Diethylether gelöst und kann daraus nach Filtration gewonnen werden.

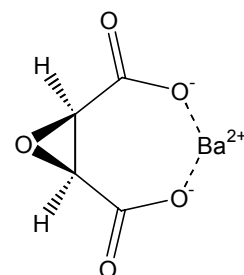
8.1 Synthese von Dinatrium *cis*-2,3-Oxirandicarbonat

Zu einer Lösung von 98,1 g Maleinsäureanhydrid ($M_r = 98,06$ g/mol; $n = 1,0$ mol) in 300 ml Wasser werden in einem 1 l Dreihalskolben 60 g Natriumhydroxid ($M_r = 40,00$ g/mol; $n = 1,5$ mol) in 100 ml Wasser gegeben. Die Lösung erwärmt sich durch die Neutralisierungsreaktion auf rund 70°C. In dieser Lösung werden 6,6 g Natriumwolframat Dihydrat ($M_r = 329,87$ g/mol; $n = 0,02$ mol) gelöst und 136 g 30%ige Wasserstoffperoxidlösung ($M_r = 34,03$ g/mol; $n = 1,2$ mol) zugegeben. Die stark exotherme Reaktion wird durch Eiskühlung auf einer Temperatur von 65°C gehalten. Der pH-Wert wird durch Zugabe von 5 M Natronlauge zwischen pH 4 und 5 gehalten. Die Reaktionslösung wird noch für 1 h auf 65°C erwärmt, danach am Rotationsverdampfer auf rund 300 ml eingengt und dann in 1,5 l Aceton ausgefällt. Der getrocknete Niederschlag wiegt 176 g und entspricht einer Ausbeute von 100 % Dinatrium *cis*-2,3-Oxirandicarbonat ($M_r = 176$ g/mol).¹⁹⁶



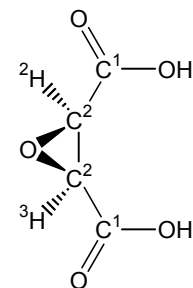
8.2 Synthese von Barium *cis*-2,3-Oxirandicarbonat

10 g Dinatrium *cis*-2,3-Oxirandicarbonat ($M_r = 176 \text{ g/mol}$; $n = 0,06 \text{ mol}$) werden in 100 ml Wasser gelöst und mit 10 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 8 bis 9 gebracht. Zu dieser Lösung wird eine Lösung aus 14,7 g Bariumchlorid Dihydrat ($M_r = 244,28 \text{ g/mol}$; $n = 0,06 \text{ mol}$) gegeben und wieder der pH-Wert mit 10 M Natronlauge auf einen Wert zwischen 8 und 9 eingestellt. Der farblose Barium *cis*-2,3-Oxirandicarbonat Niederschlag wird abfiltriert und über Nacht im Exsikkator über Silica Gel getrocknet. Es werden 18,0 g Barium *cis*-2,3-Oxirandicarbonat ($M_r = 304 \text{ g/mol}$; $n = 0,059 \text{ mol}$) erhalten, das entspricht einer Ausbeute von 98 %.¹⁹⁶



8.3 Synthese von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure

36 g Barium *cis*-2,3-Oxirandicarbonat ($M_r = 304 \text{ g/mol}$; $n = 0,118 \text{ mol}$) werden mit 7 g Magnesiumsulfat in 200 ml Diethylether aufgeschlämmt. Dann werden unter Eiskühlung 6,4 g 96%ige Schwefelsäure ($M_r = 98,07 \text{ g/mol}$; $\rho = 1,83 \text{ g/ml}$; $n = 0,115 \text{ mol}$), gelöst in 50 ml Diethylether, langsam über 1 h zugetropft und danach nochmals 1 h bei 0°C gerührt. Nachdem die Reaktion über Nacht bei RT gerührt wird, wird das ausgefallene Bariumsulfat abfiltriert und die Etherphase über Magnesiumsulfat getrocknet. Der Ether wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und es verbleiben 11,6 g *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure ($M_r = 136 \text{ g/mol}$; $n = 0,085 \text{ mol}$; Ausbeute 72 %).¹⁹⁶



Die NMR-Spektren, der in D_2O gelösten Proben, wurden mit einem Bruker ARX 250 Spektrometer mit TMS als internen Standard aufgenommen. Die nominale Frequenz für 1H -Spektren betrug 250 MHz, die für ^{13}C -Spektren 62 MHz.

1H -NMR (D_2O , 250 MHz): δ (ppm) = 4,81 (s, H2, H3)

^{13}C -NMR(D_2O , 62 MHz): δ (ppm) = 176,6 (C1); 58,1 (C2)

9 Biotransformationen

Für die Umsetzungen werden ganze Zellen, Rohextrakt nach Aufschluss (s. Abschnitt 2.6) oder Fraktionen nach der Proteinaufreinigung (s. Abschnitt 6) verwendet.

9.1 Biotransformationen im Mikrotiterplattenformat

Zu 100 - 180 μ l Proteinlösung wird soviel Stammlösung des entsprechenden Epoxides geben um 200 μ l Gesamtlösung (s. Tab. B.30) zu erhalten. Nach 1 bis 20 h Inkubation bei 30°C werden 100 μ l dieser Lösung, wie in Kapitel 10.2 - 10.4 beschrieben, auf gebildete *vicinale* Diole getestet.

Tab. B.30: Stammlösungen für die Biotransformationen in Mikrotiterplatten.

Epoxid	Konz. der Stammlösung	Zugegebene Lösung	Endkonzentration
1,2-Epoxyhexan;	50 mM in NaP _i	100 μ l	25 mM
1,2-Epoxybutan;	(50 mM, pH 8)		
1,2-Epoxy cyclohexan;			
2,3-Epoxybutan			
Epichlorhydrin			
Styroloxid	50 mM 5 %(V/V) DMSO in NaP _i (50 mM, pH 8)	100 μ l	25 mM
Stilbenoxid	250 mM in Ethanol	1 μ l	2,5 mM
<i>cis</i> -2,3-Oxirandicarbonsäure	1 M in NaP _i (50 mM, pH 8)	20 μ l	100 mM

9.2 Biotransformationen im Milliliter Maßstab

Zu 1 ml Proteinextrakt wird soviel Epoxid bzw. Epoxidstammlösung gegeben, dass die gewünschte Endkonzentration erreicht wird (Tab. B.31). Die Mischung wird auf dem Thermomixer bei 30°C geschüttelt. Die Proben werden zweimal mit 300 μ l Diethylether extrahiert und für 1 min bei 14000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wird zur GC-Messung verwendet. Alle

Umsetzungen von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure zu Weinsäure werden, wie in Kapitel 10.1.1 beschrieben, derivatisiert und dann zur GC-Messung verwendet.

Tab. B.31: Konzentrationen und Volumina zu Biotransformationen verwendeter Epoxide.

Epoxid	Zugegebene Volumina	Stammlösung	Endkonzentration
Styroloxid	50 μ l	1 M in DMSO	50 mM
1,2-Epoxybutan	4,3 μ l	rein	50 mM
1,2-Epoxyhexan	6,0 μ l	rein	50 mM
1,2-Epoxycyclohexan	5,1 μ l	rein	50 mM
Epichlorhydrin	3,9 μ l	rein	50 mM
<i>cis</i> -2,3-Oxirandicarbonsäure	100 μ l	1 M in NaP _i (50 mM, pH 8)	100 mM
<i>trans</i> -Stilbenoxid	5 μ l	0,5 M in EtOH	5 mM

10 Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität

10.1 Chirale Kapillargaschromatographie

Alle Messungen werden mit einem HRGC MEGA series 2 Gaschromatograph (Fison Instruments, Rodano, Italien) mit einem EL930 FID (Temperatur: 200°C) durchgeführt. Als Trennsäule wird eine FS-Cyclodex β -I/P CS Fused Silica Kapillarsäule (Heptakis-(3-*O*-acetyl-2,6-di-*O*-pentyl)- β -cyclodextrin) mit 50 m Länge und 0,25 mm Innendurchmesser (CS-Chromatographie Service, Langerwehe) verwendet. Als Trägergas wird in allen Fällen Wasserstoff verwendet. Die Injektion erfolgt durch einen Splitinjektor (Temperatur: 200°C; Splitverhältnis: 1:100). Die Zuordnung der Peaks und der Konfiguration der Enantiomere erfolgt durch Vergleiche mit Standards, bzw. enantiomerenreinen Standards. Tab. B.32 zeigt die verwendeten Temperaturprogramme und den eingestellten Gasrückdruck.

Tab. B.32: Verwendete GC Programme.

Substanz	Temperaturprogramm	Gasrückdruck
Styroloxid	75°C isotherm	130 kPa
1,2-Phenylethandiol	150°C isotherm	100 kPa
1,2-Epoxybutan	40°C isotherm (3 min) 4°C/min bis 120°C 120°C isotherm	50 kPa
1,2-Butandiol	100°C isotherm	120 kPa
1,2-Epoxyhexan	40°C isotherm (3 min) 4°C/min bis 120°C 120°C isotherm	50 kPa
1,2-Hexandiol	100°C isotherm	120 kPa
1,2-Epoxycyclohexan	40°C isotherm (3 min) 4°C/min bis 120°C 120°C isotherm	50 kPa
<i>trans</i> -1,2-Cyclohexandiol	150°C isotherm	100 kPa
Weinsäuredimethylester	170°C isotherm	120 kPa

10.1.1 Derivatisierung von Weinsäure

Organische Säuren können mit einer Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung schnell und einfach in den entsprechenden Methylester überführt werden. Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösungen ist wesentlich einfacher in der Handhabung als z. B. Diazomethan als Standardreagenz zur Herstellung der Methylester.¹⁹⁷

Die zu derivatisierende, wässrige Weinsäurelösung wird in der SpeedVac getrocknet und danach im Ausgangsvolumen Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 4) gelöst. Danach wird diese Lösung nochmals in der SpeedVac zur Trockene eingengt und dann mit 40 µl Trimethylsulfoniumhydroxid-Lösung (~0,25 M in Methanol) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei RT wird 1 min bei 20000 g zentrifugiert, der klare Überstand abgenommen und gaschromatographisch analysiert.

10.2 Nachweis von Diolen in Lösung mit Schiffischem Reagenz

Vicinale Diole lassen sich in wässriger Lösung durch Periodat in Aldehyde und Ketone spalten.¹⁷ Die bei der Spaltung entstandenen Aldehyde lassen sich durch Pararosanilin in Gegenwart von schwefliger Säure als violetter Farbstoff nachweisen (s. C1.2.2).¹⁹⁸

10.2.1 Durchführung des Tests

Zu 100 μl der zu testenden Lösung werden in einer Mikrotiterplatte (Glas oder Polypropylen) 60 μl der Oxidationslösung (Tab. B.33) gegeben. Nach 10 min Inkubationszeit werden 100 μl Reduktionslösung zugegeben und durch dreimaliges auf- und abpipettieren so stark vermischt, dass die bräunliche Iodfärbung verschwindet. Dann werden 20 μl Schiff's Reagenz zugegeben, die Mikrotiterplatte mit einer Aluminiumklebefolie abgedichtet und über Nacht bei 70°C inkubiert. Danach werden nochmals 50 μl Reduktionslösung in jede Kavität gegeben um störende Hintergrundfärbungen zu reduzieren. Die Absorption bei 560 nm der einzelnen Kavitäten wird dann bestimmt und der Hintergrund durch eine negativ Kontrolle korrigiert.

Tab. B.33: Für den Nachweis von Diolen mit Schiffischem Reagenz verwendete Lösungen.

Puffer	Bestandteile	Anteil
Oxidationslösung:	Natriumperiodat	90 mM
	Natriumacetat	100 mM
	mit HOAc auf	pH 5,5
Reduktionspuffer:	Natriumsulfit	0,8 M
	mit Salzsäure auf	pH 4,5
Schiff's Reagenz (Fluka):	Pararosanilin	5 mM
	Natriumsulfit	126 mM
	Salzsäure	457 mM

10.2.2 Validierung des Testformates

Zur Validierung des Schnelltestes werden verschiedene Stammlösungen von Epoxiden und *vicinalen* Diolen in Natriumphosphatpuffer hergestellt (s. Tab. B.34). Diese werden mit Puffer

bzw. Zellysate so vermischt, dass verschiedene Umsatzpunkte simuliert werden können (s. Tab. B.35). Dann wird der Test durchgeführt wie in 10.2.1 beschrieben.

Tab. B.34: Stammlösungen zur Validierung.

Stammlösung in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 8)	Konzentration
Styroloxid	50 mM
DMSO	5 % (V/V)
1,2-Epoxyhexan; 1,2-Epoxybutan; 1,2-Epoxycyclohexan; Epichlorhydrin	50 mM
1,2-Phenylethandiol	50 mM
DSMO	5 % (V/V)
1,2-Butandiol; 1,2-Hexandiol; <i>trans</i> -1,2-Cyclohexandiol; 3-Chlor-1,2-propandiol	50 mM

Tab. B.35: Mischungen der Stammlösungen für die Validierung.

Stammlösung		Konzentration		Umsatz (simuliert)
Epoxid	Diol	Epoxid	Diol	
50 µl	0 µl	50 mM	0 mM	0 %
40 µl	10 µl	40 mM	10 mM	20 %
30 µl	20 µl	30 mM	20 mM	40 %
20 µl	30 µl	20 mM	30 mM	60 %
10 µl	40 µl	10 mM	40 mM	80 %
0 µl	50 µl	0 mM	50 mM	100 %

10.3 Nachweis durch Carboxyfluorescein

Die Fluoreszenz von Fluorescein Farbstoffen lässt sich durch Oxidationsmittel wie z. B. Blei(IV)-Acetat zerstören.¹⁹⁹ Diese Eigenschaft wird ausgenutzt um das nach der Periodatspaltung noch vorhandene Periodat nachzuweisen (s. C1.3).

10.3.1 Durchführung des Fluoreszenztests

In einer schwarzen Mikrotiterplatte werden 100 μl der zu testenden Lösung mit 60 μl Oxidationslösung versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 100 μl Carboxyfluorescein-Lösung zugegeben und gemischt (s. Tab. B.36). Die Mikrotiterplatte wird mit einer Aluminiumklebefolie verschlossen und für 2 h bzw. 16 h bei 70°C inkubiert. Im Konzentrationsbereich von 10 bis 50 mM nachzuweisendes Diol ist eine zwei stündige Inkubationszeit ausreichend, während im Bereich von 0,5 bis 5 mM Diol eine Inkubation über Nacht nötig ist. Danach wird die Fluoreszenz nach Anregung bei 480 nm bei 515 nm gemessen.

Tab. B.36: Für den Nachweis von Diolen mit Carboxyfluorescein verwendete Lösungen.

Puffer	Bestandteile	Anteil
Oxidationslösung 1: (c(Diol) = 10 – 50 mM)	Natriumperiodat	90 mM
	Natriumacetat	100 mM
	mit HOAc auf	pH 5,5
Oxidationslösung 2: (c(Diol) = 0,5 – 5 mM)	Natriumperiodat	9 mM
	Natriumacetat	100 mM
	mit HOAc auf	pH 5,5
Carboxyfluorescein-Lösung 1: (c(Diol) = 10 – 50 mM)	Carboxyfluorescein	20 mM
	Natriumphosphat	50 mM
		pH 8
Carboxyfluorescein-Lösung 2: (c(Diol) = 0,5 – 5 mM)	Carboxyfluorescein	425 μM
	Natriumphosphat	50 mM
		pH 8

10.3.2 Validierung des Fluoreszenztests

Die Validierung wird analog zur Validierung des Assays mit Schiffischem Reagenz vorgegangen (s. 10.2.2).

10.4 Nachweis von Weinsäure

Ammoniummetavanadat bildet mit Weinsäure in essigsaurer Lösung einen roten Komplex. Diese Farbreaktion lässt sich als quantitativer Schnelltest für Weinsäure verwenden.¹⁹

In einer Mikrotiterplatte werden zu 100 µl der Probenlösung 100 µl Vanadiumlösung gegeben (s. Tab. B.37). Nach der Zugabe von 80 µl 1M Schwefelsäure wird die Platte 2 min bei RT inkubiert und bei vorhandener Trübung gegebenenfalls zentrifugiert (3300 g, 10 min, RT). Die Absorption bei 560 nm wird dann für jede Kavität bestimmt. Die Weinsäurekonzentration kann durch eine Kalibriergerade (s. z. B. Abb. C.31) bestimmt werden.

Tab. B.37: Verwendete Lösungen für den Weinsäure Schnelltest.

Puffer	Bestandteile	Anteil
Vanadium-Lösung:	Natronlauge 1 M	30,0 ml
	Natriumacetat	10,8 g
	NH ₄ VO ₃	2 g
	ad ddH ₂ O	100 ml
Schwefelsäure:	Schwefelsäure	1 M

10.5 Nachweis der Bildung von Hydrobenzoin

In einer UV-Licht durchlässigen Küvette werden 1 ml Proteinextrakt mit 1 µl 250 mM *trans*-Stilbenoxid vermischt und die Abnahme der Absorption bei 260 nm verfolgt.¹¹⁵ Die Abnahmege-
schwindigkeit wird durch eine Blindprobe korrigiert.

C Ergebnisse

1 Assayentwicklung

1.1 Vorbedingungen zur Assayentwicklung

Eine Aufgabenstellung bei der Charakterisierung von Enzymaktivitäten ist es, das Substratspektrum von einzelnen Mikroorganismen, Enzympräparationen oder heterolog exprimierten Proteinen zu bestimmen.

Die Methode mit der das Substratscreening durchgeführt wird ist von zentraler Bedeutung und muss daher einigen Anforderungen genügen:

- die Methode muss mit jedem Substrat, bzw. Produkt durchführbar sein,
- das Assayformat sollte das gebildete Produkt direkt nachweisen,
- der Assay sollte möglichst einfach und eindeutig sein,
- das Assaysystem muss automatisierbar sein,
- Nebenreaktion sollten nicht auftreten, bzw. keinen störenden Einfluss haben.

Keiner der zu Beginn der Arbeit bekannten Assaysysteme zur Detektion von Epoxidhydrolaseaktivität ist geeignet das Substratspektrum einer Epoxidhydrolase, bzw. putativer Epoxidhydrolase zu bestimmen.

1.2 Entwicklung eines Produktnachweises der Epoxidhydrolaseaktivität

Wichtigstes Ziel in der Entwicklung eines Assaysystems, das geeignet ist das Substratspektrum einer Epoxidhydrolase zu bestimmen, ist der direkte Nachweis der *vicinalen* Diole. Um das in einfacher, schneller Form zu erreichen muss der Nachweis in Form einer Farbreaktion oder Fluoreszenzbildung erfolgen. Nur dann ist es möglich, den Assay im Mikrotiterplattenformat durchzuführen und dadurch die erforderlichen Randbedingungen wie Automatisierung, hoher Durchsatz und Nachweis der Produkte zu erfüllen. Die dafür eingesetzten Reaktionen müssen in wässriger Lösung durchführbar sein, denn nur dann kann der Assay direkt mit der Biotransformationslösung durchgeführt werden und so ein hinreichend einfaches Assayprotokoll erstellt werden.

Die Zahl der Reaktionen die nur von *vicinale* Diolen in wässrigem Medium durchgeführt werden ist sehr klein. Eine Reaktion ist die Periodatspaltung. Periodat spaltet 1,2-Diole oder

α -Aminoalkohole oxidativ in Aldehyde bzw. Ketone (s. Abb. C.1). Die Reaktion ist in wässriger Lösung in einem pH-Bereich von 4,5 bis 8 durchführbar.¹⁷

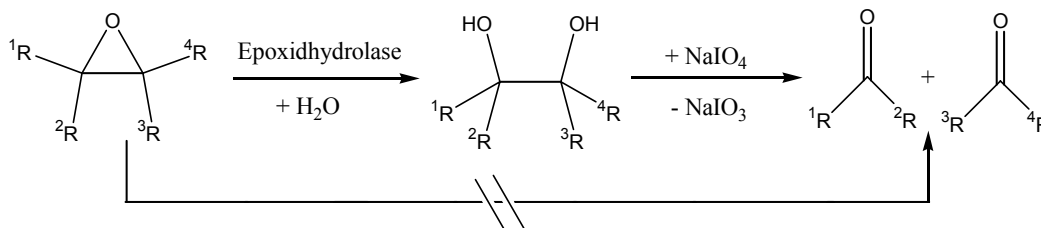


Abb. C.1: Periodatspaltung von 1,2-Diolen als Nachweismethode für Epoxidhydrilaseaktivität.

Je nach Substitutionsmuster an den Hydroxyl- bzw. Aminokohlenstoffatomen entstehen Aldehyde oder Ketone. Primäre und sekundäre Hydroxylfunktionen in Diolen werden zu Aldehyden, tertiäre Hydroxylfunktionen werden zu Ketonen oxidiert. Die direkte Detektion der Carboxylverbindungen ist nur in Spezialfällen wie, z. B. mit Benzaldehyd möglich. Dieses lässt sich bei der Periodatspaltung von 1,2-Phenylethandiol, durch die Zunahme der Absorption bei 280 nm detektieren.²⁰⁰

Um diese Reaktion zum Nachweis der *vicinalen* Diole zu verwenden stehen nun prinzipiell drei Wege offen:

1. Nachweis der Spaltprodukte, d. h. der Aldehyde oder Ketone.
2. Detektion des verbliebene NaIO_4 oder
3. Detektion des entstandenen NaIO_3 .

Alle Wege werden im Folgenden untersucht.

1.2.1 Detektion der Spaltprodukte

Der klassische Farbnachweis für Aldehyde und Ketone ist die Umsetzung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin.²⁰¹ 2,4-Dinitrophenylhydrazone sind nur in geringem Umfang wasserlöslich, d. h. eine Absorptionsmessung zur Quantifizierung ist nicht möglich. Die Reaktionsbedingungen sind ebenfalls sehr drastisch und dadurch nicht geeignet als Test für eine enzymatische Reaktion.

Weiterhin lassen sich Aldehyde einfach durch eine Farbreaktion mit Schiffischem Reagenz nachweisen.²⁰¹ Aldehyde reagieren mit Pararosanilin und Schwefeldioxid zu einem wasserlöslichen, violetten Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 560 nm.¹⁹⁸ Die Bildungsreaktion ist in Abb. C.2 dargestellt.

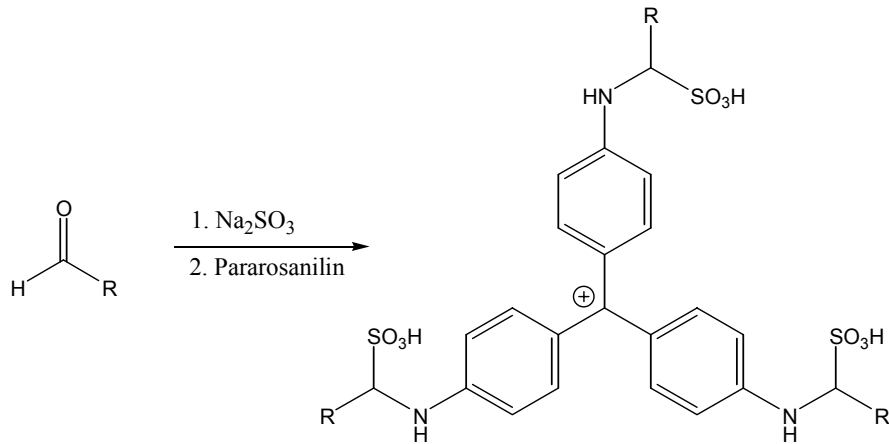
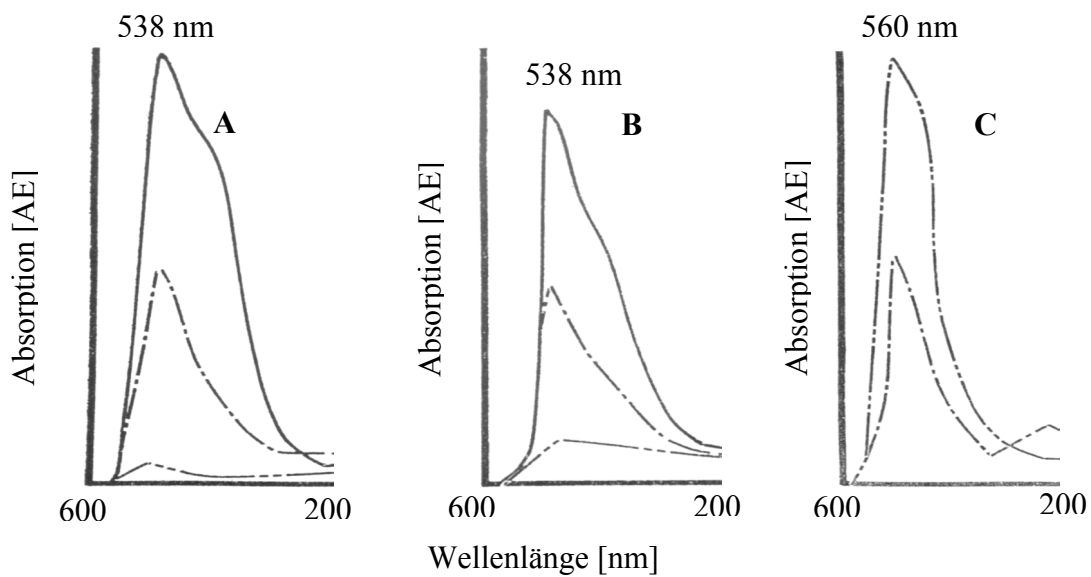


Abb. C.2: Bildung des violetten Farbstoffes aus Pararosanilin, schwefliger Säure und Aldehyd. Die Stabilität bzw. die Bildung des Farbstoffes ist stark vom pH-Wert, der Konzentration des



Schwefeldioxid in der Lösung und der Art und Konzentration des Aldehyds abhängig.

Abb. C.3: Veränderung des Spektrums von reinem Pararosanilin bei verschiedenen Bedingungen (A und B). Im linken Spektrum (A) ist die pH-Wert Abhängigkeit dargestellt. pH = 7 (durchgezogene Linie), pH = 2 (einfachdurchbrochene Linie) und pH = 1 (zweifachdurchbrochene Linie). Im mittleren Spektrum (B) zeigt die Abhängigkeit von der Schwefeldioxid Konzentration. Kein SO₂ (durchgezogene Linie), 5 µg/ml SO₂ (einfachdurchbrochene Linie) und 40 µg/ml SO₂ (zweifachdurchbrochene Linie). Im rechten Spektrum (C) ist die Bildung des gewünschten Farbstoffes zu sehen. 1 mol/l Formaldehyd in Gegenwart von 5 µg/ml SO₂ (einfachdurchbrochene Linie) und in Gegenwart von 40 µg/ml SO₂ (zweifachdurchbrochene Linie).¹⁹⁸

Pararosanilin ist in stark saurer Lösung ($\text{pH} = 1$) farblos und zeigt mit steigenden pH-Wert eine Zunahme der Absorption bei 538 nm (Abb. C.3, **A**). Diese Absorption des reinen Pararosanilins überlagert die Absorption der Verbindung aus Aldehyd und Pararosanilin (s. Abb. C.2 und Abb. C.3, **A**). Eine Pararosanilinlösung in Wasser kann ebenfalls durch die Erhöhung des Schwefeldioxidgehaltes entfärbt werden. Mit steigender SO_2 -Konzentration verschwindet das Absorptionsmaximum bei 538 nm (Abb. C.3, **B**). Um das störende Absorptionsmaximum des reinen Pararosanilins bei 538 nm möglichst gering zu halten sollte der pH-Wert möglichst klein und der Schwefeldioxidgehalt möglichst hoch sein.

Die Absorption bei 560 nm des mit Aldehyden gebildete Farbkomplexes (s. Abb. C.2) ist proportional vom SO_2 -Gehalt in der Lösung abhängig (Abb. C.3, **C**). Mit steigendem SO_2 -Gehalt nimmt das Absorptionsmaximum zu.

Damit ergeben sich folgende Reaktionsbedingungen für die durchzuführende Färbung:

- pH-Wert größer als 2
- möglichst hohe Schwefeldioxidkonzentration

Um zu überprüfen inwiefern das Spaltungsreagenz Natriumperiodat die Färbereaktion stört, wurde das Spektrum einer Mischung aus Schiffischem Reagenz und einer 0,09 M Natriumperiodat-Lösung aufgenommen. Diese Mischung zeigt eine starke violette Farbe und im Absorptionsspektrum tritt ein Maximum bei 538 nm auf (Abb. C.4, schwarze Linie). Das stark oxidierende Periodat transformiert folglich das im Schiffischem Reagenz enthaltene Schwefeldioxid zu Sulfat und dadurch färbt sich die Lösung violett. Diese Absorption stört in starkem Maße die Messung des durch die Reaktion mit Aldehyden gebildeten Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 560 nm. Durch diese Nebenreaktion wird der Nachweis so stark beeinträchtigt, dass nur 1,2-Phenylethandiol-Lösungen mit einer Konzentration größer als 1 M eindeutig nachgewiesen werden können. Diese Nachweisgrenze ist um den Faktor 20 zu groß und somit nicht akzeptabel. Derselbe störende Effekt wird durch Iodat, dem während der Spaltung auftretenden Produkt, ausgelöst. Das nicht verbrauchte Periodat und das entstandene Iodat müssen also vor dem Nachweis der entstandenen Aldehyde aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Dies wird erreicht durch die Reduktion dieser Iodverbindungen mit einer Sulfitlösung bei einem pH von 5. Damit werden zwei Probleme zugleich gelöst. Erstens werden die oxidierenden Iodatverbindungen unschädlich gemacht und zweitens wird die für die Farbreaktion notwendige Schwefeldioxidkonzentration erzeugt. Abb. C.4 zeigt das Spektrum einer 0,09 M

Natriumperiodat-Lösung, die mit einer 0,8 M Natriumsulfitlösung reduziert wurde, nach der Zugabe von Schiffchem Reagenz (rote Linie). Es konnte im für den Aldehydnachweis wichtigen Wellenlängenbereich von 400 bis 600 nm keine Absorption festgestellt werden.

Um die Frage zu klären, ob die nach der Periodatspaltung vorliegenden Aldehyde bei der Reduktion mit Natriumsulfit ebenfalls reduziert werden, wurde eine 25 mM 1,2-Phenylethandiol-Lösung mit 0,09 M Natriumperiodat-Lösung versetzt und nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur mit Natriumsulfit behandelt. Nach der Zugabe von Schiffchem Reagenz wurde das Absorptionsspektrum aufgenommen. In Abb. C.4 ist das Spektrum mit einem deutlich erkennbaren Absorptionsmaximum bei 560 nm zu sehen (grüne Linie). Natriumsulfit ist somit das geeignete Reagenz um die oxidierenden Iodatverbindungen aus dem Reaktionsgemisch nach der Spaltung zu entfernen. Das gleiche Vorgehen mit einer 25 mM Styroloxid-Lösung führte zu dem in Abb. C.4 mit einer blauen Linie dargestellten Spektrum. Auch hier war keine Absorption in einem Wellenlängenbereich von 400 bis 600 nm detektierbar.

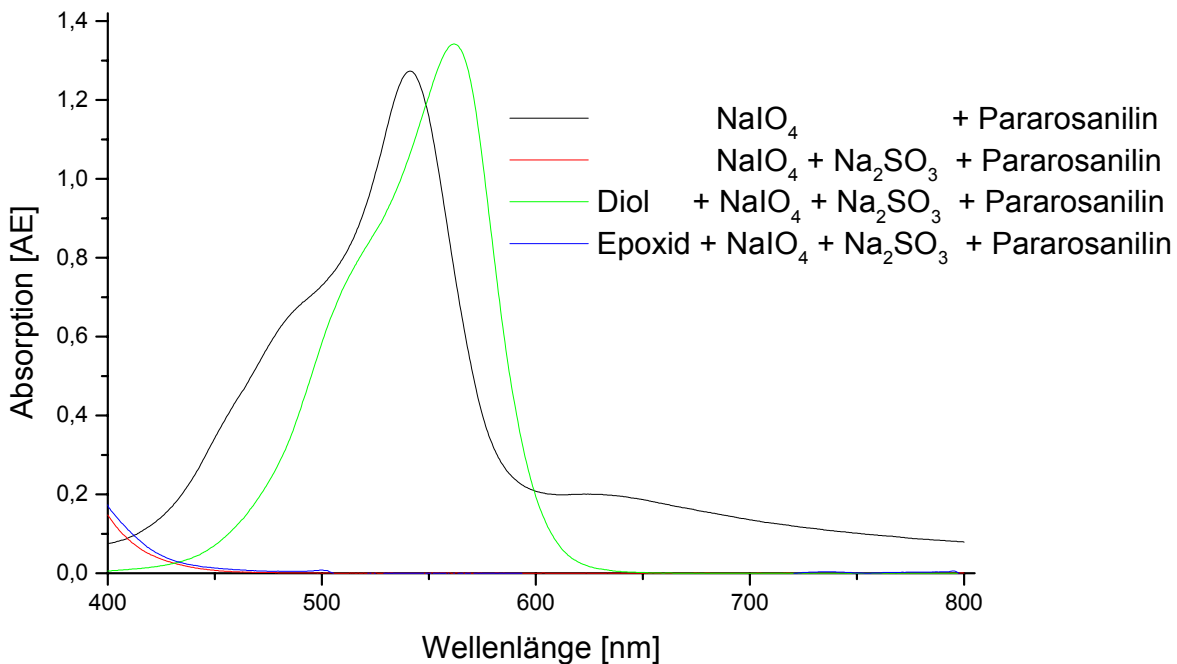


Abb. C.4: Spektren der Farbstoffe in verschiedene Stadien des Assays. Die schwarze Linie zeigt das Spektrum einer Pararosanilinlösung nach der Reaktion mit NaIO_4 Lösung (Absorptionsmaximum 538 nm). Die rote Linie zeigt das Spektrum einer Pararosanilinlösung nachdem NaIO_4 mit Na_2SO_3 reduziert wurde (keine Absorption). Die grüne Linie zeigt das Spektrum einer 1,2-Phenylethandiol-Lösung nach Periodatspaltung, anschließender Reduktion mit Na_2SO_3 und Färbung mit Pararosanilinlösung (Absorptionsmaximum 560 nm). Die blaue Linie zeigt das Spektrum einer Styroloxid-Lösung nach Periodatspaltung, anschließender Reduktion mit Na_2SO_3 und Färbung mit Pararosanilinlösung (keine Absorption).

Mit diesen Vorversuchen wurde ein Assayschema entworfen. Das Schema ist in graphischer Form in Abb. C.5 aufgeführt. Im ersten Schritt wird die Biotransformation eines Epoxides mit einer Epoxidhydrolase durchgeführt (Abb. C.5, 1.). Nach ausreichender Zeit wird zu diesem Reaktionsgemisch eine 0.09 M Natriumperiodat-Lösung gegeben (Abb. C.5, 2.). Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur wird dann das verbliebene Natriumperiodat mit einer Natriumsulfit-Lösung (pH = 4,5) reduziert (Abb. C.5, 3.). Ab diesem Zeitpunkt sind die Bedingungen für eine Enzymreaktion nicht mehr gegeben, d. h. der Assay ist nur in Form einer Endpunktbestimmung möglich. Hier musste ein Zentrifugationsschritt und eine Überführung des klaren Überstandes eingeschoben werden, da nach der Reduktion eine Trübung durch ausgefällte Proteine auftrat. Nach der Reduktion wird dann die Reaktionslösung mit Schiffischem Reagenz gefärbt (Abb. C.5, 4.). Im folgenden wird der Test mit PSS-Assay für Periodatspaltung und Färbung mit Schiffischem Reagenz bezeichnet.

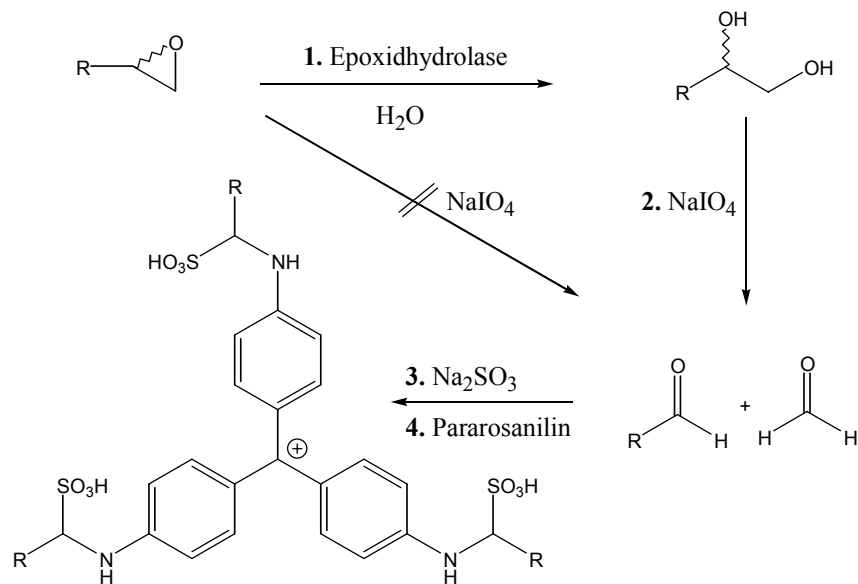


Abb. C.5: Reaktionsschema des Epoxidhydrolase Aktivitätstests mit Periodatspaltung und Färbung mit Schiffischem Reagenz (PSS Testformat).

1.2.2 Evaluierung des PSS Testformats

Bei der Validierung des PSS Testformates sollten drei Punkte untersucht werden:

1. verschiedene Substrat/Produktpaare in unterschiedlichen Konzentrationen,
2. Störsubstanzen im Zelllysat,
3. unterschiedliche Mikrotiterplattenmaterialien.

Es wurden vier Substrat/Produktpaare, Styroloxid/1,2-Phenylethandiol, 1,2-Epoxybutan/1,2-Butandiol, 1,2-Epoxy-cyclohexan/*trans*-1,2-cyclohexandiol und Epichlorhydrin/3-Chlor-1,2-propandiol verwendet. Von jedem Paar wurden 6 Mischungen hergestellt, die jeweils 0 %, 20 %, 40 %, 60 %, 80 % und 100 % Umsatz des Epoxids zum *vicinalen* Diol mit einer Epoxidhydrolase darstellten (s. Tab. B.35). Die Wahl der Paare ist ein repräsentativer Querschnitt durch verschiedene Epoxidklassen. Es umfasst ein aromatisches, aliphatische, halogeniertes und ein cyclisches Substrat.

Um zu untersuchen, ob das Zelllysate störende Substanzen enthält, wurde zu den Mischungen (s. o.) aufgeschlossene *E. coli* bzw. *S. antibioticus* Zellen 1:5 (V/V) zugegeben.

1.2.2.1 Validierung des PSS-Assays in Glas-MTP

Die Messung sollte in Polystyrol Mikrotiterplatten erfolgen. Nach der Zugabe der Epoxidstammlösungen zeigten die PS Mikrotiterplatten eine deutliche Eintrübung, die die Absorptionsmessung empfindlich störte. Die Eintrübung wurde mit allen schlecht wasserlöslichen Epoxiden beobachtet und resultiert aus der Reaktion der Epoxide mit dem Mikrotiterplattenmaterial. Durch die Trübung war keine zuverlässige Absorptionsmessung der Assaylösung machbar. Dieser Effekt wurde nur durch das Epoxid ausgelöst, d. h. für die erfolgreiche Anwendung des PSS-Assays musste ein alternatives Mikrotiterplattenmaterial gefunden werden.

Die naheliegendste Alternative zu PS ist Glas. Glas ist gegenüber Epoxiden und anderen Chemikalien inert. Mit den in Kap. C1.2.2 hergestellten Lösungen wurde dann der PSS-Assay in Glas Mikrotiterplatten durchgeführt. Zuerst wurde durch Zugabe von 1,08 eq Natriumperiodat die oxidative Spaltung bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurden die verbliebenen Iodatverbindungen mit 3,7 eq Natriumsulfit zu Iodid reduziert. Diese Lösung wurde nun durch Schiffssches Reagenz gefärbt. Der Assay wurde bei verschiedenen Temperaturen und unterschiedlichen Inkubationszeiten durchgeführt. Als optimale Temperatur wurde 70°C und als günstigste Inkubationszeit 12 h bestimmt. Nach dieser langen Inkubationszeit war eine deutliche violette Färbung zu beobachten, welche die Zuverlässigkeit der Messung beeinträchtigte. In langen Inkubationszeit wird das in der Lösung enthaltene Sulfit durch Luftsauerstoff zu Sulfat oxidiert, dadurch färbt sich überschüssiges Pararosanilin (vgl. Abb. C.3, **B**) und stört die Messung des mit Aldehyden gebildeten Farbstoffs. Dieses Problem konnte durch eine zweite Zugabe von 1,8 eq Natriumsulfit gelöst werden.

Da zu erwarten war, dass die Zellysatbestandteile auch eine Grundabsorption ergeben, wurden die Messwerte durch eine Nullprobe korrigiert.

Um die Methode genauer zu charakterisieren wurde jede Validierungslösung 16-fach bestimmt und aus den erhaltenen Messdaten, sowohl die Standardabweichung SD nach Gl. C.1 und der Standardfehler SE nach Gl. C.2 berechnet.²⁰²

$$\text{Standardabweichung } SD = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$$

Gl. C.1: Berechnung der Standardabweichung, x sind die einzelnen Messwerte, n die Anzahl der Messwerte.²⁰²

Als Detektionsgrenze kann die Konzentration angesehen werden, für die die dreifache Standardabweichung kleiner dem Messwert selbst ist.

$$\text{Standardfehler } SE = \frac{SD}{\sqrt{n}} = \frac{1}{\sqrt{n}} \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n^2}}$$

Gl. C.2: Berechnung des Standardfehlers, x sind die einzelnen Messwerte, n die Anzahl der Messwerte.²⁰²

Die Epoxidkonzentration sinkt von 25 mM in 5 mM Schritten auf eine Endkonzentration von 0 mM, während die 1,2-Diolkonzentration von 0 mM gegenläufig auf 25 mM steigt.

Die Messwerte für Styroloxid/1,2-Phenylethandiol sind in Tab. G.1 aufgeführt. Der Durchschnitt (\bar{x}) der OD_{560} steigt von 0,05 auf 1,44 und ist linear in einem Bereich von 0 bis 15 mM (Abb. C.6, schwarze Linie). Die Standardabweichung SD liegt im Bereich von 0,01 bis 0,32 und der Standardfehler von 1 bis 10 %. Die dreifache Standardabweichung ist immer kleiner als die bestimmten Messwerte. Die Detektionsgrenze ist also mindestens 5 mM 1,2-Phenylethandiol.

Die Messdaten von 1,2-Epoxybutan/1,2-Butandiol zeigen ein ähnliches Verhalten (Tab. G.2). Die OD_{560} liegt zwischen -0,02 und 1,01 und die dreifache Standardabweichung ist für alle Messpunkte größer als 0 mM 1,2-Butandiol kleiner als der jeweilig Messpunkt. Die relativen Standardfehler liegen, außer für den Punkt 0 mM Diol zwischen 1 und 3 %. Die Detektionsgrenze liegt ebenfalls bei 5 mM 1,2-Butandiol.

Die Messergebnisse für das Paar Epoxycyclohexan/*trans*-1,2-Cyclohexandiol (Tab. G.3) zeigen dasselbe Verhalten wie im Falle des 1,2-Epoxybutan/1,2-Butandiol Paares, mit leicht erhöhten Standardfehlern.

Bei Epichlorhydrin/3-Chlor-1,2-propandiol (Tab. G.4), welches von den verwendeten Paaren am reaktivsten ist, konnten die größten Standardfehler beobachtet werden. Sie liegen zwischen 2 und 7%. Aber auch hier lässt sich die Detektionsgrenze zu 5 mM 3-Chlor-1,2-propandiol bestimmen.

Es konnte für alle vier verwendeten Epoxide und ihre korrespondierenden Diole eine lineare Korrelation zwischen der OD_{560} und der Diolkonzentration beobachtet werden. Im Konzentrationsbereich von 0 bis 15 mM 1,2-Diol war ein linearer Anstieg beobachtbar. Das bedeutet, dass Diollösungen bei denen eine höhere Konzentration zu erwarten ist verdünnt werden müssen. In Abb. C.6 sind die Ergebnisse der Evaluierung mit verschiedenen Substrat/Produkt Paaren zu sehen und in Abb. C.7 ist die Evaluierung in einer Glas Mikrotiterplatte abgebildet. Das im Falle der Styroloxid/1,2-Phenylethandiol Paars verwendete Kosolvent DMSO störte die Nachweisreaktion nicht.

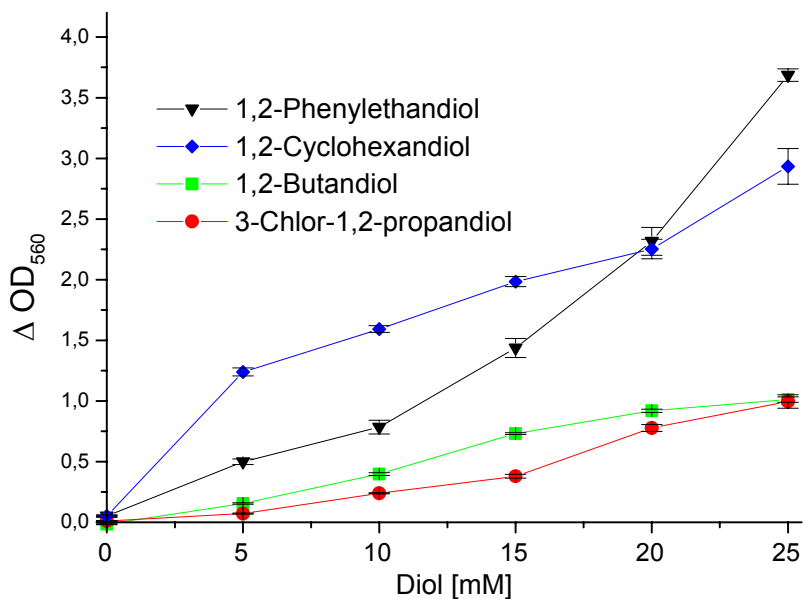


Abb. C.6: Evaluierung des PSS Tests in Glas-MTP. Aufgetragen ist die Absorption bei 560 nm gegen die Diolkonzentration [mM] von 1,2-Phenylethandiol (schwarze Linie), 1,2-Cyclohexandiol (blaue Linie), 1,2-Butandiol (grüne Linie) und 3-Chlor-1,2-Propandiol (rote Linie). Mit steigender Diolkonzentration sinkt die Epoxidkonzentration in gleichen Schritten. Alle Messpunkte um die Absorption der unspezifische Färbung korrigiert.



Abb. C.7: Glas Mikrotiterplatte nach der Durchführung des PSS-Assays. Die Hintergrundkontrollen (Zellysate ohne Substrat) sind mit einem Stern markiert. Daneben die jeweiligen Testkavitäten mit von links nach rechts steigender 3-Chlor-1,2-propandiol Konzentration von 0 mM bis 25 mM, in 5 mM Schritten. Von rechts nach links sinkende Epichlorhydrin Konzentration (mit denselben Stufen).

1.2.2.2 Validierung des PSS-Assays in Polypropylen Mikrotiterplatten

Für einen Einsatz des PSS-Assays im Hochdurchsatz ist die Verwendung von Glas-MTP nicht wünschenswert, da hierfür hohe Investitionskosten entstehen und die Platten gereinigt und wiederverwertet werden müssen. Deshalb wurde die Evaluierung mit Polypropylen Mikrotiterplatten wiederholt.

PP-MTP zeigen keine Trübung durch die Epoxidsubstratlösungen, sind aber nicht optisch klar. Eine Messung einer leeren PP-MTP zeigte aber bei 560 nm keine nennenswerte Absorptionen ($\sim 0,05$ AE). Aufgrund der Erfahrungen in den Glas-MTP konnte davon ausgegangen werden, dass die Grundabsorption der Platte selbst keine Rolle spielt. Die Evaluierung wurde mit den selben Lösungen und unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie oben beschrieben.

Für die Substrat/Produkt Paare Styroloxid/ Phenyl-1,2-ethandiol, 1,2-Epoxybutan/1,2-Butandiol und Epoxycyclohexan/*trans*-1,2-Cyclohexandiol sind die Messwerte im selben Bereich wie in der Validierung mit Glas-MTP (Tab. G.5-Tab. G.7). Allein die Standardfehler sind um ~ 3 % erhöht und liegen nun zwischen 4 und 9 %, bedingt durch die zusätzliche Absorption der PP-MTP. Die Detektionsgrenze wurde in allen Fällen zu 5 mM 1,2-Diol bestimmt.

Die Mischung von Epichlorhydrin/3-Chlor-1,2-propandiol bildete eine Ausnahme (Tab. G.8). Die in PP-MTP gemessenen Standardabweichungen und Standardfehler sind deutlich höher als die in Glas-MTP gemessenen, nämlich zwischen 2- und 10-fach größer als in Glas Platten. Der Standardfehler steigt auf 7 bis 16 %. Dies ist auf das immer noch sehr reaktive 3-Chlor-1,2-propandiol zurückzuführen, das mit der Polypropylenoberflächen interagieren kann.

Die Auftragung der OD_{560} gegen die 1,2-Diolkonzentration ist in Abb. C.8 dargestellt. Abb. C.9 zeigt die Mikrotestplatte nach der Durchführung des PSS-Assays. Wie bei der Validierung des Tests in Glas-MTP (Abb. C.7) ergibt sich ein linearer Zusammenhang im Konzentrationsbereich

von 0 bis 15 mM, im Bereich von 20 bis 25 mM ist keine Linearität mehr zu erkennen. Hier muss also ebenso die 1,2-Diolkonzentration für den PSS Test in diesen Konzentrationsbereich verdünnt werden.



Abb. C.8: PP Mikrotiterplatte nach der Durchführung des PSS-Assays. Die Hintergrundkontrollen sind mit einem Stern markiert (Zelllysat ohne Substrat). Daneben die jeweiligen Testkavitäten mit von links nach rechts steigender 1,2-Phenylethandiol Konzentration von 0 mM bis 25 mM, in 5 mM Schritten. Von rechts nach links sinkende Styroxid Konzentration (mit denselben Stufen).

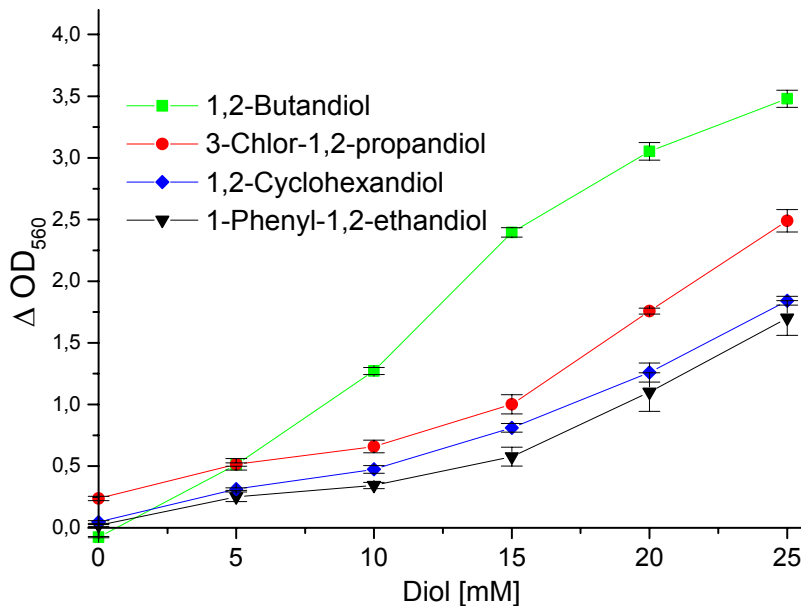


Abb. C.9: Evaluierung des PSS Tests in Polypropylen Mikrotiterplatten. Aufgetragen ist die Absorption bei 560 nm gegen die Diolkonzentration [mM] von 1,2-Phenylethandiol (schwarze Linie), 1,2-Cyclohexandiol (blaue Linie), 1,2-Butandiol (grüne Linie) und 3-Chlor-1,2-Propandiol (rote Linie). Mit steigender Diolkonzentration sinkt die Epoxidkonzentration in gleichen Schritten. Alle Messpunkte um den die Absorptionswerte der unspezifische Färbung korrigiert.

1.2.3 Automatisierung des PSS-Assays

Der Assay wurde auf einen Beckman 2000-Laborroboter mit Greifarm programmiert und dort validiert. Nur die Inkubations- und Zentrifugationsschritte mussten von Hand durchgeführt werden. Trotzdem ist es möglich pro 96er Mikrotiterplatte 48 Tests durchzuführen (Hintergrundkontrolle war immer notwendig) und 20 Mikrotiterplatten pro Tag zu testen. Das ergibt einen Durchsatz von 960 Tests pro Tag. Der Inkubationsschritt über Nacht stellte zwar eine Zeitverzögerung dar, war aber gut in den Ablauf zu integrieren, da hier keine Aufsicht notwendig war.

1.2.4 Nachweis der Epoxidhydrolaseaktivität von *S. antibioticus* TÜ4 mit dem PSS-Assay

Nach der Evaluierung mit vorgemischten Substrat/Produkt Lösungen sollte der Assay mit einer Epoxidhydrolase getestet werden. Als Modell wurde die Epoxidhydrolase aus *S. antibioticus* TÜ4 verwendet. Es war aus den Arbeiten von Zocher *et al.* bekannt, dass Styroloxid sehr gut zu 1,2-Phenylethandiol umgesetzt wird, während 1,2-Epoxybutan nicht hydrolysiert wird.¹⁸ Dazu wurde Zellextrakt von *S. antibioticus* TÜ4 in einer Mikrotiterplatte mit einer Styroloxidstammlösung (Endkonzentration: 25 mM) versetzt und bei RT inkubiert. Nach 3, 6 und 9 h wurde dann der PSS-Assay durchgeführt. Wie in Abb. C.10 deutlich zu sehen ist steigt die Produktkonzentration mit der Zeit an. Dasselbe Experiment wurde mit 1,2-Epoxybutan durchgeführt und dabei ist kein Umsatz nachweisbar. Damit konnte gezeigt werden, dass der PSS-Assay dazu geeignet ist das Substratspektrum einer Epoxidhydrolase zu bestimmen.

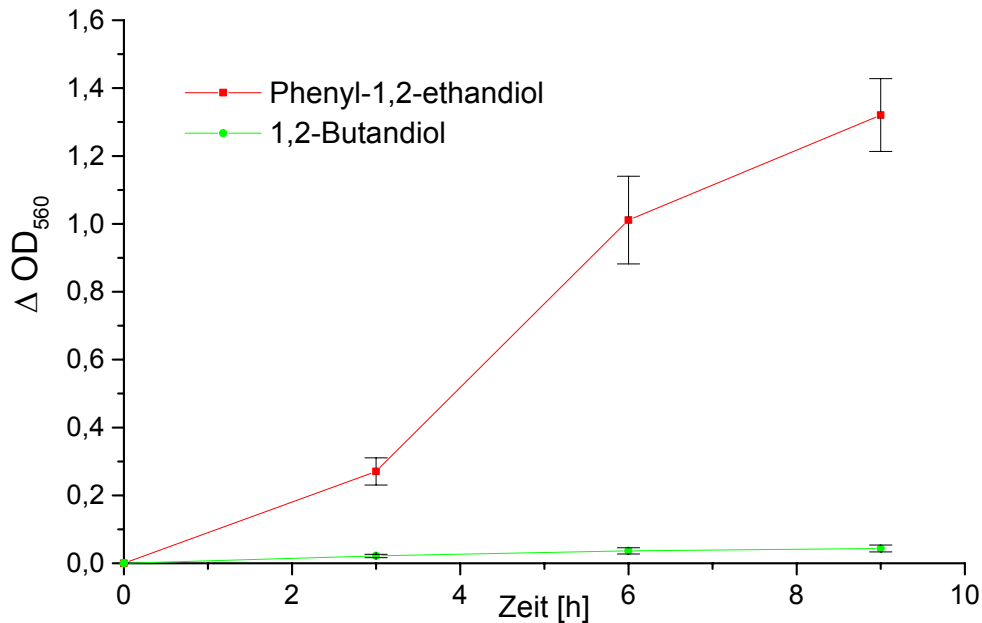


Abb. C.10: Verlauf der Biotransformation von Styroloxid zu 1,2-Phenylethandiol (rote Linie), 1,2-Epoxybutan zu 1,2-Butandiol (grüne Linie) durch *Streptomyces antibioticus* TÜ4 Zellextrakt.

1.3 Nachweis von Periodat mit Carboxyfluorescein

Der in Kapitel 1.2.1 dargestellte Nachweis der Spaltprodukte der Natriumperiodatspaltung hat drei limitierende Faktoren:

1. Nur Aldehyde als Spaltprodukte sind nachweisbar.
2. Der Nachweis beruht auf einer Absorptionsmessung, daher wird mindestens ein Zentrifugationsschritt notwendig um die Trübung zu entfernen.
3. Die Durchführung ist zeitaufwendig, da eine lange Inkubation zur Entwicklung der Färbung notwendig ist.

Abhilfe konnte durch die Detektion des nach der Periodatspaltung noch im Reaktionsgemisch vorhandene Periodat erzielt werden. Die Menge von Periodat im Reaktionsgemisch ist umgekehrt proportional zur in der Hydrolyse gebildeten *vicinalen* Diol. Damit kann der 1,2-Diolgehalt der Testlösung darüber bestimmt werden.

Ein zum Periodat äquivalentes Reagenz ist Blei(IV)-acetat. Mit diesem Reagenz können *vicinale* Diole ebenfalls oxidativ zu Aldehyden und Ketonen gespalten werden. Blei(IV)-acetat wird in dieser Reaktion zu Blei(II)-acetat reduziert. In der Reaktionsmischung verbliebenes Blei(IV)-

acetat zerstört die Fluoreszenz von 2',7'-Dichlorfluorescein,²⁰³⁻²⁰⁵ kann somit als Detektionsreagenz verwendet werden und erlaubt so die Aussage über die Konzentration des gebildeten Produkts. Analoges wird für alle auf Fluorescein beruhenden Fluoreszenzfarbstoffen berichtet.²⁰³ Dieses Prinzip konnte nun verwendet werden um, die Periodatkonzentration der Lösung zu bestimmen und so als indirektes Maß für den, durch die Epoxidhydrolaseaktivität entstanden, 1,2-Diolgehalt dienen. Es konnte gezeigt werden, dass eine Fluorescein-Lösung bei erhöhter Temperatur durch eine 0,09 M Natriumperiodat-Lösung seine Fluoreszenz innerhalb von Minuten verliert. Nach weiteren Vorversuchen mit Fluorescein und 2',7'-Dichlorfluorescein stellte sich heraus, dass das Reaktionsprinzip passend war. Diese beiden Fluoreszenzfarbstoffe waren jedoch nicht geeignet, da sie nur sehr begrenzt in Wasser löslich sind. Eine Lösung für dieses Problem war die Verwendung von Carboxyfluorescein, welches in Wasser bei pH 8 besser löslich ist und ebenfalls durch Periodat zerstört wird. Um zu zeigen, dass das 2. Spaltprodukt Natriumiodat nicht stört, wurde eine 0,09 M Natriumiodatlösung mit einer Carboxyfluorescein-Lösung vermischt. Dabei wurde die Fluoreszenz der Carboxyfluorescein-Lösung nicht beeinträchtigt. Damit konnte gezeigt werden, dass das zweite Spaltprodukt den Nachweis nicht stört.

Dies führte zu einem neuen Assayansatz, der nach der Periodatspaltung der vicinalen Dirole, das verbliebene Periodat durch Carboxyfluorescein nachweist (PSC-Assay). Je mehr 1,2-Diol durch die Epoxidhydrolase entstanden ist, je weniger Periodat bleibt nach der Spaltung übrig, je weniger Fluoreszenzfarbstoff wird zerstört, je höher ist die gemessene Fluoreszenz (Abb. C.11). Somit ist die Fluoreszenz proportional zur Epoxidhydrolaseaktivität.

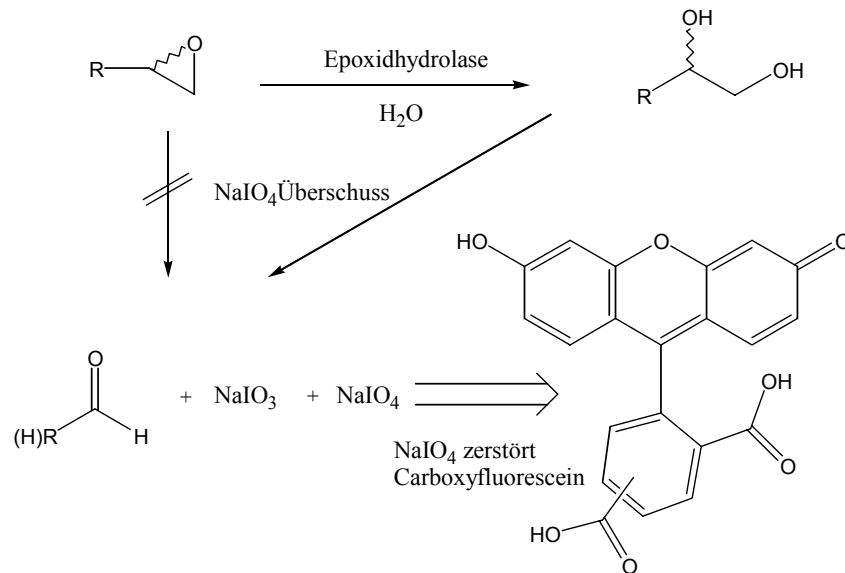


Abb. C.11 Reaktionsschema des Epoxidhydrolase Aktivitätstests mit Periodatspaltung und Detektion durch Carboxyfluorescein (PSC-Assay).

1.3.1 Validierung des PSC Testformates

Zur Validierung des PSC-Assays wurde analog zur Validierung des PSS-Assays vorgegangen. Da die Detektion durch Fluoreszenz erfolgte, spielte die durch die Epoxidlösungen verursachte Trübung der PS Mikrotiterplatten keine Rolle, da sie die Fluoreszenzmessung an der Oberfläche der Lösungen nicht beeinträchtigt. Somit konnte ausschließlich in schwarzen PS Mikrotiterplatten gearbeitet werden.

Es wurden Substrat/Produkt-Lösungen von Styroloxid/1,2-Phenylethandiol, 1,2-Epoxybutan/1,2-Butandiol, 1,2-Epoxyhexan/*trans*-1,2-cyclohexandiol, Epichlorhydrin/3-Chlor-1,2-propandiol, 1,2-Epoxyhexan/1,2-Hexandiol, und 2,3-Epoxybutan/2,3-Butandiol verwendet. Alle Lösungen wurden in den Verhältnissen gemischt, um die Umsatzpunkte 0, 20, 40, 60, 80 und 100% zu simulieren. Zu diesen Lösungen wurden dann 1,08 eq Natriumperodat gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Danach wurde Carboxyfluorescein-Lösung zugegeben und 2 h bei 70°C inkubiert.

In den Fällen von 1,2-Epoxybutan/1,2-Butandiol (Abb. C.12, schwarze Linie), 1,2-Epoxyhexan/1,2-Hexandiol (Abb. C.12, rote Linie), Epichlorhydrin/3-Chlor-1,2-propandiol (Abb. C.12, grüne Linie), Epoxyhexan/*trans*-1,2-Cyclohexandiol (Abb. C.12, blaue Linie) und 2,3-Epoxybutan/2,3-Butandiol (Abb. C.12, türkise Linie) ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der *vicinalen* Diolkonzentration und der gemessenen Fluoreszenz. Die Validierung mit Styroloxid/1,2-Phenylethandiol zeigte keinen Zusammenhang zwischen der 1,2-

Diolkonzentration und der Fluoreszenz. Es wurde ein immer gleichbleibend hoher Fluoreszenzwert, unabhängig von der 1,2-Phenylethandiolkonzentration, gemessen (nicht abgebildet).

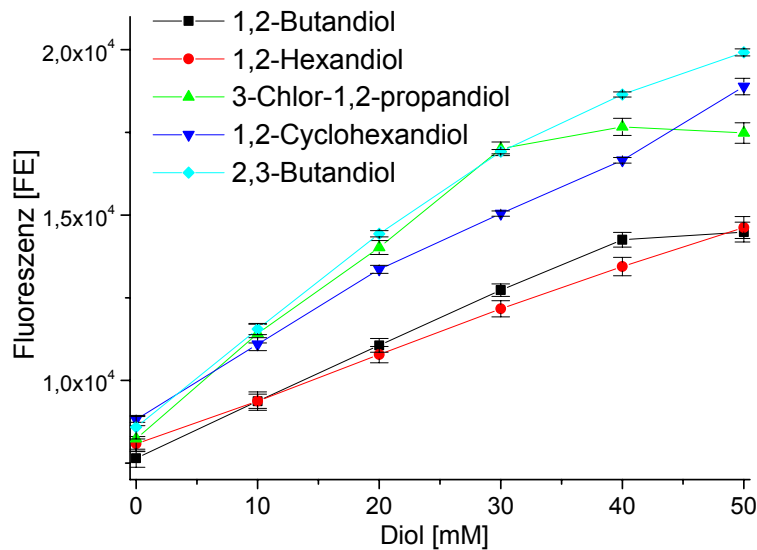


Abb. C.12: Evaluierung des PSC Tests in Mikrotiterplatten. Aufgetragen ist die Fluoreszenz bei 515 nm (Anregung 480 nm) gegen die Diolkonzentration [mM] von 1,2-Butandiol (schwarze Linie), 1,2-Hexandiol (rote Linie), 3-Chlor-1,2-Propandiol (grüne Linie), *trans*-1,2-Cyclohexandiol (blaue Linie) und 2,3-Butandiol (türkise Linie). Mit steigender Diolkonzentration sinkt die Epoxidkonzentration in gleichen Schritten.

Die Messwerte sind in den Tab. G.9-Tab. G.13 zusammengefasst. Für alle getesteten Substrat/Produkt Paare in Abb. C.12 sind die Standardabweichungen $\sim 10\%$ der Messwerte und somit ergab sich die Detektionsgrenze zu mind. 10 mM Diol. Die Standardfehler lagen in einem Bereich von 0,4 bis 4,7 % und waren somit absolut ausreichend.

In Abb. C.13 ist eine Photographie unter UV-Licht einer MTP nach der Durchführung des PSC-Assays zu sehen. Deutlich ist die von links nach rechts anwachsende Fluoreszenz zu sehen.

Die Validierung wurde mit 1,2-Epoxybutan/1,2-Butandiol und *trans*-Stilbenoxid/Hydrobenzoin im kleineren Konzentrationsbereich wiederholt, um das Detektionslimit genauer zu bestimmen. Es wurde wiederum 1,08 eq Natriumperodat-Lösung zur Spaltung verwendet nach 10 min Inkubation bei RT mit Carboxyfluorescein-Lösung versetzt. Tab. G.14 zeigt die Messwerte für 1,2-Epoxybutan/1,2-Butandiol und Tab. G.15 zeigt die für *trans*-Stilbenoxid/Hydrobenzoin. Die Standardfehler lagen durchweg unter 2 % und die errechnete Standardabweichung ist in beiden Fällen unter 10 % des Messwertes. Die Detektionsgrenze lag bei 1 mM *vicinalem* Diol.

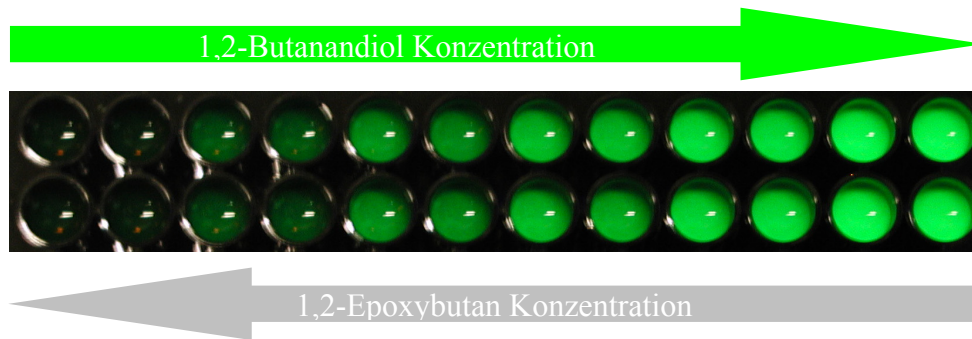


Abb. C.13: MTP nach der Durchführung des PSC-Assays. Jeweils 2 Testkavitäten mit von links nach rechts steigender 1,2-Butanandiol Konzentration von 0 mM bis 50 mM, in 10 mM Schritten. Von rechts nach links sinkende 1,2-Epoxybutan Konzentration (mit denselben Stufen).

Die Auftragung der Fluoreszenz gegen die 1,2-Diolkonzentration zeigte einen linearen Zusammenhang (Abb. C.14). Damit ist der PSC-Assay bei besseren Standardfehlern um den Faktor 10 empfindlicher als der PSS-Assay.

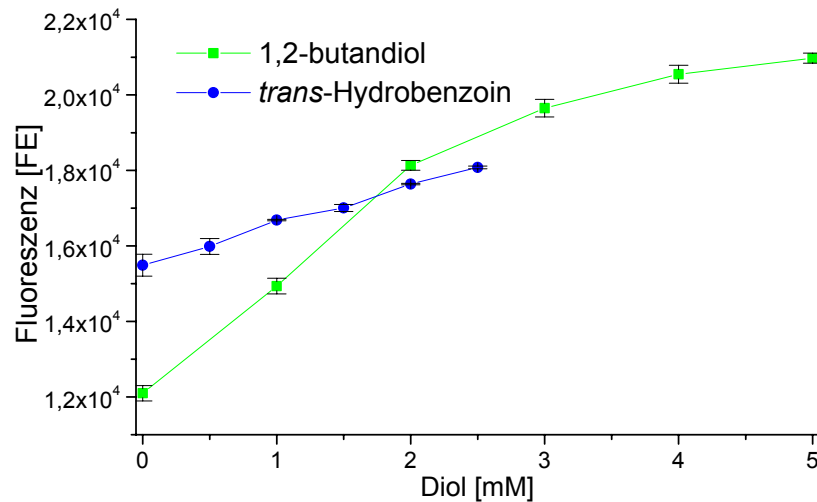


Abb. C.14: Evaluierung des PSC Tests in Mikrotiterplatten. Aufgetragen ist die Fluoreszenz bei 515 nm (Anregung 480 nm) gegen die Diolkonzentration [mM] von 1,2-Butanandiol (grüne Linie) und Hydrobenzoin (blaue Linie). Mit steigender Diolkonzentration sinkt die Epoxidkonzentration in gleichen Schritten.

1.3.2 Kosolventien im PSC-Assay

Bei der Validierung mit Styroloxid/1,2-Phenylethandiol konnte kein Zusammenhang zwischen der 1,2-Diolkonzentration und der Fluoreszenz erkannt werden. Um die, unabhängig von der 1,2-

Phenylethdiolkonzentration, hohe Fluoreszenz zu verstehen, wurde der PSC-Assay mit Verdünnungsreihen verschiedener Lösungsvermittler durchgeführt.

Eine Verdünnungsreihe von 5 % - 0,16 % (V/V) Aceton, Ethanol, DMF und DMSO in Wasser wurde wie oben beschrieben mit Natriumperiodat behandelt und danach Carboxyfluorescein-Lösung zugegeben. Nach 2 stündiger Inkubation bei 70°C wurde die Fluoreszenz vermessen. Wie in Abb. C.15 zu sehen ist, zeigten die Kosolventien Aceton (grüne Linie), EtOH (rote Linie) und DMF (blaue Linie) eine gleichbleibend niedrige Fluoreszenz. Das bedeutet sie stören den PSC Test nicht, indem sie Periodat verbrauchen. Mit steigendem DMSO Anteil stieg auch die gemessene Fluoreszenz an, d. h. DMSO wird durch Natriumperiodat oxidiert und somit wird Carboxyfluorescein nicht mehr zerstört. DMSO ist dadurch kein geeigneter Lösungsvermittler.

Da für die Herstellung der Stammlösungen von Styroloxid DMSO (5% (V/V)) als Kosolvent verwendet wurde, konnte keine Abhängigkeit der Fluoreszenz von der 1,2-Phenylethandiolkonzentration gemessen werden.

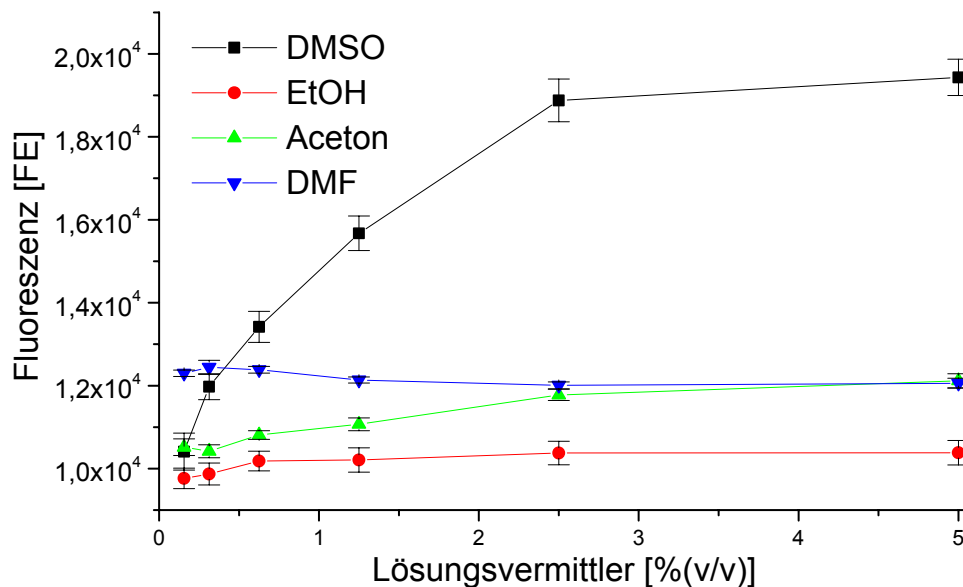


Abb. C.15: PSC Test mit verschiedenen Lösungsvermittlern. Aufgetragen ist die Fluoreszenz bei 515 nm (Anregung 480 nm) gegen den prozentualen Anteil von DMSO (schwarze Linie), EtOH (rote Linie), Aceton (grüne Linie) und DMF (blaue Linie).

1.3.3 Automatisierung des PSC-Assays

Der Assay wurde auf einen Beckman 2000-Laborroboter mit Greifarm programmiert und dort validiert. Nur der Inkubationsschritt bei 70°C musste von Hand durchgeführt werden. Trotzdem ist es möglich pro 96er Mikrotiterplatte 96 Tests durchzuführen (Hintergrundkontrolle war nicht

notwendig) und 20 Mikrotiterplatten pro Tag zu testen. Das ergibt einen Durchsatz von 1960 Tests pro Tag.

2 Substratsuche für putative Epoxidhydrolasen aus *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* und *Momordica Charantia*

Drei DNA Sequenzen, die für putative Epoxidhydrolasen aus *Bacillus subtilis* 168, *Corynebacterium glutamicum* und *Momordica charantia* kodieren, wurden von der BASF AG zur Verfügung gestellt. Die Gene von *B. subtilis* und *C. glutamicum* wurden in dem Vektor pQE-30 Vektor, unter einem T5-Promotor kloniert und dann als pBS3000 (Plasmidkarte s. Abb. C.19, DNA Sequenz s. Kapitel G5.1.1) und pCG3000 (Plasmidkarte s. Abb. C.20, DNA Sequenz s. Kapitel G5.2.1) bezeichnet. Diese zeigten in *E. coli* keine funktionelle Expression, bei der Untersuchung der epoxidhydrolytischen Aktivität gegenüber Styroloxid.

Das Epoxidhydrolasegen aus *M. charantia* wurde im Vektor pBluescriptSK(-) kloniert und als p93momo12H05 (Plasmidkarte s. Abb. C.16, DNA Sequenz s. G5.3.1) erhalten.

Eine Epoxidhydrolaseaktivität ganzer Zellen, bzw. von Zellaufschlüssen von *B. subtilis* und *C. glutamicum* war nicht bekannt. Über die Expression, Lokalisierung und Funktion der Epoxidhydrolase aus *M. charantia* (dt: Balsambirne) war ebenfalls nichts bekannt.

2.1 Datenbanken Analyse

Die Suche in „GeneBank“ mit den BLASTX Tool ergab für alle drei Sequenzen hauptsächlich als Epoxidhydrolasen, bzw. putative Epoxidhydrolasen annotierte Treffer. Die E-Werte für die Treffer waren durchweg kleiner 10^{-20} .

Tab. C.1 zeigt die Zahl der Treffer die als Epoxidhydrolase annotiert waren und den Bereich des E-Wertes vom besten zum schlechtesten Treffer. Diesen Daten waren die ersten Hinweise, dass anhand von Sequenzhomologie bei den drei Sequenzen von Epoxidhydrolasen ausgegangen werden musste.

Tab. C.1: Zahl der Treffer und der Bereich der E-Werte bei der BLASTX Suche mit den Proteinsequenzen der putativen Epoxidhydrolasen aus *B. subtilis* 168, *C. glutamicum* und *M. charantia* in „GeneBank“.

Proteinsequenz	Treffer	E-Wert
Epoxidhydrolase <i>B. subtilis</i> 168	48	$3 \cdot 10^{-58}$ - $3 \cdot 10^{-16}$
Epoxidhydrolase <i>C. glutamicum</i>	47	$2 \cdot 10^{-21}$ - $2 \cdot 10^{-9}$
Epoxidhydrolase <i>M. charantia</i>	50	$1 \cdot 10^{-119}$ - $6 \cdot 10^{-10}$

Um die Sequenzen besser einordnen zu können wurden paarweise Proteinalignements mit bekannten Epoxidhydrolasen aus *Agrobacterium radiobacter*, *Aspergillus niger*, *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana* und *Corynebacterium* sp. 12 und den drei putativen Epoxidhydrolasen durchgeführt. Die Epoxidhydrolasesequenz aus *B. subtilis* zeigte eine 27,9 % Sequenzidentität zu der Epoxidhydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* und eine 29,4 % Identität zu der Epoxidhydrolase aus *Corynebacterium* sp. 12. Die Sequenz aus *C. glutamicum* zeigte eine 24,5 % Sequenzidentität zu der Epoxidhydrolase aus *Arabidopsis thaliana* und eine 23,5 % Identität zur Epoxidhydrolase aus *Corynebacterium* sp. 12. Die Epoxidhydrolase aus *M. charantia* zeigte eine mit 56,4 % hohe Sequenzidentität zur Epoxidhydrolasesequenz aus *Arabidopsis thaliana* (Tab. C.2). Da die Proteinsequenzen, wie ebenfalls in Tab. C.2 zu sehen ist, der bekannten Epoxidhydrolasen Sequenzidentitäten von ~20 % besitzen konnte zu Beginn der Arbeiten davon ausgegangen werden, dass die vorliegenden Gene aufgrund ihrer Sequenz als Epoxidhydrolasen eingestuft werden müssen.

Tab. C.2: Paarweises Alignment der Proteinsequenzen von Epoxidhydrolasen aus *B. subtilis* 168 (EH BS), *C. glutamicum* (EH CG), *M. charantia* (EH MC), *A. radiobacter* (EH AR), *Aspergillus niger* (EH AN), *Mus musculus* (EH MM), *Arabidopsis thaliana* (EH AT) und *Corynebacterium* sp. 12 (EH C12). Angegeben ist die Sequenzidentität in Prozent.

	EH BS	EH CG	EH MC	EH AR	EH AN	EH MM	EH AT	EH C12
EH BS		23,8 %	30,0 %	27,9 %	19,0 %	17,9 %	31,3 %	29,4 %
EH CG	23,8 %		22,7 %	21,8 %	20,8 %	18,1 %	24,5 %	23,5 %
EH MC	30,0 %	22,7 %		27,7 %	17,9 %	18,4 %	56,4 %	28,0 %
EH AR	27,9 %	21,8 %	27,7 %		17,7 %	16,0 %	27,9 %	30,5 %
EH AN	19,0 %	20,8 %	17,9 %	17,7 %		18,6 %	19,8 %	18,4 %
EH MM	17,9 %	18,1 %	18,4 %	16,0 %	18,6 %		20,2 %	16,4 %
EH AT	31,3 %	24,5 %	56,4 %	27,9 %	19,8 %	20,2 %		26,8 %
EH C12	29,4 %	23,5 %	28,0 %	30,5 %	18,4 %	16,4 %	26,8 %	

2.2 pQE-30 Konstrukte

2.2.1 Klonierung der pQE-30 Konstrukte

Die Epoxidhydrolasegene aus *B. subtilis* 168 und *C. glutamicum* lagen bereits in pQE-30 kloniert vor. Beide waren so in die Multiple cloning site eingefügt, dass ein Fusionsprotein aus einem 6xHis Tag am N-Terminus und der Epoxidhydrolase exprimiert wird. Das Epoxidhydrolasegen aus *M. charantia* lag im pBluescriptSK(-) Vektor als Fusionsprotein mit β -Galactosidase vor. Um eine mit den anderen Konstrukten vergleichbare Expression zu erhalten, wurde das Epoxidhydrolasegen aus *M. charantia* in den pQE-30 Vektor kloniert. Dazu wurde das Gen mit den Primern MomoF und MomoR (s. Tab. B.4) mit einer Annealingtemperatur von 62°C durch PCR amplifiziert (Ansatz und PCR Bedingungen s. Tab. B.19 und Tab. B.20). Dabei wurde am 3'-Ende eine *Bam*HI und am 5'-Ende eine *Acc*65I Schnittstelle eingefügt, um das Gen im gleichen Leseraster wie den am N-Terminus liegenden His-Tag in die multiple cloning site einzusetzen. Das PCR Produkt wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und dann mit *Bam*HI und *Acc*65I 1,5 h bei 37°C verdaut und danach wieder über ein Agarosegel aufgereinigt. Der Vektor pQE-30 wurde ebenfalls 1,5 h bei 37°C mit denselben Restriktionsenzymen gespalten und danach 1 h mit CIAP dephosphoryliert. Nach der Aufreinigung des gespaltenen Vektors über Agarosegel wurde das vorbereitete Insert mit dem geschnittenen Vektor ligiert und in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue transformiert. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. C.16 dargestellt. Das erhaltene pMO3000 Konstrukt wurde mit den Primern pQEIII/IV und pQErev (s. Tab. B.4) sequenziert.

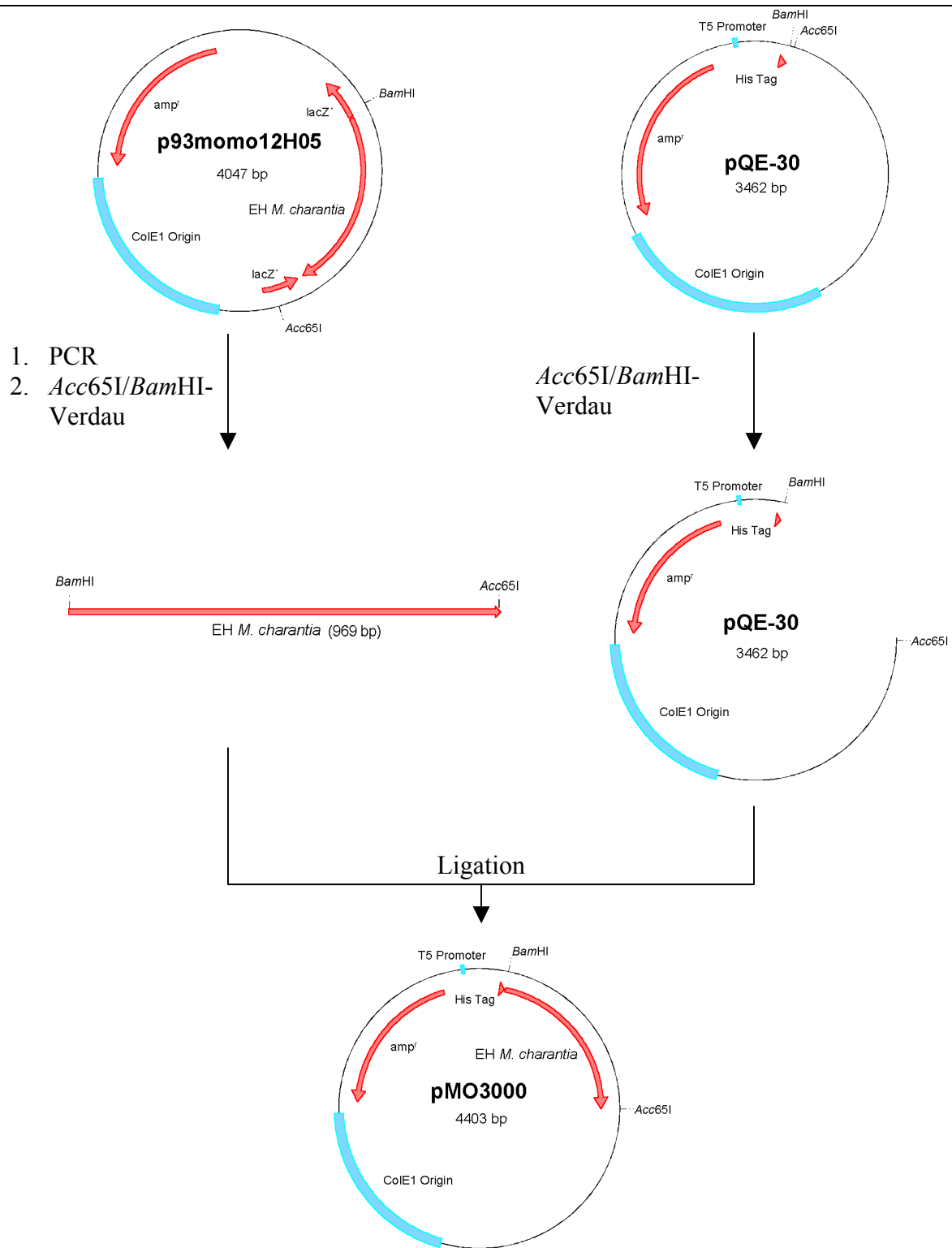


Abb. C.16: Klonierung des Konstruktes pMO3000.

2.2.2 Heterologe Expression der Epoxidhydrolasen von *B. subtilis*, *C. glutamicum* und *M. charantia* in *E. coli*

Die Ausgangsinformation war, dass für die erhaltenen Konstrukte keine heterologe Expression nachweisbar ist. Deshalb wurde im ersten Schritt, die Konstrukte pBS3000, pCG3000 und pMO3000 in *E. coli* XL1-Blue exprimiert.

Dazu wurde die Plasmide in chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue transformiert und jeweils eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin als Selektionsmarker über Nacht kultiviert. Aus dieser Übernachtskultur wurden 50 ml LB-Medium mit Ampicillin inokuliert und kultiviert. Bei einer OD₅₆₀ von 0,8 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM induziert. Es wurden stündlich Proben entnommen und durch eine SDS-PAGE die Expression überprüft. Abb. C.17 zeigt den Expressionsverlauf der Epoxidhydrolase aus *B. subtilis*.

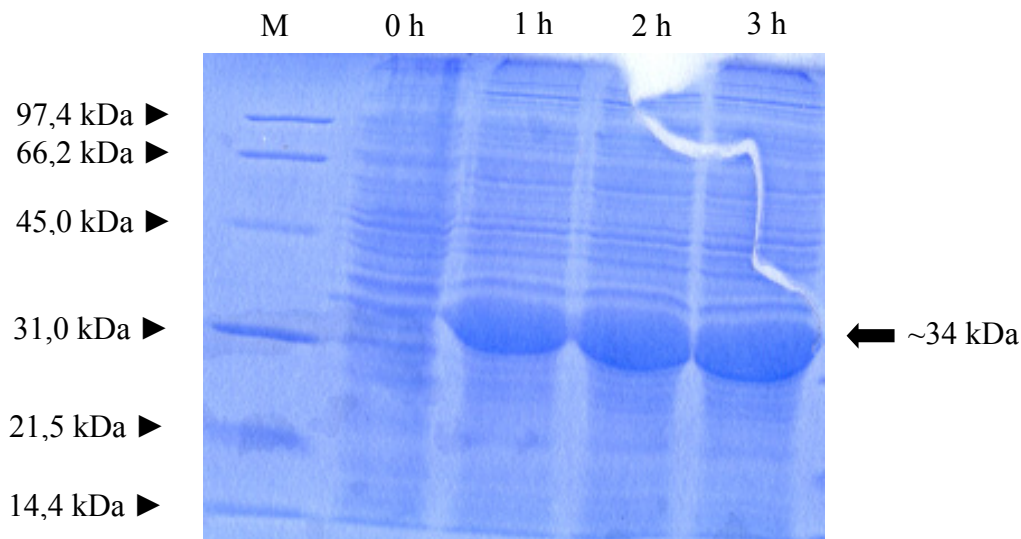
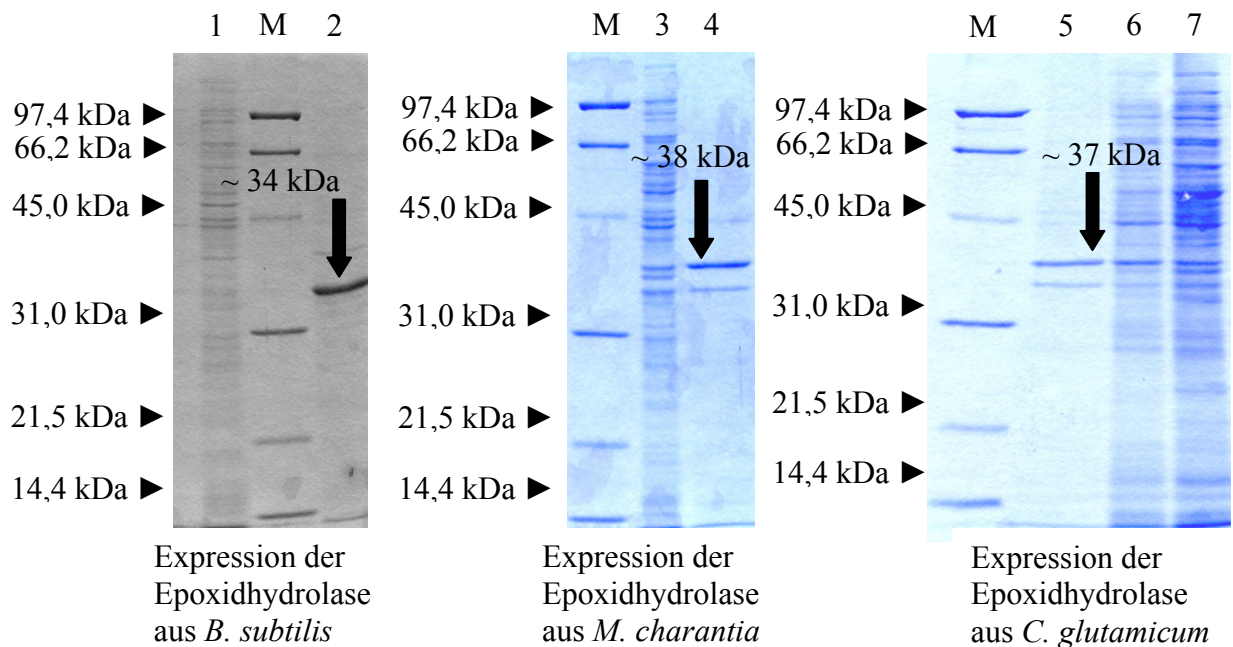


Abb. C.17: Expression der Epoxidhydrolase von *B. subtilis* in *E. coli* XL1Blue pBS3000 beim Zeitpunkt der Induktion und nach 1 - 3 h nach der Induktion. Der Pfeil zeigt auf die Proteinbande.

Es war eine deutliche Überexpression aller putativer Epoxidhydrolasen zu erkennen (SDS-Page von *C. glutamicum* in *E. coli* XL1Blue pCG3000 und *M. charantia* in *E. coli* XL1Blue pMO3000



nicht gezieht). Um zu überprüfen in welcher Form die Proteine in *E. coli* produziert wurden, wurden die Zellen nach der Expression mit Ultraschall aufgeschlossen. Nachdem die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt wurden, wurde der klare Überstand und das Pellet getrennt durch eine SDS-PAGE analysiert.

Abb. C.18: Expression von *E. coli* XL1-Blue pBS3000, *E. coli* XL1-Blue pMO3000 und *E. coli* XL1-Blue pCG3000. Spur M: Proteingrößenstandard; Spur 1,3,6,7: Überstand nach Zellaufschluss mit Ultraschall; Spur 2,4,5: Pellet nach Zellaufschluss mit Ultraschall. Der Pfeil zeigt auf die jeweilige Proteinbande.

In allen Fällen war nur im unlöslichen Pellet rekombinantes Protein nachweisbar (Abb. C.18). Es konnte kein Protein in der löslichen Phase nachgewiesen werden. Der sehr starke T5-Promotor, der die Expression im pQE-30 Vektoren kontrolliert, führt sehr häufig zu einer Expression in Form von Inclusion Bodies. Diese unlöslichen Aggregate zeigen mit Sicherheit keine Epoxidhydrolaseaktivität, da diese funktionell in löslicher Form vorliegen. Aus diesem Grund wurde der Expressionsvektor gewechselt.

2.3 pET20b+ Konstrukte

Der Vektor pET20b+ wurde als Expressionsvektor ausgewählt, da er einige Vorteile bietet. Die Expression erfolgt mit diesem Vektor unter der Kontrolle des Phagenpromotors T7, der eine gute Expressionsrate ermöglicht. Die Expression wird durch die T7 RNA Polymerase, die normalerweise in *E. coli* nicht chromosomal kodiert ist, eingeleitet. Weiterhin wird auf dem Vektor N-terminal die 20 Aminosäuren lange *pelB* Sequenz bereitgestellt. Ist diese Sequenz dem zu exprimierenden Gen in gleichen Leseraster vorangestellt, wird das Genprodukt möglicherweise ins Periplasma transportiert. Da der Transportprozess noch nicht in vollem Umfang aufgeklärt wurde, kann die Lokalisation nicht vorhergesagt werden.²⁰⁶

In den meisten Fällen kann jedoch die Löslichkeit der Zielproteine durch den Transport in Periplasma verbessert werden, da dort völlig andere Bedingungen herrschen. Im Gegensatz zum Cytosol liegen hier oxidierende Bedingungen vor und die Proteinkonzentration ist deutlich geringer. Beide Faktoren begünstigen in der Regel die Proteinfaltung.²⁰⁷⁻²⁰⁹

2.3.1 Klonierung der pET20b+ Konstrukte

Alle pET20b+ Konstrukte wurden mit einer ähnlichen Klonierungsstrategie erzeugt. Das Epoxidhydrolasegen wurde mit spezifischen Primer aus den pQE-30 Plasmiden als Template amplifiziert. Die Primer waren so konstruiert, dass Schnittstellen so an die Enden der PCR Produkte angehängt wurden, dass sowohl die *pelB* Sequenz am N-Terminus, als auch der 6xHis-Tag am C-Terminus, im selben Leseraster lagen. Das Konstrukt mit dem Gen aus *B. subtilis* wurde mit den Primern pETBSF und pETBSR (s. Tab. B.4) amplifiziert und mit den Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Zielvektor eingesetzt. Die Strategie und das Produkt pETBS ist in Abb. C.19 zu sehen.

Das Epoxidhydrolasegen aus *C. glutamicum* wurde mit den Primern pETCGF und pETCGR (s. Tab. B.4) amplifiziert und mit den Schnittstellen *NcoI* und *EcoRI* in den pET20b+ Vektor eingefügt. Die Strategie und das Produkt pETCG ist in Abb. C.20 zu sehen.

Die Epoxidhydrolase aus *M. charantia* wurde mit den Primern pETMOF und pETMOR (s. Tab. B.4) amplifiziert und mit den Schnittstellen *BamHI* und *XhoI* in den Zielvektor eingefügt. Die Klonierungsstrategie und das Konstrukt pETBS ist in Abb. C.21 zu sehen. Die Konstrukte wurden mit dem T7P und T7T Primern (s. Tab. B.4) sequenziert und so kontrolliert.

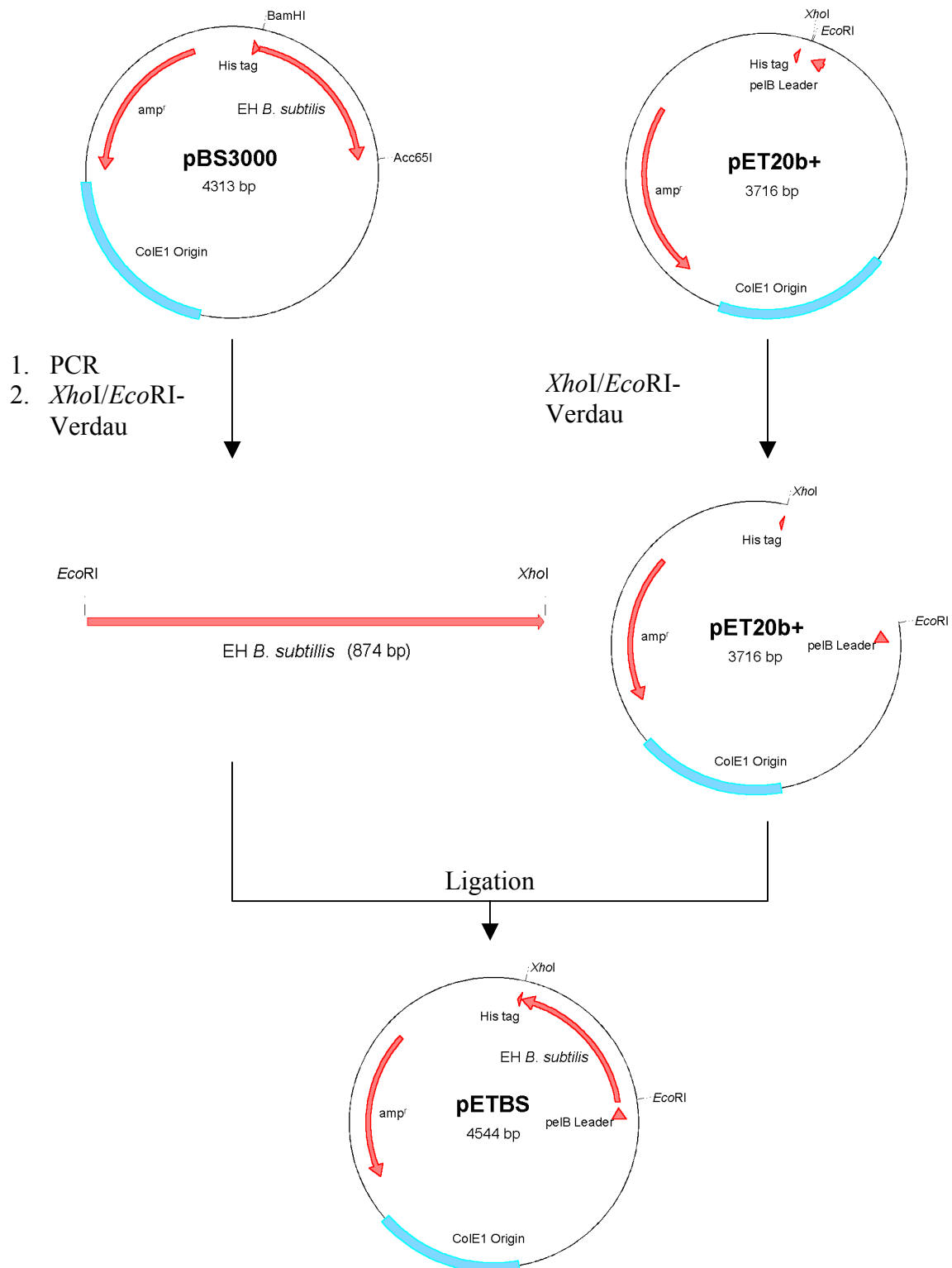


Abb. C.19: Klonierung des Konstruktes pETBS.

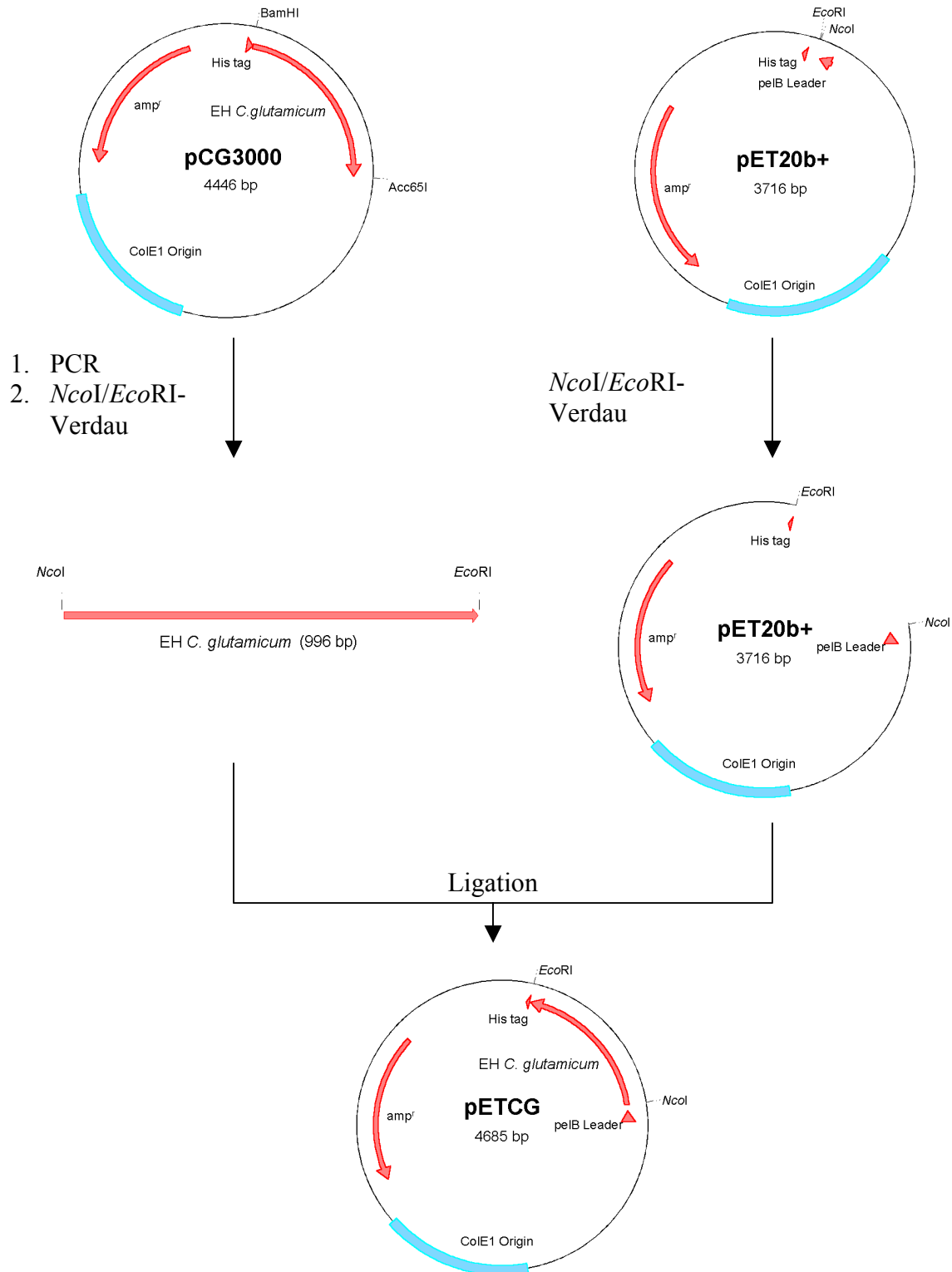


Abb. C.20: Klonierung des Konstruktes pETCG.

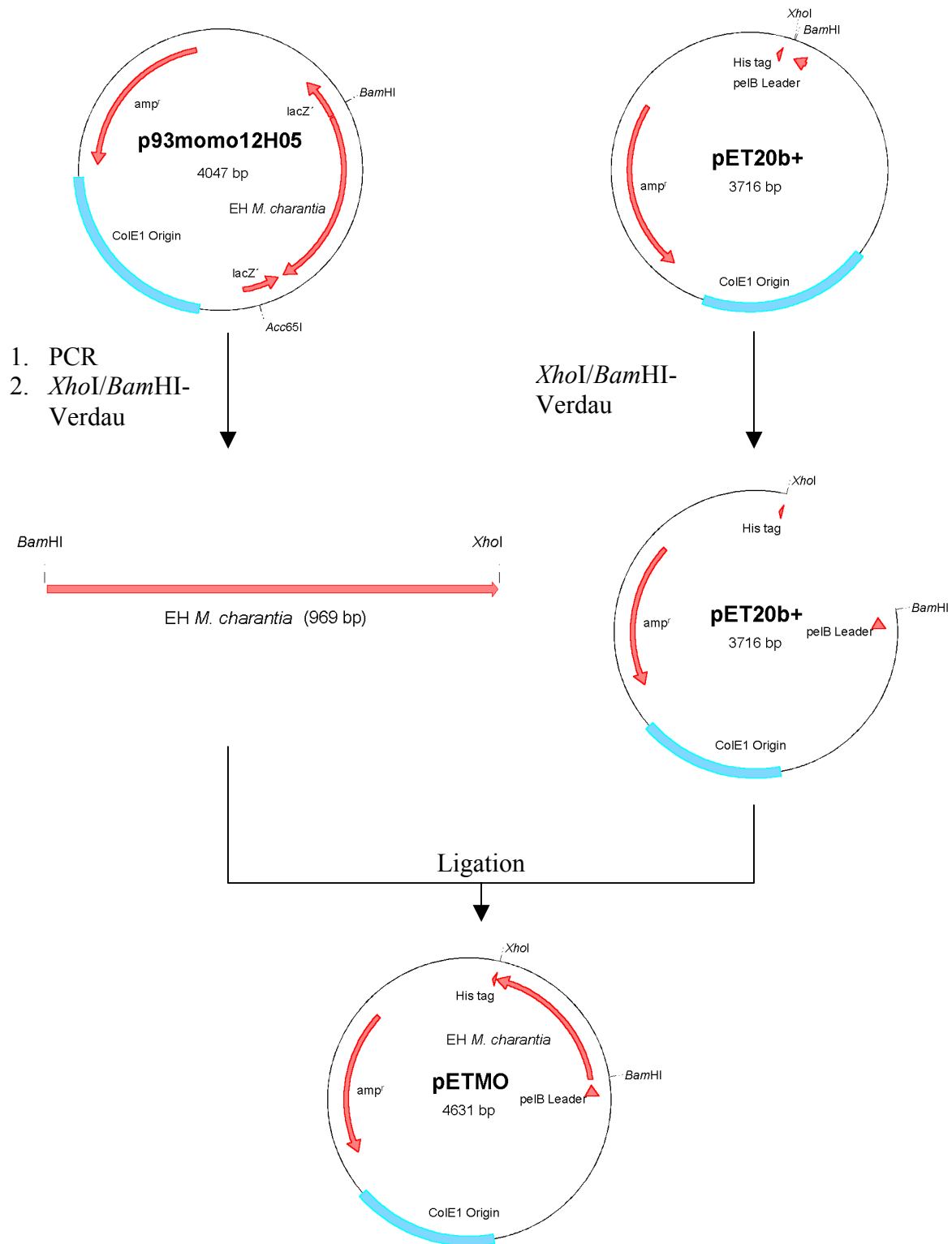


Abb. C.21: Klonierung des Konstruktes pETMO.

2.3.2 Heterologe Expression der Epoxidhydrolasen von *B. subtilis*, *C. glutamicum* und *M. charantia* in *E. coli*

Die Plasmide pETBS, pETCG und pETMO wurden in *E. coli* BL21(DE3) transformiert und jeweils eine Einzelkolonie wurde über Nacht in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum kultiviert. Damit wurden 50 ml LB-Medium 1:100 inokuliert und bis zu einer OD_{560} von 0,8 kultiviert. Danach wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. In Abb. C.22 ist der Expressionsverlauf der Epoxidhydrolase aus *C. glutamicum* zu sehen. Eine Stunde nach Induktion war auf einem SDS-PAGE eine deutliche Überexpression zu erkennen.

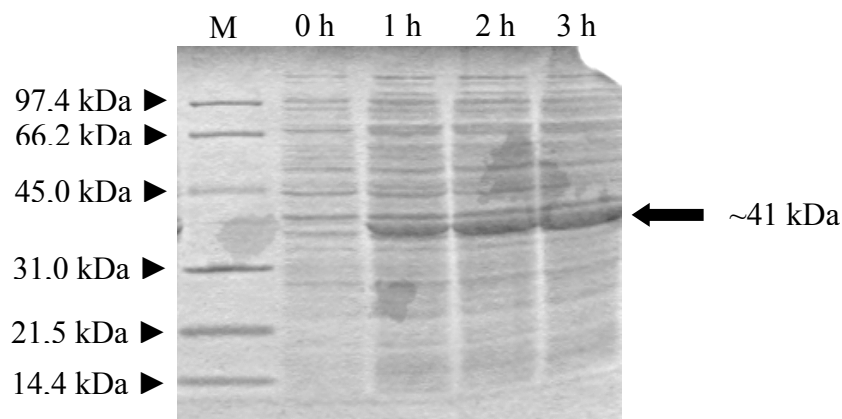


Abb. C.22: Expression der Epoxidhydrolase aus *C. glutamicum* in *E. coli* BL21(DE3). Neben dem Proteingrößenstandard (M) sind die Zeitpunkte 0, 1, 2 und 3 h nach der Induktion aufgetragen. Der Pfeil zeigt auf die entstehende Proteinbande.

Die beiden anderen Epoxidhydrolasen, kloniert in pET20b+ und exprimiert in *E. coli* BL21(DE3), zeigten das gleiche Verhalten. Um zu überprüfen ob sich jetzt lösliches Protein gebildet hatte, wurde die Zellen aufgeschlossen und die Trümmer abzentrifugiert. Überstand und Pellet wurden getrennt auf mit einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Epoxidhydrolase aus *B. subtilis* kloniert in pET20b+, zeigte eine schwache Expression von rekombinantem Protein nur im Überstand. Für die Epoxidhydrolasen aus *C. glutamicum* und *M. charantia* konnte eine deutlich erkennbare Überexpression der Genprodukte sowohl im Pellet als auch im Überstand nachgewiesen werden (Abb. C.23).

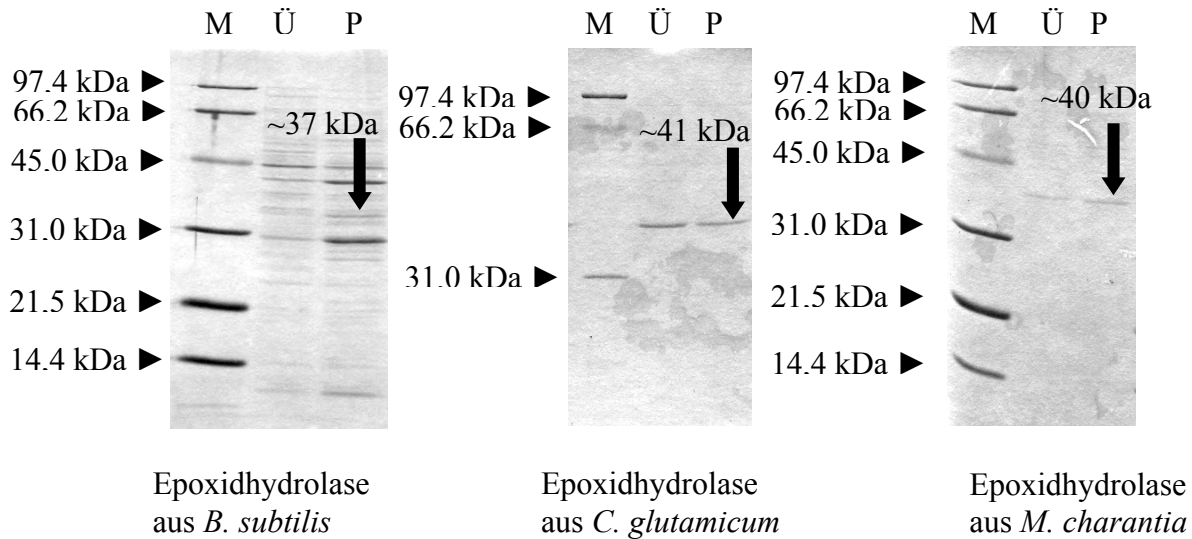


Abb. C.23: Expression der Epoxidhydrolase aus *B. subtilis*, *C. glutamicum* und *M. charantia* in *E. coli* BL21(DE3). Spur M: Proteingrößenstandard; Spur Ü: Überstand nach Zellaufschluss mit Ultraschall; Spur P: Pellet nach Zellaufschluss mit Ultraschall. Der Pfeil zeigt auf die jeweilige Proteinbande.

Die Periplasmafraktion der *E. coli* BL21(DE3) wurde ebenfalls untersucht. Die Periplasmafraktion der *E. coli* BL21(DE3) wurde durch einen osmotischen Schock abgetrennt.

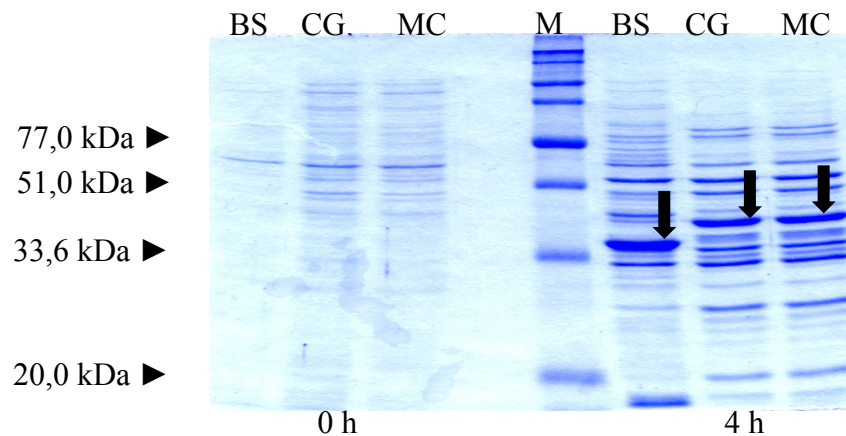


Abb. C.24: Expression der Epoxidhydrolase aus *B. subtilis* (~37 kDa), *C. glutamicum* (~40,6 kDa) und *M. charantia* (~39,8 kDa) in *E. coli* BL21(DE3). Aufgetragen ist die Periplasmafraktion. Links, neben dem Proteingrößenstandard (M), ist der Zeitpunkt 0 h nach der Induktion aufgetragen. Rechts ist der Zeitpunkt 4 h nach der Induktion zu sehen. Der Pfeil zeigt auf die entstehende Proteinbande.

Dazu wurden die Zellen in konzentrierter Glucoselösung resuspendiert und nach dem Abtrennen der Glucoselösung in eine niedermolare Magnesiumsulfatlösung gegeben. Dabei platzt die äußere

Zellwand auf und der Periplasmahalt geht in den Überstand.¹⁷⁴ In der Periplasmafraktion ist der überwiegende Anteil des jeweiligen rekombinanten Proteins. Abb. C.24 zeigt die Periplasmafraktion vor und nach der Induktion in einer SDS-PAGE. Hier ist deutlich die entstehende Proteinbande nach 4 h Induktion in allen drei Fällen zu erkennen.

2.4 Epoxidhydrolaseaktivität der rekombinanten Epoxidhydrolasen

Sowohl die lösliche Cytoplasmafraktion, als auch die Periplasmafraktion der rekombinanten Epoxidhydrolasen wurden auf Epoxidhydrolaseaktivität untersucht. Dazu wurden je 100 µl der jeweiligen Proteinfraction in einer Mikrotiterplatte mit 100 µl einer 50 mM Epoxidstammlösung versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde jeweils der PSS- und PSC-Assay durchgeführt. Es wurden 7 verschiedene Epoxide, 1,2-Epoxybutan, 1,2-Epoxyhexan, 2,3-Epoxybutan, Epichlorhydrin, Epoxycyclohexan, Styroloxid und *trans*-Stilbenoxid getestet (Abb. C.25).

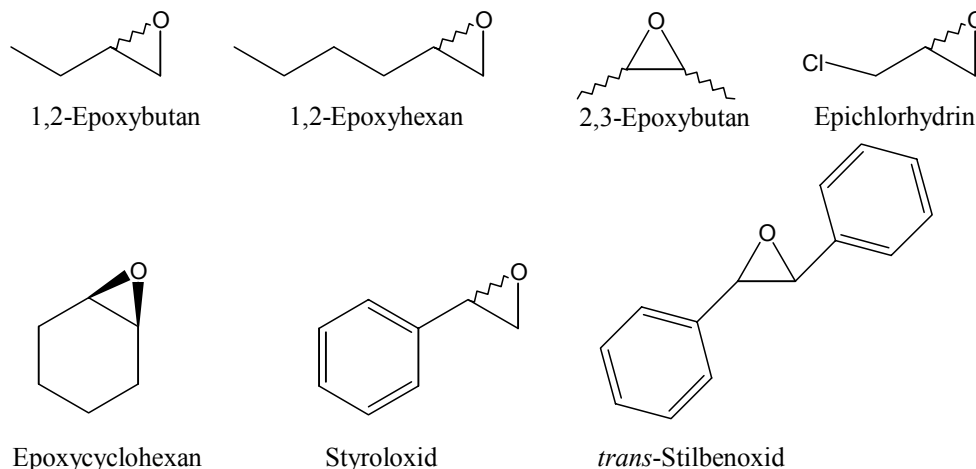


Abb. C.25: Epoxide, die zur Bestimmung der Epoxidhydrolaseaktivität der rekombinanten Proteine aus *B. subtilis* (pETBS), *C. glutamicum* (pETCG) und *M. charantia* (pETMO) eingesetzt wurden.

In keinen Fall konnte gegenüber einer Blindprobe eine signifikant größere Menge an korrespondierendem *vicinalen* Diol nachgewiesen werden. Es konnte mit den eingesetzten Substraten somit keine Epoxidhydrolaseaktivität der rekombinanten, löslichen Proteine nachgewiesen werden.

2.5 Sequenzvergleiche und Suche nach den katalytischen Aminosäuren der drei putativen Epoxidhydrolasen

Da für alle löslichen Proteinfractionen keine Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurde nochmals die Proteinsequenz analysiert. Dazu wurde ein Proteinsequenzvergleich mit den bekannten Epoxidhydrolasen aus *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, *Mus musculus*, *Agrobacterium radiobacter* und *Oryctolagus cuniculus* und den drei putativen Epoxidhydrolasen aus *B. subtilis*, *C. glutamicum* und *M. charantia* mit CLUSTALX durchgeführt. Die katalytischen Aminosäuren sind z. B. aus der Röntgenstruktur der Epoxidhydrolase von *Agrobacterium radiobacter* bekannt.¹²

Der Vergleich der Proteinsequenzen (Abb. C.26) zeigte, dass die erste Aminosäure der katalytischen Triade, Aspartat, in allen Sequenzen konserviert war. Dieses Aspartat führt den nukleophilen Angriff am Oxiranring durch und spielt somit eine zentrale Rolle im Hydrolysemechanismus. Das HGX Motiv,⁶⁴ in dem die letzte Aminosäure mit ihrem „backbone amid“ den ersten Teil des „oxyanion holes“ bildet war ebenfalls konserviert. Die beiden restlichen Aminosäuren der katalytischen Triade, Glutamat oder Aspartat und Histidin waren nur in den Sequenzen von *B. subtilis* und *M. charantia* zu finden. Der Sequenz aus *C. glutamicum* fehlten diese beiden Aminosäure völlig und sind durch ein Threonin, anstelle von Aspartat bzw. Glutamat, und durch Glutamat anstelle von Histidin ersetzt. Der in allen bekannten Epoxidhydrolasen vorhandene Protonendonator Tyrosin¹⁴ war nur in den Sequenzen von *B. subtilis* und *M. charantia* erhalten, in der *C. glutamicum* Sequenz fehlt diese Aminosäure völlig.

Daraus ließ sich schließen, dass es sich nur bei den Sequenzen *B. subtilis* und *M. charantia* der Sequenz nach um Epoxidhydrolasen handelt. Die Sequenz aus *C. glutamicum* ist aufgrund dieser Ergebnisse nicht als Epoxidhydrolase einzuordnen.

```

EH_GM  VVLFHFLHGFPELWYSWRHQILSLSSLG-----YRAVAPDLRGYGDTEAP--PSISSYCNCFHIVGD
EH_MC  VVLLLHGFPELWYSWRHQLLYLSSVG-----YRAIAPDLRGYGDTDSP--ESHTSYSALHIVGD
EH_NT  AVFFLFLHGFPEIWYSWRHQMIAVADAG-----FRGIAPDFRGYGLSELP--AEPEKTTFRDLVDD
EH_MM  ALCLCFLHGFPESWFSWRYQIPALAQAG-----FRVLAIDMKGYGDSSSP--PEIEEYAMELLCKE
EH_BS  LIVLLHGFPEFFWYGWKNQIKPLVDAG-----YRVIAPDQRGYNLSDKP--EGIDSYRIDTLRDD
EH_AR  TLLLLHGFWPGFWWEWSKVIGPLAEH-----YDVIVPDLRGFGDSEKPDLNDLSKYSLDKAAD
EH_OC  PLLMVHGWPGSFFEFYKIIPLLTDPKSHGLSDEHIFEVICPSIPGYGFSQAS---SKKGFNSVSTARI
EH_CG  LVLLIHGFWPGFWWEWSKVIGPLADAG-----FHVAAIDLRGYGMSDKP----PTGYDLRHAAGE

EH_GM  LVALIDSLGVQQVFLVAHDWGAIIGWYLCMFRPDKVKAYVCLSVPLLRDPNIRTVDGMRA-----
EH_MC  LVGALDGLGIDKVFLVGHDWGAIIAWYFCLFRPDRIKALVNLSVHFLPRNPAISFVEGFRA-----
EH_NT  LLDMLDSLGIHQVFLVGKDFGARVAYHFALVHPDRVSTVVTLGVPFLLTGP--ETFP--RD-----
EH_MM  MVTFLDKLGIPQAVFIGHDWGAVMVWNMALFYPERVRAVASLNTPFMPDPDPVSPMKVIRS-----
EH_BS  IIGLITQFTDEKAIVIGHDWGGAVAWHLASTRPEYLEKLIAINIPHPHVMKTVTPLYP--P-----
EH_AR  QAALLDALGIEKAYVVGHDFAAIVLHKFIRKYSDRVIKAAIFDPIQPDFGPVYFGLG-----
EH_OC  FYKLMRLRGFQEFYIQGGDWGALVCTNMAQLVPSHVKGLHLNMALILRNHYTLTLLLGRRIGLLGYT
EH_CG  LSSVIAALGHDDALLVGSDTGASIAWAIASMYPERVRGLISLGAIHPLDMRRAIRRKPHLH-----

EH_GM  -----LYGDDYYVCRFQKPGEMEAQMAEVG--TEYVLENILTTRN-PGPPILPKG
EH_MC  -----AYGDDFYICRFQAPGEAEQHFTSVD--TALVLKALLSNRS-TDPPKLPKE
EH_NT  -----LIPNGFYMLRWQEPGRAEKDFGRFD--TKTVVKNIYTMFSGSELPIAKDD
EH_MM  -----IPVFNYQLY-FQEPGVAEAELEKN---MSRTFKSFFRASDETGFIAVHKA
EH_BS  -----QWLKSSYIAYFQLPDIPEASLREND-----YDTLDKA
EH_AR  -----HVHESWYSQFHQLDMAVEVVGSSREVCKKYFKHFFDHWS-----
EH_OC  ERDMELLYPFKEKVFYSLMRESGYMHIRATKPDTVGCALNDSPVGLAAYILEKFSTWTNSEFRDLEDG
EH_CG  -----VSDLSRLAPFRLPSFLHNLFHFG-----ITSEARREIVNNT

EH_GM  R---FQFNPEMPNT-----LPSWLTEEDLAYVYVSKFEKTGFTGLPNY-YRNFNL
EH_MC  VG--FRGRPPPEN-----LPSWLTEEDINYFAAKFKHTGFTGLPNY-YRAFDL
EH_NT  EE--IMDLVDPSAP-----VPDWFTGEDLANYASLYEKSSFRTALQVPYRAWLE
EH_MM  TE--IGGILVNTPEDPN-----LSKITTEEEIEFYIQFKKTGFRGLPNW-YRNTER
EH_BS  IG--LSDR-----PALFTSEDVSRYKEAWKQPGALTAMLNWYRALRK
EH_AR  ----YR-----DELLTEEELEVHVDNCMKPDNIHGFFNYRANIR
EH_OC  ----G-----LERKFSLQDLLTNIMIYWTTGSIVSSQRYKENLG
EH_CG  S-----SSYQRSNAFTETVLLRKKALSIDHTITP---IIR

EH_GM  NWELTAPWTGGQIKVPVKYITGELDMVYNSLNLKEYIHGGGFKQDVPNLEQVIVQKGVAFHFNNQEAAE
EH_MC  TWELTAPWTGAQIQVPVKFVVGDLDMTYHFAGAKEYIHNGGFKKDVPFLEEVVMKDTAHFFINQERPQ
EH_NT  EYGVKD----IKVKVPCLLVMGEKDYALKFGGLEQYVKSGMVKEYVPNLETIFLPEG-SHFVQEFPE
EH_MM  NWKWSCKGLGRKILVPALMVTAEKDIVLRPEMSKN-----MEKWIPFLKRGHIEDC-GHWTQIEKPT
EH_BS  GSLAEKP---SYETVPYRMIWGMEDDRFLSRKLAKET-----ERHCPNGHLIFVDEA-SHWINHEKPA
EH_AR  PDAALWTDLDHTMSDLPTMIWLGLDTCVPYAPLIEFVP-----KYYSNYTMETIEDCGHFLMVEKPE
EH_OC  QGFMAHKHERLKVHVPTGFAAFPCEEIMHVPEKWVR-----TKYPQLISYSYMPRGGHFAAFEEPE
EH_CG  TNRYLVGSIPSKTVSAPVLLRTNTRRWEHLANTAR-----TRTTGPFTTIAIPGGYELPYLENPS

```

Abb. C.26: Sequenzvergleich verschiedener Epoxidhydrolasen aus *Nicotiana tabacum* (NT), *Glycine max* (GM), *Mus musculus* (MM), *Agrobacterium radiobacter* (AR) und *Oryctolagus cuniculus* (OC) mit den Proteinsequenzen der putativen Epoxidhydrolasen aus *Bacillus subtilis* (BS), *Corynebacterium glutamicum* (GC) und *Momordica charantia* (MC). Die katalytische Triade ist rot, die Aminosäuren des Oxianionholes sind blau und die Protonendonoren sind grün eingefärbt. N-Terminal und C-Terminal sind einige Aminosäuren aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

3 Weinsäurebildende Epoxidhydrolase aus *Rhodococcus ruber* DSM44319

Ein interessanter, möglicher Zugang zu L-Weinsäure ist die Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure. Dabei wird das substituierte Oxiran durch eine Epoxidhydrolase stereoselektiv zu L-Weinsäure umgesetzt. *R. ruber* DSM44319 ist in der Lage, sowohl in Form ganzer Zellen, als auch in Form von Zellextrakt *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure zu L-Weinsäure zu hydrolysieren (Abb. C.27).^{1,2}

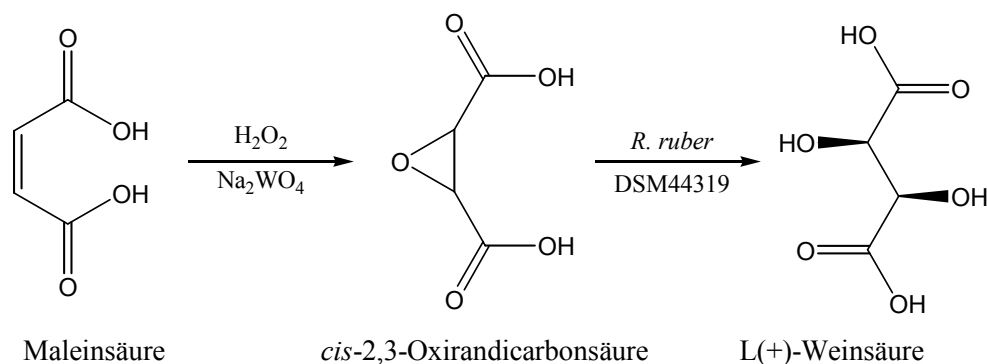


Abb. C.27: Darstellung von L(+)-Weinsäure aus *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure mit *R. ruber* DSM44319.^{1,2}

Falls ein kostengünstiger Zugang zu Maleinsäure besteht, kann dieses Vorgehen ein guter Zugang zu enantiomerenreiner L(+)-Weinsäure sein.

Die Hydrolase aus *R. ruber* DSM44319, die diese Reaktion katalysiert, sollte nach dem eingesetzten Substrat und dem resultierenden Produkt eine Epoxidhydrolase sein. Das für diese Hydrolyse verantwortliche Protein, bzw. Gen war nicht bekannt.

Um das verantwortliche Gen aus *R. ruber* DSM44319 zu bestimmen, wurden zwei Strategien verfolgt. In der 1. Strategie sollte eine Expressionsgenbank aus chromosomaler DNA von *R. ruber* DSM44319 nach hydrolytischer Aktivität gegen *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure durchmustert werden. In der 2. Strategie sollte eine Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus Zellextrakt von *R. ruber* DSM44319 beginnen. Die aufgereinigte Hydrolase sollte dann ansequenziert werden um den N-Terminus des Proteins zu bestimmen. Zusätzlich sollte eine Proteaserestriktion durchgeführt werden, um interne Proteinsequenzen bestimmen zu können. Daraus könnten dann DNA-Sonden konstruiert werden, um die im Vorfeld aufgebaute Genbank von *R. ruber* DSM44319 zu durchsuchen.

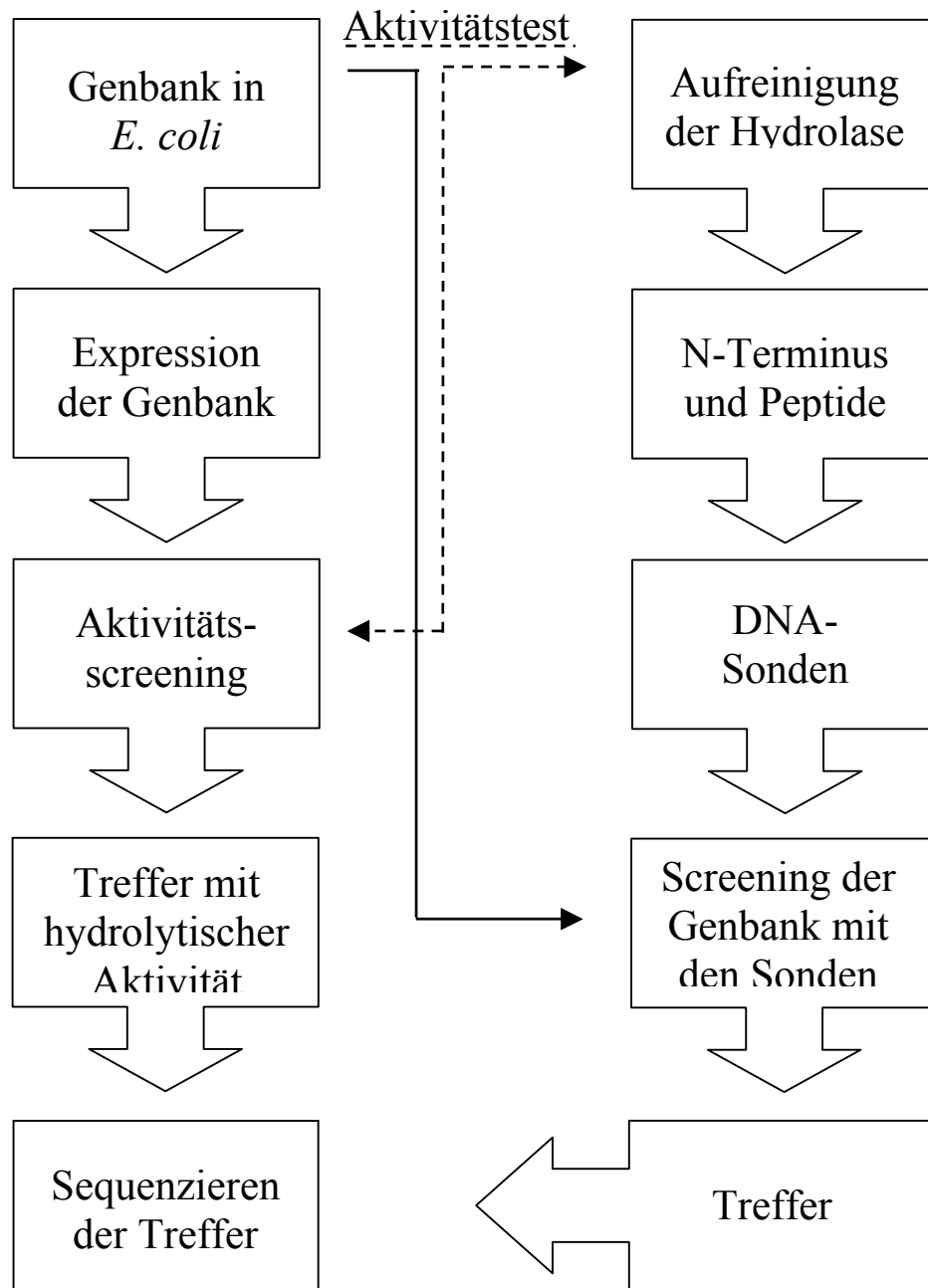


Abb. C.28: Strategien zur Isolierung des hydrolytischen Enzyms aus *R. ruber* DSM44319.

In Abb. C.28 ist schematisch dargestellt wie diese zwei Strategien an zwei Punkten überlappen. Für beide Wege musste ein Schnelltest zur Bestimmung der gebildeten Weinsäure entwickelt werden.

3.1 Schnelltest zur Bestimmung des Weinsäuregehaltes einer Lösung

Maurer beschrieb 1967 eine kolometrische Methode zur Bestimmung von Weinsäure in Wein. Diese Methode beruht auf der Färbung der Weinsäurelösung durch Ammoniumvanadat und Schwefelsäure in 1 ml Küvetten.¹⁹ Dabei wird eine acetat-gepufferte Ammoniumvanadatlösung 1:1 (V/V) mit der Probelösung vermischt und dann mit 0,8 Volumenteilen 1 M Schwefelsäurelösung gefärbt. Es entsteht in Anwesenheit von Weinsäure eine rote Lösung.

Es musste zuerst geklärt werden, ob *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure eine ähnliche, bzw. störende Farbreaktion mit Ammoniumvanadat und Schwefelsäure eingeht und die Methode musste in Mikrotiterplattenformat umgesetzt werden, da nur dann die Durchmusterung der Expressionsgenbank möglich war.

Zur Untersuchung auf eventuell störender Farbreaktionen von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure wurden 500 µl einer 50 mM *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäurelösung mit 500 µl Ammoniumvanadat-Reagenz gemischt und danach 400 µl 1 M Schwefelsäure zugeben. Von der erhaltenen orangen Lösung wurde ein Spektrum aufgenommen (Abb. C.29, orange Linie) und mit einem Spektrum einer 50 mM Weinsäurelösung, nach der selben Färbung, verglichen (Abb. C.29, blaue Linie).

Die Spektren der Lösungen zeigten, dass bei 560 nm die orange Färbung von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure, im Vergleich zum Spektrum der Weinsäure, kaum eine Absorption zeigte. Das Differenzspektrum der beiden Farbstoffe (Abb. C.29, violette Linie) unterscheidet sich bei Wellenlängen von größer als 550 nm kaum noch von dem der reinen Weinsäure. Somit kann mit diesem Testformat der Weinsäuregehalt in Gegenwart des Substrates der Enzymreaktion gemessen werden.

Die Volumina der Probe- und der beiden Reagenzlösungen wurden auf Mikrotiterplattenvolumina skaliert und danach eine Validierung in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden, analog zur Evaluierung des PSS- und PSC-Assays, sechs verschiedene Mischungen aus Weinsäure und *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure hergestellt (analog zu den Lösungen in Tab. B.35) und damit die Testmethode durchgeführt. In Abb. C.30 ist eine Mikrotiterplatte im Validierungsprozess zu sehen.

Zur Untersuchung, ob Medienbestandteile den Test stören könnten, wurde die selbe Validierungsprozedur mit LB-Medium durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Dabei konnten keine störenden Effekte festgestellt werden.

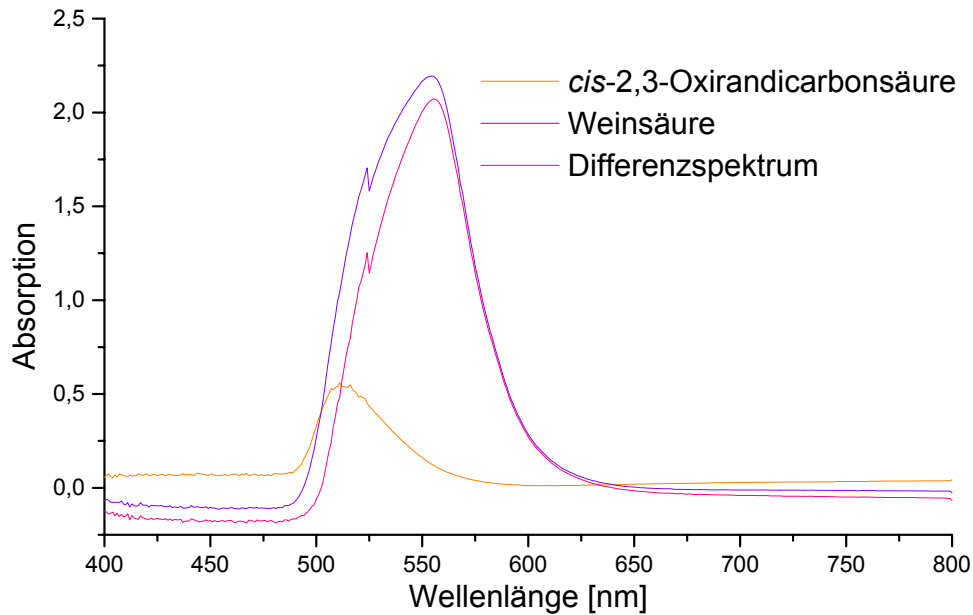


Abb. C.29: Spektren des Farbkomplexes von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure (orange Linie), Weinsäure (blaue Linie) und das Differenzspektrum (violette Linie).

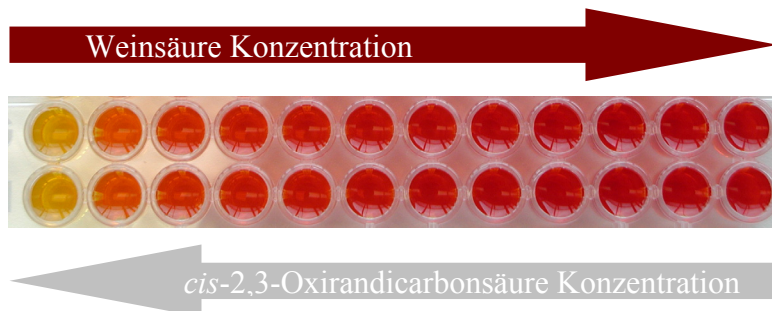


Abb. C.30: MTP mit steigender Weinsäure (nach rechts) und sinkender *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure (nach rechts) Konzentration.

Die Messwerte der Validierung sind in Tab. G.16 zu sehen. Die Standardabweichung waren in allen Messpunkten kleiner als 1/3 der Messwerte, ebenso sind die Standardfehler ausnahmslos kleiner als 4,6 %. Die Detektionsgrenze ergab sich zu 2,5 mM Weinsäure.

Die Auftragung der OD_{560} gegen die Weinsäurekonzentration ist in Abb. C.31 dargestellt. Es ergab sich ein linearer Zusammenhang der OD_{560} und der Weinsäurekonzentration. Die OD_{560} kann in die Weinsäurekonzentration umgerechnet werden. Die Kalibrierung musste für jede Mikrotiterplatte neu durchgeführt werden, da sich immer leichte Variationen der Steigung und des Achsenabschnittes ergaben. Damit konnte der Weinsäuregehalt durch die Absorption bei 560 nm, in Gegenwart von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure, bestimmt werden.

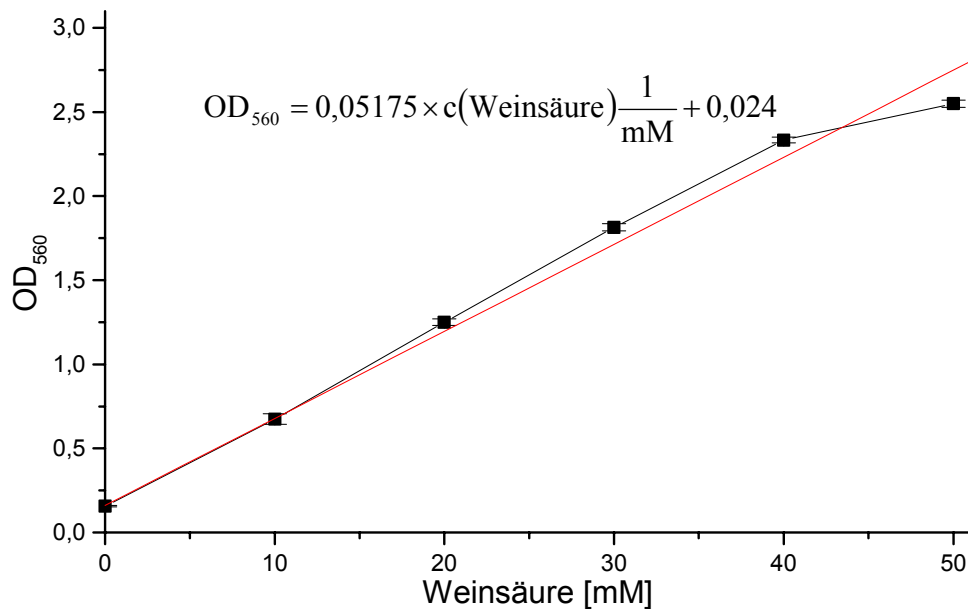


Abb. C.31: Kalibriergerade des Weinsäureschnelltests in Mikrotiterplatten. Die Messpunkte sind schwarz dargestellt, die Ausgleichsgerade rot. Im linken, oberen Teil des Schaubilds ist eine Umrechnung der OD₅₆₀ in die Weinsäurekonzentration angegeben.

3.2 Aufbau der Cosmidgenbank aus chromosomaler DNA von *R. ruber* DSM44319

Aus den vielen Möglichkeiten eine Genbank aus chromosomaler DNA von *R. ruber* DSM44319 zu konstruieren wurde die Cosmidgenbank gewählt. Die Gründe dafür waren, dass hier eine geringere Klonzahl benötigt wird, um mit einer hohen Wahrscheinlichkeit das komplette Genom von *R. ruber* abzudecken. Die Zahl der benötigten Klone N ergibt sich nach Gl. C.3 mit der Insertgröße Z_I , der Genomgröße Z_G und der gewünschten Wahrscheinlichkeit P .¹⁷³

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln\left(1 - \frac{Z_I}{Z_G}\right)}$$

Gl. C.3 Berechnung der Zahl der benötigten Klone N , mit Inserts der Größe Z_I , um mit der Wahrscheinlichkeit P das gesamte Genom, mit der Größe Z_G , abzudecken.¹⁷³

Das pWEB™ cosmid cloning Kit von Epicentre bietet die Möglichkeit, eine Cosmidgenbank in *E. coli* mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 40 kb aufzubauen. Mit einer geschätzten

Genomgröße Z_G von 4 Mb für *R. ruber* DSM44319^{134,136,140} und einer Wahrscheinlichkeit von 99 % ergibt sich aus Gl. C.3 die Zahl der notwendigen Klone zu rund 460.

Die chromosomale DNA aus *R. ruber* DSM44319 wurde mit dem Genomic DNA Kit von Qiagen isoliert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen, mit der Ausnahme, dass beim Zellaufschluss ein Mahlschritt in der Kugelmühle hinzugefügt wurde. Die daraus resultierende DNA war bereits genügend fragmentiert und musste nicht mehr zusätzlich mechanisch geschert werden. Die Bruchenden der DNA wurden mit dem End-Repair-Enzymmix (einer Mischung aus T4 DNA Polymerase und T4 Polynukleotidkinase) aufgefüllt und DNA-Fragmente der Größe von 35 bis 45 kb isoliert. Die so erhaltene DNA wurde in den pWEB Vektor ligiert und danach in Lambda Phagen Köpfe verpackt. Mit dem erhaltenen Phagentiter wurden *E. coli* EPI100TM Zellen transduziert. Es wurden 450 Klone erhalten. Die Kolonien wurden mit dem Pickroboter vereinzelt und in Mikrotiterplatten kultiviert und danach bei -80°C gelagert. Es wurden zufällig 10 Kolonien ausgewählt, um die Cosmide zu isolieren und ihre Größe zu kontrollieren. Dabei konnten keine Religanden gefunden werden. Die Größe der unverdauten Cosmide entspricht den Erwartungen. In Abb. C.32 ist die Klonierungsstrategie für den Aufbau der Cosmidgenbank zu sehen.

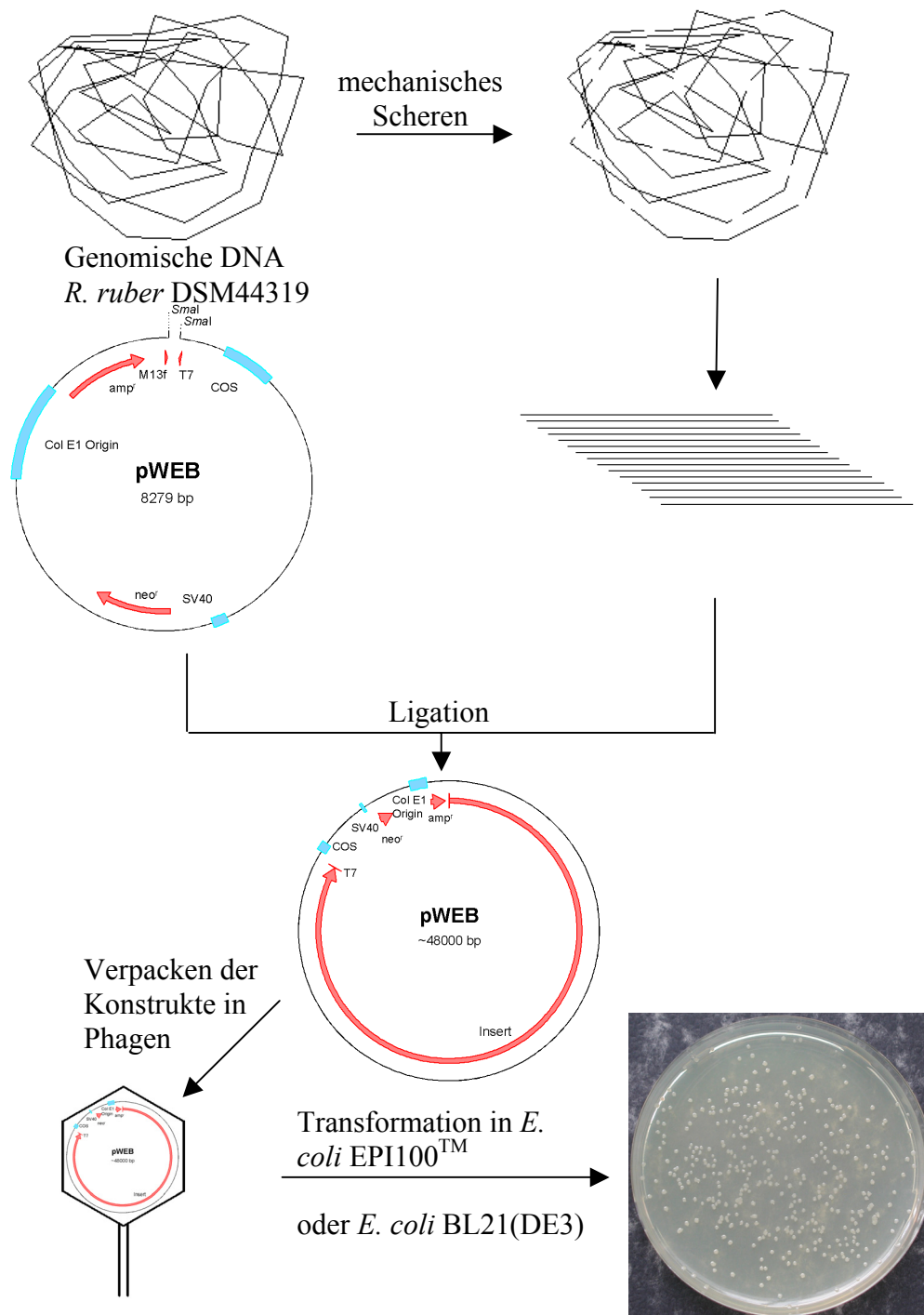


Abb. C.32: Aufbau der Cosmidgenbank von *R. ruber* DSM44319 mit dem pWEBTM cosmid cloning Kit von Epicentre.

3.3 Screening der Cosmidgenbank auf hydrolytische Aktivität

Für das Screening auf hydrolytische Aktivität gegen *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure muss die Cosmidgenbank exprimiert werden. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen die Expression unter einem Promotor aus *R. ruber* der ebenfalls kloniert wurde oder zum anderen die Expression unter dem T7-Promotor der auf dem pWEBTM Vektor liegt. Beide Möglichkeiten wurden untersucht.

3.3.1 Expression in *E. coli* EPI100TM

Die erhaltenen Klone wurden in Mikrotiterplatten kultiviert, dann mit Lysozym in den Mikrotiterplatten aufgeschlossen und mit *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure, bis zu einer Endkonzentration von 100 mM, versetzt. Diese Reaktionsmischungen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Weinsäurebildung in den Kavitäten mit dem Weinsäureassay überprüft. Von den 450 getesteten Klonen konnte bei keinem die Bildung von Weinsäure nachgewiesen werden.

Bei der Kultivierung von *R. ruber* DSM44319 konnte die hydrolytische Aktivität gegenüber *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure durch die Zugabe des Substrates oder Produktes induziert werden (s. Kapitel 3.4.2). Analog dazu wurde in zwei weiteren Expressionsexperimenten zur Kultivierung einmal Weinsäure und einmal *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure mit einer Endkonzentration von jeweils 5 mM zugegeben. Nach dem oben beschriebenen Vorgehen konnte im Falle der Weinsäurezugabe kein abweichendes Ergebnis erreicht werden. Im Falle der zelltoxischen *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure konnte kein *E. coli* Wachstum detektiert werden.

3.3.2 Expression in *E. coli* BL21(DE3)

Die Expression wurde mit *E. coli* BL21(DE3) wiederholt, da dieser die für den T7-Promotor benötigte T7-RNA-Polymerase im Genom codiert trägt. Dazu musste zuerst die Cosmidbank in den neuen Wirt transformiert werden. Die Genbank wurde hierzu auf LB-Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum übergestempelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden dann abgekratzt, vereinigt und eine Plasmidisolierung durchgeführt. In Abb. C.33 sind Aliquots der erhaltenen Cosmide auf einem Agarosegel zu sehen.

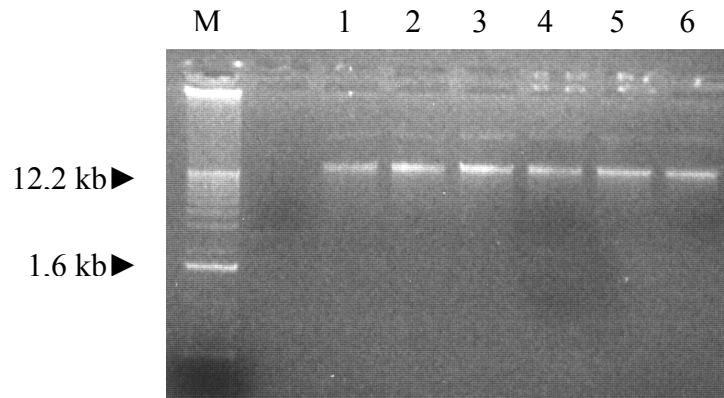


Abb. C.33: Agarosegel zweier zufällig ausgewählter Klone der Cosmidgenbank (links, Spur 1 und 2), Isolierte Cosmide aller Klone (Spur 3-8). Spur M ist der Größenstandard.

Die so erhaltenen Cosmidmischungen wurden vereinigt und dann mit Hilfe der Elektroporation in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Dabei wurden 500 Klone erhalten. Diese wurden in LB-Medium mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum in Mikrotiterplatten unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD_{560} von 0,3 bis 0,5 kultiviert. Dann wurden die Zellen mit einer IPTG Stammlösung (Endkonzentration: 1 mM) induziert und über Nacht exprimiert. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, lysiert und zu jeder Kavität *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure (Endkonzentration: 100 mM) zugegeben. Nach der Inkubation bei 37°C über Nacht wurde der Weinsäuregehalt jeder Kavität mit Ammoniumvanadat und Schwefelsäure bestimmt. Es konnte hier ebenfalls kein hydrolytisch gegen *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure aktiver Klon detektiert werden.

3.4 Aufreinigung, Charakterisierung und Bestimmung des N-Terminus der Epoxidhydrolase aus *R. ruber* DSM44319

Um zur DNA-Sequenz der Hydrolase aus *R. ruber* DSM44319 zu gelangen, sollte das Enzym aus Zellextrakt aufgereinigt werden. Mit dem aufgereinigten Protein sollte dann die N-terminale Proteinsequenz und nach einem Proteaseverdau auch Teile der internen Sequenz bestimmt werden.

Für eine erfolgreiche Aufreinigung eines Proteins müssen zwei Vorbedingungen erfüllt sein:

1. Die Enzymaktivität muss über einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen stabil, zu mindest noch nachweisbar sein.
2. Die Ausgangsaktivität des Enzyms in Zellextrakt sollte so hoch wie möglich sein.

3.4.1 Lagerstabilität von *R. ruber* DSM44319 Zellextrakt

Zellpellets von *R. ruber* waren bei -20°C lange Zeit haltbar, der Zellextrakt aber zeigte nach 2-3 Tagen Lagerung bei 4°C keine hydrolytische Aktivität gegen *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure mehr. Die Lagerung des Zellextraktes bei -20 oder -80°C führte zu einer sofortigen Deaktivierung des Zellextraktes. Vorrangiges Ziel war somit zuerst die Stabilisierung des Zellextraktes gegen die Deaktivierung. Von den vielen getesteten Zusätzen, zeigte die Zugabe von 20%(V/V) Glycerin zum Zellextrakt den gewünschten Erfolg. Der so behandelte Zellextrakt zeigte bei Lagerung über 15 Tage keinen nennenswerten Aktivitätsverlust bei -20°C. Eine Lagerung bei -80°C war ebenfalls ohne Aktivitätsverlust möglich.

3.4.2 Steigerung der Ausgangsaktivität von *R. ruber* DSM44319

Wurde *R. ruber* DSM44319 in TSB-Medium bei 30°C im Schüttelkolben kultiviert, danach aufgeschlossen und die Epoxidhydrolaseaktivität gegen *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure bestimmt, fiel auf, dass die spezifische Hydrolaseaktivität stark variierte. Es konnte kein Muster erkannt werden. Generell war die spezifische Hydrolaseaktivität aber gering.

Deshalb wurde nach einem Weg gesucht, die spezifische Ausgangsaktivität zu erhöhen. Dies wurde zum einen durch die Zugabe des Substrates *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure als Induktor und zum anderen durch die Zugabe des Produktes L-Weinsäure. Misawa *et al.* erreichten durch Zugabe von *trans*-Cyclohexandiol zu Kulturen von *Corynebacterium* sp. C12 dieselbe, bzw. eine größere Induktion der Epoxidhydrolaseaktivität, als durch Zugabe von 1,2-Epoxy cyclohexan.⁶⁴ *R. ruber* DSM44319 wurde in 500 ml TSB-Medium ohne, wie auch mit den Zusätzen von 7,5; 15; 22,5; 30 mM Weinsäure bzw. 7,5 und 15 mM *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure 2 Tage bei 30°C im 2 l Schüttelkolben kultiviert. Der Zusatz von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure mit einer Konzentration von 15 mM war für *R. ruber* DSM44319 zu toxisch und hemmte das Zellwachstum. Sowohl mit *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure im Konzentrationsbereich von 7,5 mM, als auch mit Weinsäure im Bereich von 7,5 mM bis 30 mM ergaben sich am Ende der Kultivierung vergleichbare Biofeuchtmassen von ~5 g. Nach der Bestimmung der Epoxidhydrolaseaktivität ergab sich folgendes Bild (Abb. C.34). Beide Induktoren bewirkten eine Aktivitätssteigerung. Mit steigender Weinsäurekonzentration stieg die spezifische Aktivität vom 4-fachen zum 8-fachen des Aktivitätswertes ohne Zusätze. Zwischen der Weinsäurekonzentration 22,5 und 30 mM konnte kein Unterschied mehr festgestellt werden. Durch Zugabe von *cis*-2,3-

Oxirandicarbonsäure konnte die spezifische Aktivität sogar um das 32-fache gesteigert werden (Abb. C.34).

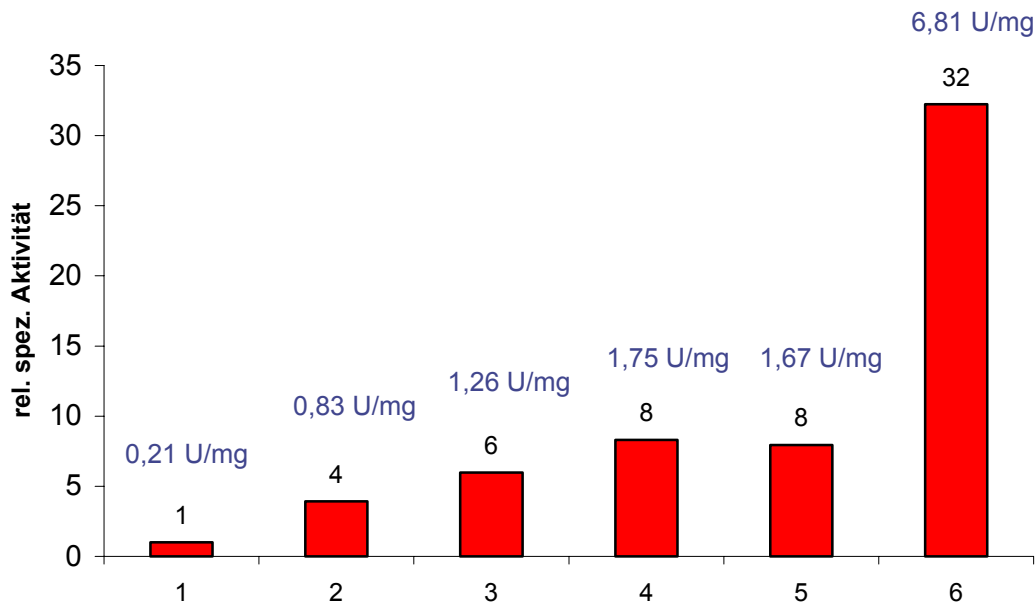


Abb. C.34: Epoxidhydrolaseaktivität von *R. ruber* DSM44319 Kulturen durch Induktion verschiedener Zusätze. 1: TSB-Medium ohne Zusätze; 2. TSB-Medium mit 7,5 mM Weinsäure; 3. TSB-Medium mit 15 mM Weinsäure; 4. TSB-Medium mit 22,5 mM Weinsäure; 5. TSB-Medium 30 mM Weinsäure; 6. TSB-Medium mit 7,5 mM *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure. Über den Balken ist die absolute spezifische Aktivität angegeben.

3.4.3 Aufreinigung der nativen Epoxidhydrolase aus *R. ruber* DSM44319

Nachdem es möglich war, *R. ruber* so zu kultivieren, dass eine gleichbleibend hohe Ausgangsaktivität vorhanden war und das Protein in Lösung so zu stabilisieren, dass eine Lagerung über rund 15 Tage kaum Aktivitätsverlust zeigte, wurde mit der Aufreinigung begonnen. Die Epoxidhydrolase aus *R. ruber* DSM44319 konnte in einer 6-stufigen Aufreinigung gereinigt werden. Die Aufreinigung setzte sich aus Standardmethoden zusammen (Abb. C.35).

78 g Biofeuchtmasse wurden in 400 ml 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8) suspendiert und in einer Kugelmühle unter Eiskühlung aufgeschlossen. Nach dem Pelletieren der Zelltrümmer wurden die rund 600 ml Überstand mit Ammoniumsulfat auf 40 % (M/V) Sättigung eingestellt. Die Trübung wurde abzentrifugiert und verworfen. Der klare Überstand zeigte die Enzymaktivität. Als nächster Reinigungsschritt wurde eine Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose FF durchgeführt. Das Proteingemisch wurde mit Kaliumphosphatpuffer

(50 mM, pH 8) mit 40 % (M/V) Ammoniumsulfat auf die 250 ml Säule aufgegeben. Die Elution erfolgte mit einem linearen, abnehmenden Gradienten von 40% auf 0 % (M/V) Ammoniumsulfat. Jede Fraktion wurde mit *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure und dem Weinsäure Assay auf hydrolytische Aktivität getestet und die aktiven Fraktionen vereinigt. Es wurden 250 ml Lösung mit 652,5 mg Gesamtprotein erhalten. Die aktiven Fraktionen wurden durch eine Ammoniumsulfat-Fällung bei 80% (M/V) Sättigung gefällt und das Pellet in 17 ml Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8) mit 150 mM KCl aufgenommen und über Nacht durch einen 10 kDa Filter bei 4°C gegen Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8) mit 20 % (V/V) Glycerin dialysiert. Nun wurde eine Gelfiltration an Superdex 200 mit 240 ml Säulenvolumen durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure und dem Weinsäure Assay auf hydrolytische Aktivität getestet und die aktiven Fraktionen vereinigt. Es wurden insgesamt 76 ml aktive Fraktionen mit 346 mg Gesamtprotein erhalten. Damit wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Die aktiven Fraktionen der Gelfiltration wurden mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8, 20 % (V/V) Glycerin) auf eine Q-Sepharose FF Säule aufgetragen und mit einem linearen, ansteigenden Gradienten von 0 auf 0,5 M NaCl in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8, 20 % (V/V) Glycerin) eluiert. Jede Fraktion wurde mit *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure und dem Weinsäure Assay auf hydrolytische Aktivität getestet und die aktiven Fraktionen vereinigt. Es wurden 62 ml Lösung mit 103 mg Gesamtprotein erhalten. Die aktiven Fraktionen wurden auf eine Ammoniumsulfat-Sättigung von 40 % (V/V) gebracht und mit einer TSK-Phenylsäule und einem linearen Gradienten von 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5; 1,55 M Ammoniumsulfat, 20 % (V/V) Glycerin) nach 2 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5; 20 % (V/V)) eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen Kaliumphosphatpuffer (50 mM; pH 8) mit 20 % (V/V) Glycerin dialysiert. Als letzten Reinigungsschritt wurde eine hochauflösende Anionenaustauschchromatographie mit einer 1 ml Mono-Q Chromatographiesäule und einem linearen Gradienten von 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8) mit 20 % (V/V) Glycerin nach Kaliumphosphatpuffer (50 mM; pH 8) mit 0,5 M KCl durchgeführt. Es wurden dabei 4 aktive Fraktionen gefunden.

Die Ausbeute war über alle Stufen mit 2 % sehr gering (Tab. C.3). Im ersten Reinigungsschritt war die Ausbeute größer als 100%, was nur durch das Entfernen eines oder mehrerer, unbekannter Inhibitoren erklärt werden konnte.

Die Reinigungsfaktoren sind in Tab. C.3 dargestellt. Die Reinigungsfaktoren sind außer für die erste Ammoniumsulfat-Fällung und den letzten Reinigungsschritt, die hochauflösende IEX, klei-

ner 1. Das bedeutet nicht zwingend, dass diese Reinigungsschritte unnötig waren. Die SDS-PAGE der einzelnen Aufreinigungsstufen (Abb. C.36) zeigt deutlich, dass von Schritt zu Schritt die Komplexität der Proteinlösung abnahm, obwohl der Reinigungsfaktor kleiner 1 war.

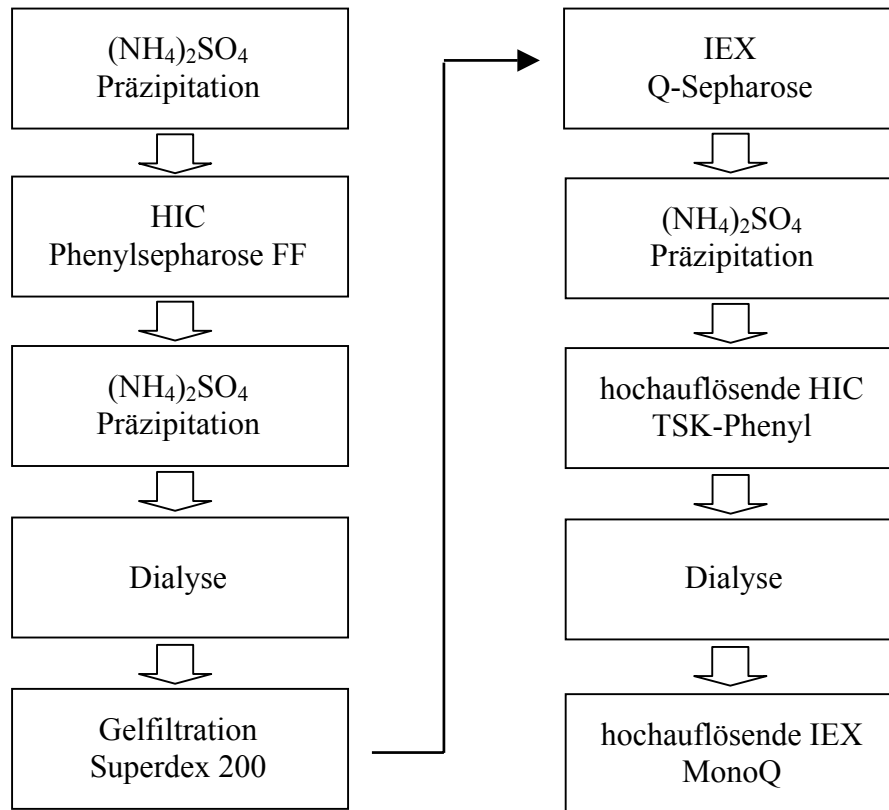


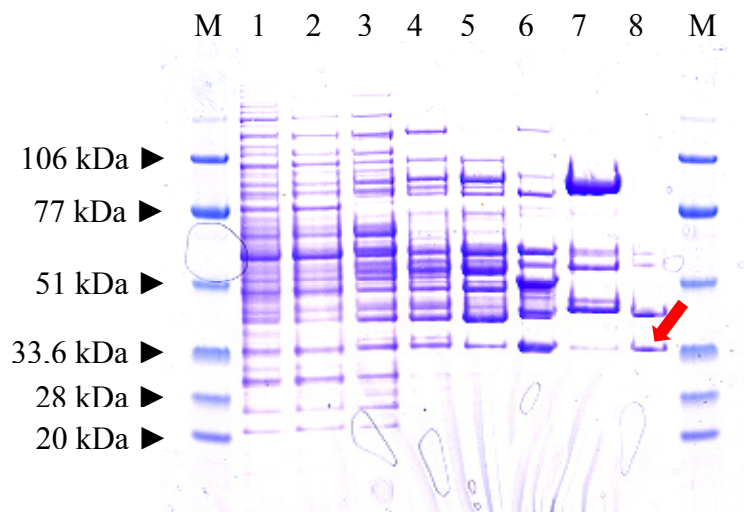
Abb. C.35: Aufreinigungsstrategie für die Epoxidhydrolase aus *Rhodococcus ruber* DSM44319.

Die Epoxidhydrolase wurde während den Aufreinigungsstufen deaktiviert, was sich naturgemäß schlecht auf den Reinigungsfaktor auswirkt. Vor allem in den ersten Reinigungsschritten konnte kein Glycerin zu den benötigten Puffern gegeben werden, da dieses die Trennung störte. Damit war die Epoxidhydrolase nicht optimal stabilisiert.

Hauptziel der Aufreinigung war es, eine vereinzelt Proteinbande zu erhalten, die dann sequenziert werden kann und nicht die Etablierung einer Reinigungsstrategie zur Gewinnung der Epoxidhydrolase aus *R. ruber* DSM44319 für eine Anwendung.

Tab. C.3: Bilanzierung der Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus *R. ruber* DSM44319.

Reinigungsstufe	Gesamt-	Volumen-	Protein-	Spez.	Gesamt-	Reinigungs-	Aus-
	volumen [ml]	aktivität [U/ml]	gehalt [mg/ml]	Aktivität [U/mg]	aktivität [U]	faktor	beute [%]
0. Zellaufschluss	600,0	0,94	4,530	0,21	565,7	1,00	100,0
1. (NH ₄) ₂ SO ₄ -Fällung	650,0	1,23	2,450	0,50	797,1	2,40	140,9
2. AF HIC	250,0	0,71	2,610	0,27	178,2	1,31	31,5
3. AF Gelfiltration	76,0	0,78	4,550	0,17	59,1	0,82	10,4
4. AF IEX	62,0	0,15	1,660	0,09	9,1	0,42	1,6
5. AF HIC (h)	5,5	0,10	1,230	0,08	0,5	0,39	0,1
6. AF (I) IEX (h)	4,2	2,86	0,084	34,02	12,0	163,48	2,1
AF (II) IEX (h)	3,3	1,64	0,063	26,06	5,4	125,21	1,0
AF (III) IEX (h)	4,0	0,74	0,024	30,87	3,0	148,33	0,5
AF (IV) IEX (h)	2,8	0,67	0,007	96,24	1,9	462,43	0,3

**Abb. C.36:** SDS-PAGE der gesamten Reinigung. Spur 1: Zellaufschluss; Spur 2: Überstand der (NH₄)₂SO₄-Fällung; Spur 3: AF der HIC; Spur 4: AF der Gelfiltration; Spur 5: AF der Anionenaustausch Chromatographie; Spur 6: AF I der hochauflösenden HIC; Spur 7: AF II der hochauflösenden HIC; Spur 8: AF I der hochauflösende Anionenaustausch Chromatographie. Der rote Pfeil zeigt auf die Proteinbande die der Epoxidhydrolase entspricht.

Der wichtigste Aufreinigungsschritt war die letzte hochauflösende IEX mit der Mono-Q Säule. Dies lässt sich zum einen an den Reinigungsfaktoren von 125 bis 462 für die vier aktiven Fraktionen ablesen. Zum anderen ist in Abb. C.37 das SDS Gel des Verlaufs der letzten Aufreinigungsstufe zu sehen. Dabei zeigte sich, dass sowohl in den vier aktiven Fraktionen, als

auch in einigen inaktiven Fraktionen ein Protein der erwarteten Größe von ~30 kDa eluiert. Das heißt, ohne die letzte Aufreinigungsstufe wäre eine eindeutige Proteinsequenzierung nicht möglich gewesen.

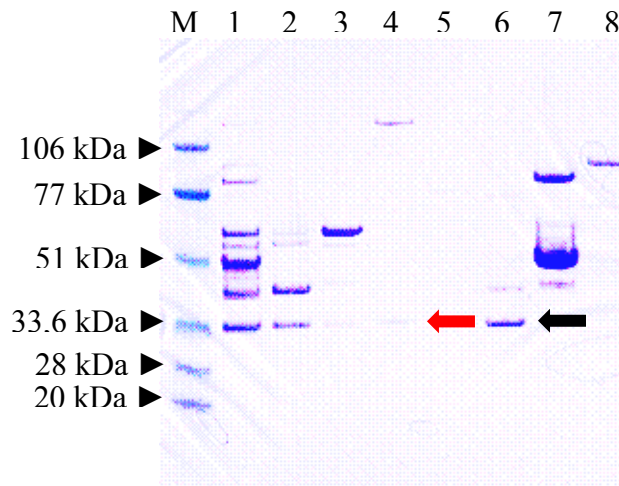


Abb. C.37: SDS-PAGE der letzten Aufreinigungsstufe. Spur 1: Auftrag auf die MonoQ-Säule; Spur 2: Aktive Fraktion I; Spur 3: Aktive Fraktion II; Spur 4: Aktive Fraktion III; Spur 5: Aktive Fraktion IV; Spur 6: Inaktive Fraktion; Spur 7: Inaktive Fraktion; Spur 8: Inaktive Fraktion. Der rote Pfeil zeigt auf die Proteinbande die der Epoxidhydrolase entspricht. Der schwarze Pfeil zeigt auf eine ebenfalls ~34 kDa große Proteinbande aus den inaktiven Fraktionen.

3.4.4 Sequenzierung der Epoxidhydrolase aus *R. ruber* DSM44319

Die aktiven Fraktionen I-III der letzten Aufreinigungsstufe wurden auf eine PVDF-Membran gebロットet (Abb. C.38) und die Bande bei ~34 kDa ausgeschnitten und N-terminal ansequenziert.

Tab. C.4: N-terminale Sequenz des 34 kDa Proteins nach der Aufreinigung (AF 1) (s. **Abb. C.38**).

Aminosäure Nr.	1	30
N-Terminus	MQLNNDNTQFRALLFDVQGTLTDFRSTL	

Die ersten 30 Aminosäuren konnten so eindeutig bestimmt werden. Sie sind in Tab. C.4 dargestellt. Um auch interne Proteinsequenzstücke zu erhalten wurde mit Trypsin oder V8-Protease ein Verdau durchgeführt, die erhaltenen Peptide durch HPLC getrennt und dann durch Edman-Abbau sequenziert.

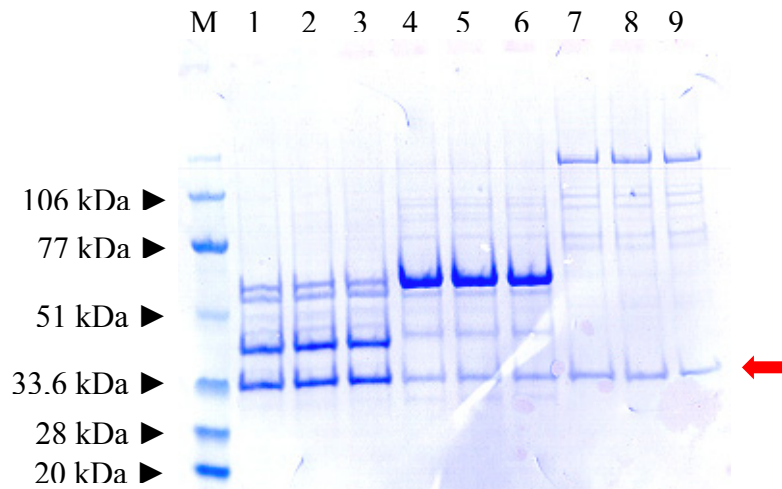


Abb. C.38: Proteinblott der drei aktiven Fraktionen der letzten Reinigungsstufe. Spur 1-3: Aktive Fraktion I; Spur 4-6: Aktive Fraktion II; Spur 7-9: Aktive Fraktion III. Der rote Pfeil zeigt auf die Proteinbande die der Epoxidhydrolase entspricht.

Der Trypsinverdau wurde zweimal, der V8-Protease-Verdau einmal durchgeführt. Die bestimmten Peptidsequenzen wurden mit den Proteinsequenzen von Trypsin bzw. V8 verglichen und so die Peptide der Proteasen ausgesondert.

In den Tabellen Tab. C.5 – Tab. C.6 sind die jeweils bestimmten Peptidsequenzen aufgeführt. Eine Suche in der NCBI Proteindatenbank mit den Proteinsequenzen aus den Tabellen C.21 – C.23 ergab keine exakten Treffer. Der N-Terminus, sowie einige der Peptide, zeigten eine gute Übereinstimmung mit einer L2 Halogencarbonsäure Dehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus* (Abb. C.43).

Tab. C.5: Durch einen V8-Protease-Verdau bestimmte Peptidfragmente des 34 kDa Proteins nach der Aufreinigung (AF 1) (s. **Abb. C.38**).

Fragment	Aminosäuresequenz
Aminosäure Nr. 1	30
FV6	AKGKITYLKGE
FV9	MALEDVVLNTQF
FV13	TAYVRRPLE
FV15	XIFQARPARG
FV25	QVDNFLKQNIEDINFANDD
FV26	QAMVALGINILDINFANDDH
FV32	TAYVRRPLEYGNTGRT
FV36	VVLFDVQGTLTDFLLTVG
FV37	QLXEELVDQLR
FV40	SLXEQLAELAEAFQALXHHTAGHGE
FV46	STYEGAATLLGIAPSEILMVASHAYDLEAA

Tab. C.6: Durch einen Trypsinverdau bestimmte Peptidfragmente des 34 kDa Proteins nach der Aufreinigung (AF 1) (s. Abb. C.38).

Fragment	Aminosäuresequenz	
Aminosäure Nr. 1		30
F3	VAGNPPHALR	
F4	LGGTAGI	
F6	QVGAGTAYVR	
F7	QPLEYGPTT	
F8	QPIGQDDVVEE	
F9	MQLNNANDNTQFR	
F12	QGGTSYPGVLK	
F13	GMFGGAPHQLR	
F15	VQLVDEANADYETGR	
F18	QGHVTTATSNLPEAR	
F30	VEPDQLLAAAGELAAR	
F31	LLFDVQGTLTDFR	
F32	QIDAVLSAQLFGAYKPHR	
F36	YEGAATLLGIAPSEILMVASHAY	
FM1	LASNAGIALR	
FM7	MQLNNANDNTQFR	
FM14	SGMFGGAPHQLR	
FM16	LVQNVDEANADYETR	
FM20	EGHVTTXTINLPEAR	
FM21	SGPDVPSGLEQLR	
FM25	QTLIEHGLSILGDR	
FM26	NTLIEEGLSILGNRV	
FM30	EVEPDQLLAAAGELAAR	
FM32	ALLFDVQGTLTDFAYKP	
FM33	LLIFDVQGXLTNFAYKPHR	
FM36	VVLFDVQGTLTDFLLTVG	
FM37	QLXEELVDQLR	
FM39	MPFPQMLNSISDQRAAFQALSNHTADHINL	
FM40	SLXEQLAELAEAFQALXHHTAGHGE	
FM41	ASFLVESISEVADQLISPR	
FM46	STYEGAATLLGIAPSEILMVASHAYDLEAA	

Eine Suche mit dem N-Terminus und den Peptiden in einer Datenbank aller patentierten Proteinsequenzen ergab eine eindeutige Übereinstimmung der Fragmente F4, F6, F9, F31, F32, F36, FM7, FM21, FM25, FM32, FM37 und FM42, sowie dem N-Terminus mit einer Proteinsequenz aus *Rhodococcus rhodochrous* LMPG-18079.^{20,21} Dieses Enzym katalysiert ebenfalls die Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure zu L(+)-Weinsäure. Die Zuordnung der oben genannten Peptide und des N-Terminus ist in Abb. C.39 zu sehen.

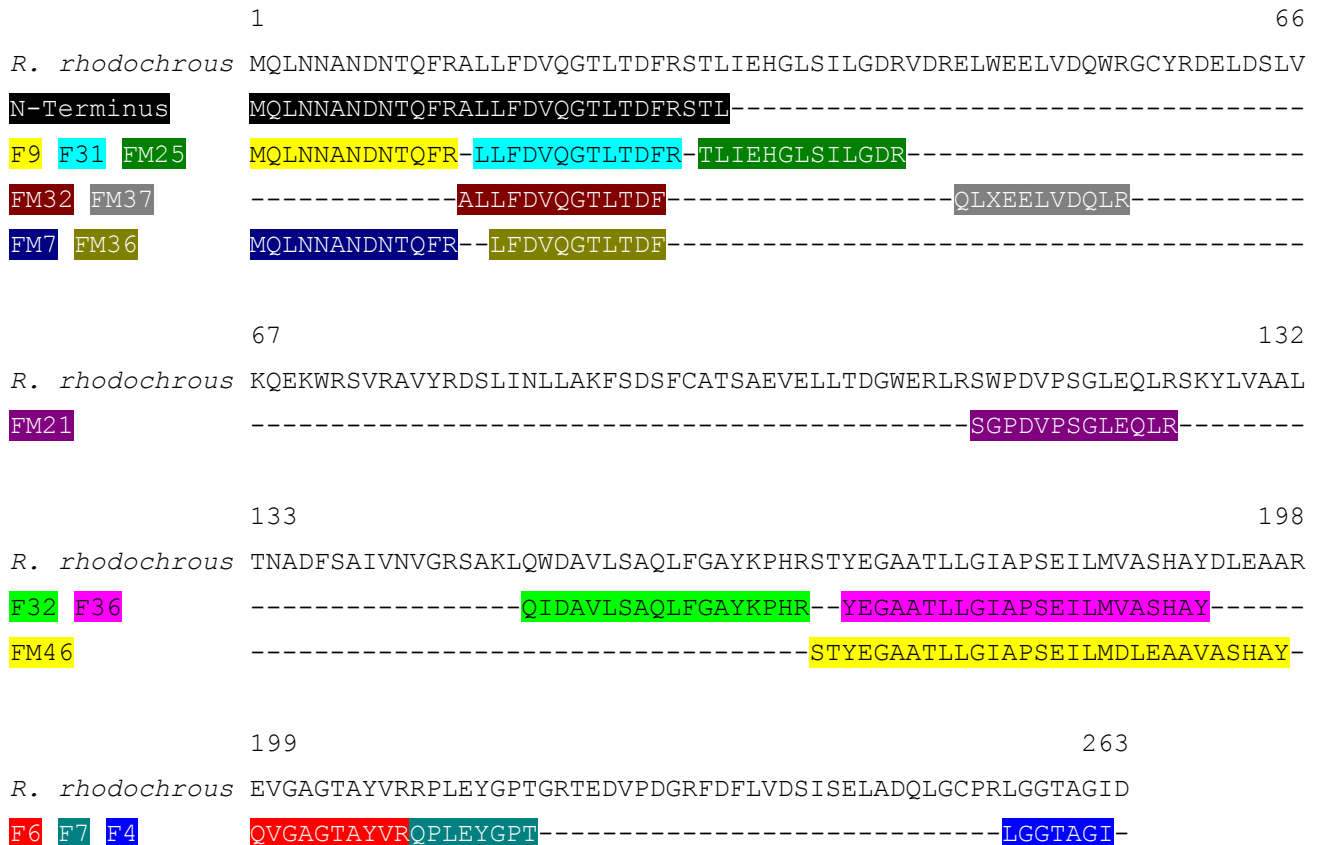


Abb. C.39: Zuordnung des N-Terminus und der internen Peptide zur Proteinsequenz des *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure hydrolysierenden Proteins aus *Rhodococcus rhodochrous* LMPG-18079.^{20,21}

3.5 Vom N-Terminus und den Peptiden zur DNA Sequenz

Da der N-Terminus und Peptid F4, am C-Terminus des Proteins, perfekt zur Proteinsequenz aus *R. rhodochrous* LMPG-18079 passten, wurde versucht mit chromosomaler DNA aus *R. ruber* DSM44319 und Primern, abgeleitet aus der DNA Sequenz der Hydrolase aus *R. rhodochrous* LMPG-18079 das Hydrolasegen zu amplifizieren. Die verwendeten Primer EHPATf, EHPATr1 und EHPATr2 (Tab. B.4) sind in Abb. C.41 farblich hervorgehoben. Es wurden zwei Reverse-Primer gewählt, da die Epoxidhydrolase aus *R. rhodochrous* LMPG-18079 ein Molekulargewicht von nur 28 kDa besitzt, das aus *R. ruber* DSM44319 aufgereinigte Protein aber eine molekulare Masse von ~34 kDa besitzt. Es galt daher zu untersuchen, ob das Stopcodon im *R. ruber* Gen an einer anderen Stelle liegt.

Das Agarosegel der PCR ist in Abb. C.40 zu sehen. Die Amplifikation gelang problemlos unter Standardbedingungen. Das PCR Produkt, amplifiziert mit den Primern EHPATf und EHPATr1 (s. Tab. B.4) hatte eine Größe von ~750 bp und das PCR Produkt, amplifiziert mit den Primern

EHPATf und EHPATr2 (Tab. B.4) eine Größe von ~1,2 kb. Das entsprach genau den erwarteten Größen, die aus der DNA Sequenz der Hydrolase aus *R. rhodochrous* LMPG-18079, bestimmt wurden. Um einen ersten Hinweis der DNA Sequenzähnlichkeit zu bekommen wurden die PCR Produkte mit dem Restriktionsenzym *NdeI* behandelt. Dessen Erkennungssequenz sollte, für den Fall dass die DNA Sequenz amplifiziert aus *R. ruber* DSM44319 eine große Ähnlichkeit zu der aus *R. rhodochrous* LMPG-18079 hat, in den PCR Produkten nur einmal vorkommen und das PCR Produkt in zwei unterschiedlich große Stücke spalten. Die Restriktionsspaltung ist ebenfalls in Abb. C.40 zu sehen. Die oben beschriebenen PCR Produkte werden in jeweils zwei Stücke von je ~550 bp und ~200 bp bzw. ~550 bp und 700 bp gespalten. Das erlaubt die Aussage über ähnliche Restriktionsmuster der beiden Sequenzen.

Die Sequenzierung der PCR Produkte mit den Primern EHPATf, EHPATr1 und EHPATr2 brachte dann den Beweis, dass die DNA Sequenzen aus *R. rhodochrous* LMPG-18079 und *R. ruber* DSM44319 identisch sind (Abb. C.41).

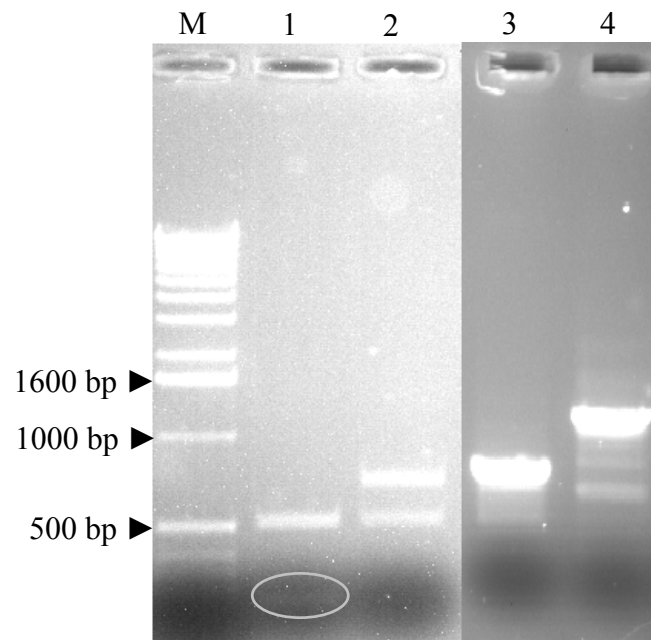


Abb. C.40: Agarosegel der PCR-Produkte, amplifiziert mit spezifischen Primern EHPATf und EHPATr1 (Spur 3), EHPATf und EHPATr2 (Spur 4). Spur 1 und 2 zeigen den Restriktionsverdau mit *NdeI* der PCR Produkte aus Spur 3 und 4.

```

EH PAT      CAATGCAACTGAACAATGCGAACGACAACACGCAGTTCCGGGCCCTGCTTTTTCGACGTGCAGGGG
EH RR seq   CAATGCAACTGAACAATGCGAACGACAACACGCAGTTCCGGGCCCTGCTTTTTCGACGTGCAGGGG

EH PAT      ACTCTGACAGATTTCCGTTCCACACTCATCGAGCACGGCTTATCGATTCTCGGAGACAGAGTGGAA
EH RR seq   ACTCTGACAGATTTCCGTTCCACACTCATCGAGCACGGCTTATCGATTCTCGGAGACAGAGTGGAA

EH PAT      TCGAGAACTCTGGGAGGAATTGGTCGACCAATGGCGCGGCTGCTATCGAGACGAGCTCGATTCCCT
EH RR seq   TCGAGAACTCTGGGAGGAATTGGTCGACCAATGGCGCGGCTGCTATCGAGACGAGCTCGATTCCCT

EH PAT      TGGTCAAACAGGAGAAATGGCGCTCGGTCCGCGCCGTGACCGAGATTCTCTTATCAATCTTCTC
EH RR seq   TGGTCAAACAGGAGAAATGGCGCTCGGTCCGCGCCGTGACCGAGATTCTCTTATCAATCTTCTC

EH PAT      GCAAAATTCTCTGACAGTTTCTGCGCCACCTCGGCCGAAGTGAATTGCTGACCGATGTTGGGA
EH RR seq   GCAAAATTCTCTGACAGTTTCTGCGCCACCTCGGCCGAAGTGAATTGCTGACCGATGTTGGGA

EH PAT      ACGTCTTCGGTTCGTGGCCGGACGTCCCCTCTGGATTGGAACAGCTGCGGTCTAAGTACCTCGTCG
EH RR seq   ACGTCTTCGGTTCGTGGCCGGACGTCCCCTCTGGATTGGAACAGCTGCGGTCTAAGTACCTCGTCG

EH PAT      CGGCACTGACGAATGCGGACTTTTCTGCCATCGTCAACGTCGGGCGTAGCGCCAAACTGCAATGG
EH RR seq   CGGCACTGACGAATGCGGACTTTTCTGCCATCGTCAACGTCGGGCGTAGCGCCAAACTGCAATGG

EH PAT      GACGCTGTTCTTTTCAGCTCAACTCTTTGGAGCCTACAAGCCCCACCGGTCAA CATATCAGGGAGC
EH RR seq   GACGCTGTTCTTTTCAGCTCAACTCTTTGGAGCCTACAAGCCCCACCGGTCAA CATATCAGGGAGC

EH PAT      CGCGACACTCCTGGGTATCGCTCCGTGAGATCCTCATGGTCGCCTCCCATGCATACGATCTCG
EH RR seq   CGCGACACTCCTGGGTATCGCTCCGTGAGATCCTCATGGTCGCCTCCCATGCATACGATCTCG

EH PAT      AAGCGGCGCGGAAGTGGGAGCCGGCACAGCGTACGTCAGACGGCCACTGGAATACGGACCGACG
EH RR seq   AAGCGGCGCGGAAGTGGGAGCCGGCACAGCGTACGTCAGACGGCCACTGGAATACGGACCGACG

EH PAT      GGGCGAACCGAGGACGTTCCCGATGGACGTTTTCGATTTCTTGGTCGACAGCATCAGTGAAGTGGC
EH RR seq   GGGCGAACCGAGGACGTTCCCGATGGACGTTTTCGATTTCTTGGTCGACAGCATCAGTGAAGTGGC

EH PAT      TGATCAGCTGGGCTGCCCACGACTCGGTGGAACTGCCGGTATCGATTGACATCGACCGGCGGTTC
EH RR seq   TGATCAGCTGGGCTGCCCACGACTCGGTGGAACTGCCGGTATCGATTGACATCGACCGGCGGTTC

EH PAT      CACGCGTCCCTTGTTTTTCGGTGCCTGCATTCCCCGTGACGGCAATTCAGTCACGGGAATGCAGG
EH RR seq   CACGCGTCCCTTGTTTTTCGGTGCCTGCATTCCCCGTGACGGCAATTCAGTCACGGGAATGCAGG

EH PAT      CTCTGCTCTGTGCCCAGGATTTTCAGGCGCTTCCCAGGCAACTGGAGTTTTTGCAGCGTAGAGGCG
EH RR seq   CTCTGCTCTGTGCCCAGGATTTTCAGGCGCTTCCCAGGCAACTGGAGTTTTTGCAGCGTAGAGGCG

EH PAT      CGCTTCGTTTCATGAGTTTCTGTGCGGGGGGTGTGAGATGACTCCGCCTACAGACAGCGCGATGT
EH RR seq   CGCTTCGTTTCATGAGTTTCTGTGCGGGGGGTGTGAGATGACTCCGCCTACAGACAGCGCGATGT

EH PAT      GAAGGTAGGACTCCGGGACGAATGCGGTGCACGGTGGCGCCGACCTGCCGTGCCGATGGCGCCCA
EH RR seq   GAAGGTAGGACTCCGGGACGAATGCGGTGCACGGTGGCGCCGACCTGCCGTGCCGATGGCGCCCA

EH PAT      GGAGGACGGCATGACAGCCTGTCCGAATCCGCTGAGCACCATCGGCAGGATCGAGGTCCGGTGGG
EH RR seq   GGAGGACGGCATGACAGCCTGTCCGAATCCGCTGAGCACCATCGGCAGGATCGAGGTCCGGTGGG

EH PAT      CAACTTCGGCGACGATGGTGGCTTCGACACCGCTGGCGGAGAACCTCGTCGACCAGCGTTCGCATC
EH RR seq   CAACTTCGGCGACGATGGTGGCTTCGACACCGCTGGCGGAGAACCTCGTCGACCAGCGTTCGCATC

EH PAT      AATGATCCTCGCTGGGAGACAATCAATCGGAAGCCGGACAGTTCCGACCGGTAATTTCCGGACG
EH RR seq   AATGATCCTCGCTGGGAGACAATCAATCG-----

```

Abb. C.41: Sequenzvergleich der Epoxidhydrolase aus *R. rhodochrous* LMPG-18079 (EH PAT) mit der aus der genomischen DNA von *R. ruber* DSM44319 (EH RR seq) amplifizierten Sequenz. Rot sind das Start- und Stopcodon und pink die *Nde*I-Erkennungssequenz hervorgehoben. Die Primer EHPATf, EHPATr1 und EHPATr2 sind blau, grün und gelb markiert.

3.6 Analyse der Hydrolase Sequenz aus *R. ruber* DSM44319

Wie oben bereits beschrieben konnte mit einer BLAST Suche in der NCBI Proteindatenbank mit dem N-Terminus und den Peptiden (s. Kapitel 3.4.4) keine Übereinstimmung mit anderen Epoxidhydrolasen gefunden werden. Die besten Übereinstimmungen wurden mit L2 Halogencarbonsäure Dehalogenasen erreicht.

Bei dem Vergleich der Proteinsequenz einer typischen Epoxidhydrolase, wie z. B. der aus *Agrobacterium radiobacter* AD1, mit der Hydrolasesequenz aus *R. ruber* DSM44319 zeigte sich, dass die katalytischen Aminosäuren der Epoxidhydrolase nicht alle konserviert waren. Die erste Aminosäure der katalytischen Triade, Aspartat, wird in der *R. ruber* Sequenz gefunden ebenso wie der Protonendonator Tyrosin (Abb. C.42).

Damit kann mit ziemlicher Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Hydrolase aus *R. ruber* DSM44319 der Proteinsequenz nach nicht um eine Epoxidhydrolase handelt.

```

EH AR   MTIRRPEDFKHYEVQLPDVKIHYVREG--AGPTLLLLHGWPFGFWWEWSKV
EH RR   -----MQLNNDNTQFRALLFDVQ-----TLTDF

EH AR   IGPLAEH-YDVIVPDLRGFGDSEKPDLDLNDLSKYSLDKAADDQAALLDALG
EH RR   RSTLIEHGLSILG-----DRVDRELWEELVDQWRGRCYRDELDSLVKQEK

EH AR   IEKAYVVGHDFAAIVLHKFIRKYSDRVIKAAIFDPIQPDFGFPVYFGLG--
EH RR   WRSVRAVYRDSLINLLAKFSDSFCATSAEVELLTDGWERLRSWPDVPSGL

EH AR   HVHESWYSQFHQLDMAVEVVGSSREVCKKYFKHFFDHWSYRDELLTEEEL
EH RR   EQLRSKYLVAALTNADFSAINVNGRSAKLQW-----DAVLSAQLF

EH AR   EVHVDNCMKPDNIHGGFNYYRANIRPDAALWTDLDHTMSDLPVTMIWGLG
EH RR   GAYKPHRSTYEGAATLLGIAPSEIL-----MVASHAYDLEAAREVGAGTA

EH AR   DTCVPYAPLIEFVPKYYSNYTMETIEDCGHFLMVEKPEIAIDRIKTAFR-
EH RR   YVRLEYGPTGRTEVDVDPGRDFLVDSEILADQLGCPRLGGTAGID-----

```

Abb. C.42: Proteinsequenzvergleich der Proteinsequenz der Epoxidhydrolase aus *R. ruber* DSM44319 (EH RR) mit der aus *Agrobacterium radiobacter* (EH AR). Die katalytische Triade ist rot, die Aminosäuren des „oxyanion holes“ sind blau und die Protonendonatoren sind grün eingefärbt. Die nicht konservierten Aminosäuren sind violett markiert.

Ein Proteinsequenzvergleich zwischen der L2 Halogencarbonsäure Dehalogenase (katalysierte Reaktion vgl. Abb. D.2) aus *Xanthobacter autotrophicus*^{22,23} zeigte sehr gute Übereinstimmung (Identität: 26%). Die katalytischen Aminosäuren sind alle konserviert. Das Nukleophil Aspartat, die Aminosäuren des „oxyanion holes“, die substratbindenden Aminosäuren und die der „Halogenid-Kralle“ sind alle konserviert (Abb. C.43).

```

RR  MQLNNANDNTQFRALLFDVQGTLTDFRSTLIEHGLSILGDRVDRELWEELVDQWRGTCYRD
XA  -----MIKAVVFDAYGTLFDVQS-----VADATERAYPGRGEYITQVWR-QKQL

RR  ELDSLVK-QEKWRSVRAVYRDSLINLLAKFSDSFCATSAEVELLTDGWERLRSWPDVPSG
XA  EYSWLRALMGRYADFWGVTRREALAYTLGTLG--LEPDESFLADMAQAYNRLTPYPDAAQC

RR  LEQLRSKYLVAALTNADFSIAIVNVGRSAKLQ--WDAVLSAQLFGAYKPHRSTYEGAATLL
XA  LAEL-APLKRAILSNGAPDMLQALVANAGLTDSFDAVISVDAKRVFKPHPDSYALVEEVL

RR  GIAPSEILMVASHAYDLEAAREVGAGTAYVR-LEYGPT-----GRTE
XA  GVTPAEVLFVSSNGFDVGGAKNFGFSVARVARLSQEALARELVSGTIAPLTMFKALRMRE

RR  DVPDGRFDFLVDSISELADQLGCPRLGGTAGID
XA  ETYAEAPDFVVPALGDLPRLVRGMAGAHLPAV

```

Abb. C.43: Proteinsequenzvergleich der Sequenz aus *R. ruber* DSM44319 (RR) mit der Proteinsequenz der Halogencarbonsäure Dehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus*^{22,23} (XA). Das Nukleophil ist rot, die Aminosäuren der „Halogenid-Kralle“ sind gelb, die Aminosäuren des „oxyanion holes“ blau und die substratbindenden Aminosäuren sind grün eingefärbt.

3.7 Charakterisierung der Epoxidhydrolase aus *R. ruber* DSM44319

Die Reinigungsfraction IV der letzten Stufe (hochauflösende IEX) zeigte die höchste spezifische Aktivität von 96,2 U/mg. Mit dieser Fraction wurde die Charakterisierung durchgeführt. Die Eigenschaften des Rohzelleextraktes unterschieden sich qualitativ nicht.

Die Epoxidhydrolase zeigte Aktivität gegen *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure in einem pH Bereich von 7 bis 9 (Abb. C.44). Der optimale pH Wert lag bei 8. Bei einem pH Wert kleiner als 6,5 und größer als 9 konnte keine Aktivität mehr nachgewiesen werden. Das Temperaturoptimum liegt bei 40°C, das Enzym zeigte aber noch nach 4 h Inkubation bei 50°C 73 % (70,2 U/mg) der Maximalaktivität. Bei 30°C und RT lag die relative Aktivität bei 61 (58,7 U/mg) bzw. 57 %

(54,8 U/mg). Erstaunlicherweise konnte bei 10°C noch eine Restaktivität von 7% (6,7 U/mg) nachgewiesen werden (Abb. C.45).

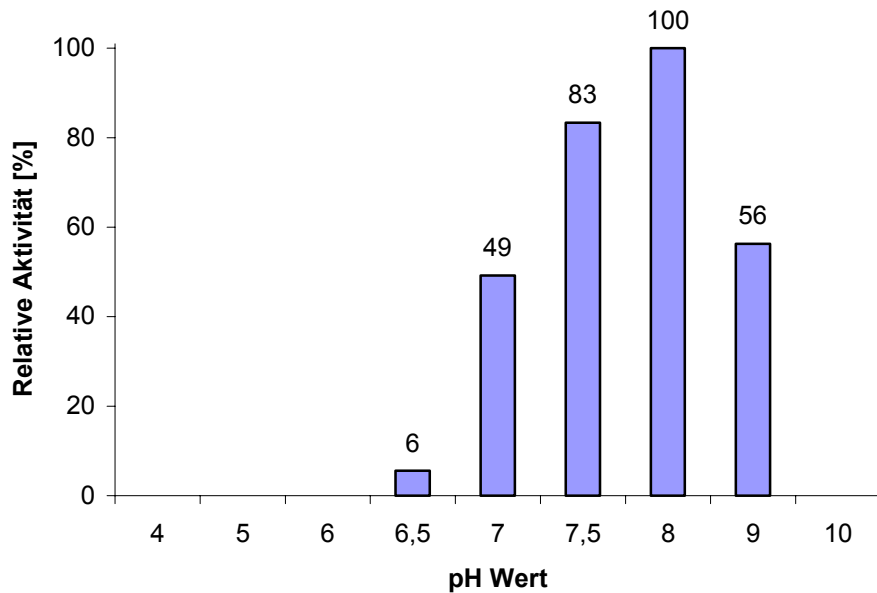


Abb. C.44: pH-Optimum der Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure zu L-Weinsäure durch die Epoxidhydrolase aus *R. ruber* DSM44319. Die maximale spezifische Aktivität (100%) entsprechen 96,2 U/mg.

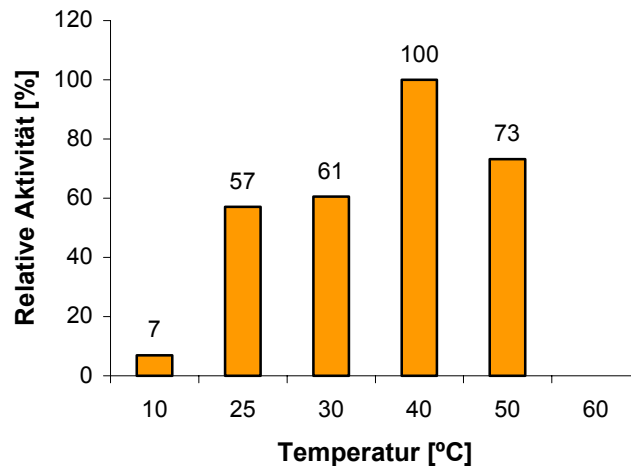


Abb. C.45: Temperaturoptimum der Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure zu L-Weinsäure durch die Epoxidhydrolase aus *R. ruber* DSM44319. Die maximale spezifische Aktivität (100%) entsprechen 96,2 U/mg.

Der in der Synthese von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure, verwendete Katalysator Natriumwolframat zeigte einen hemmenden Effekt auf die Enzymaktivität (Abb. C.46). Eine 12 mM Konzentration

von Wolframat zeigte noch keine nennenswerte Inhibition, ab einer Konzentration von 24 mM aber sank die Aktivität auf 62 bis 44 % der Ausgangsaktivität ohne Inhibitor. Ab einer 48 mM Wolframat-Konzentration, blieb die Hydrolaseaktivität konstant bei rund 45 %. In der Synthese (s. Kap. B8) wurde der Katalysator in einer Konzentration von 200 mM eingesetzt und verblieb komplett im Rohprodukt. Die Entfernung des Wolframats war aufwendig und senkte die Ausbeute an *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure.

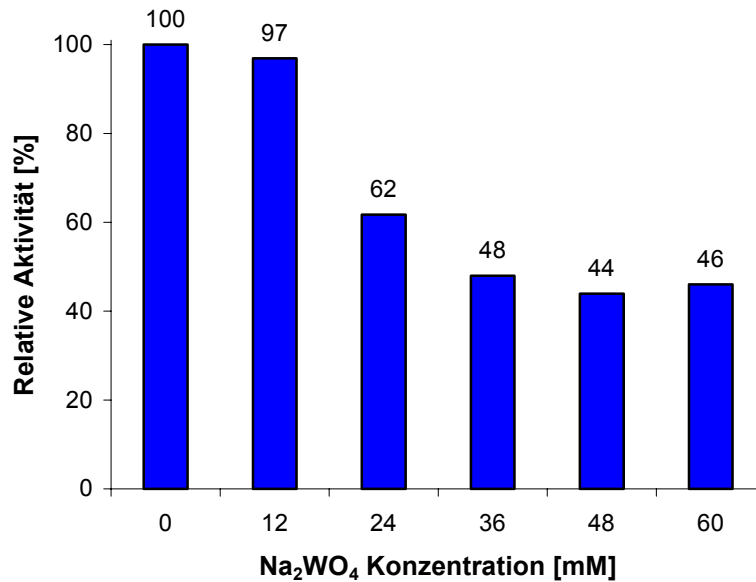


Abb. C.46: Hemmung der Epoxidhydrolaseaktivität von *R. ruber* DSM44319 durch Wolframationen. Die maximale spezifische Aktivität (100%) entsprechen 96,2 U/mg.

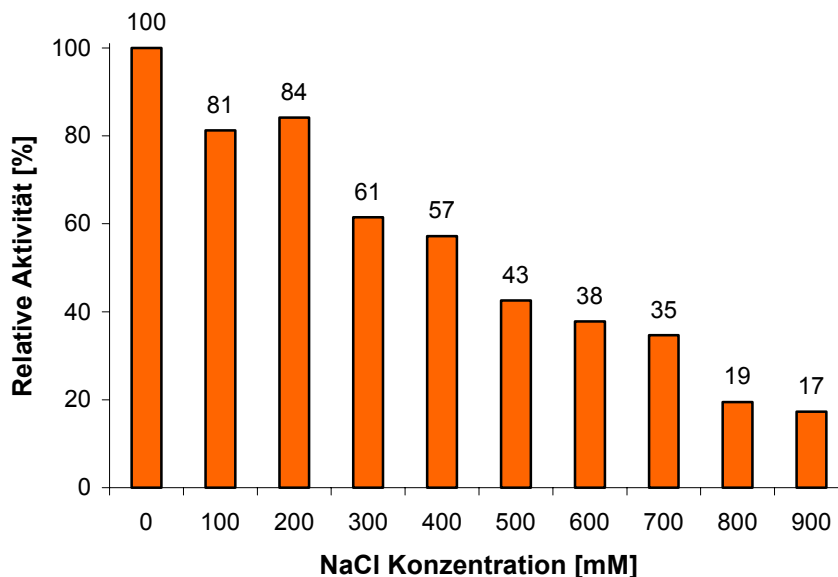


Abb. C.47: Abhängigkeit der Epoxidhydrolaseaktivität von *R. ruber* DSM44319 von der NaCl Konzentration. Die maximale spezifische Aktivität (100%) entsprechen 96,2 U/mg. Die Reaktion wurde bei 40°C und pH 8 durchgeführt.

Eine steigende Natriumchlorid-Konzentration von 0 bis 900 mM führte zu einem kontinuierlichen Aktivitätsverlust von 100 auf 17 %. Als optimal erwies es sich die NaCl Konzentration so niedrig wie möglich zu wählen (Abb. C.47).

Um den Enantiomerenüberschuss zu bestimmen konnte der einfache Farbttest nicht mehr verwendet werden. Eine Trennung von L- und D-Weinsäure ist nur in Form ihrer Dimethyl- oder Diethylester mit gaschromatographischen Methoden möglich.²¹⁰ Deshalb musste das nach der Hydrolyse entstandene Weinsäuregemisch zum Dimethylester derivatisiert werden, ohne noch vorhandenes Substrat zu hydrolysieren. Es sind eine ganze Reihe von Derivatisierungsmethoden zur Darstellung von Methylestern aus Carbonsäuren bekannt.^{197,211} Allen Methoden und Reagenzien ist gemeinsam, dass sie nicht in wässriger Lösung anwendbar sind. Ebenfalls müssen die Carbonsäuren zumindest teilweise protoniert sei, damit die Derivatisierungsreagenzien anwendbar sind. Die Extraktion von Weinsäure aus wässrigen Medium ist bei einem pH zwischen 4 und 10 praktisch nicht möglich. Bei pH 1 und kleiner wäre eine Extraktion mit organischem Lösungsmittel denkbar, konnte aber nicht durchgeführt werden, da unter diesen Bedingungen das Substrat *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure hydrolysiert wird. Um die Reaktionsmischungen zu derivatisieren wurde ein Aliquot der Reaktionsmischung im Vakuum zur Trockene eingedampft, dann in Natriumphosphatpuffer pH 4 gelöst und wieder im Vakuum

zur Trockene eingedampft. Das so erhaltene Gel wurde mit Trimethylsulphoniumhydroxid gelöst in Methanol direkt derivatisiert und dann gaschromatographisch analysiert.

Der Enantiomerenüberschuss von L-Weinsäure zeigte einen ungewöhnlichen Verlauf. Erwartungsgemäß war der Enantiomerenüberschuss unabhängig von Umsatz an *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure, da diese eine prochirale Verbindung ist. Der Enantiomerenüberschuss von L-Weinsäure war stark temperaturabhängig (Abb. C.48). Der *ee*-Wert stieg von 67 % bei 10°C auf >99 % bei 30°C um dann wieder auf 90 % bei 50°C zu fallen. Bei der Temperatur mit der höchsten Epoxidhydrolaseaktivität (40°C) war die Enantioselektivität mit 98 % etwas schlechter als bei 30°C.

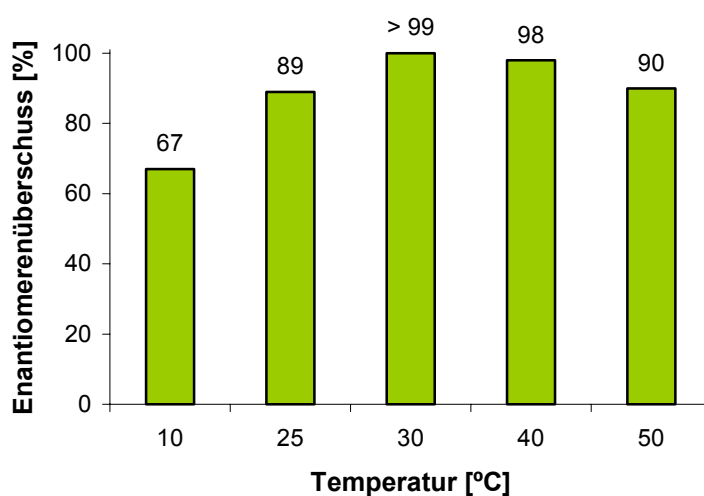


Abb. C.48: Temperaturabhängigkeit des Enantiomerenüberschusses der bei der Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure entstehenden L-Weinsäure.

D Diskussion

1 Screeningsysteme in der Enzymkatalyse

Bei der Erstellung eines Screeningsystems muss von unterschiedlichsten Randbedingungen ausgegangen werden. Diese Randbedingungen werden im Wesentlichen durch die Zeilsetzung des Screenings und durch die biochemischen Eigenschaften des zu untersuchenden Enzyms bestimmt.

1.1 Durchmusterung von Variantenbibliotheken

Eine der Aufgaben eines Screeningsystems ist die Durchmusterung von Enzymbibliotheken aus Mutageneseexperimenten. Dabei müssen die Eigenschaften von 10^3 bis 10^5 Varianten bestimmt werden. Hierzu muss ein Assay idealerweise mit dem natürlichen Substrat durchführbar und quantifizierbar sein. Die Aussage des Testes muss eine quantitative sein, da nur die Varianten mit den besten Eigenschaften ausgewählt werden sollen. Um die geforderte Zahl an Tests mit vertretbarem Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand durchzuführen, muss das Screeningsystem miniaturisiert sein, d. h. in der Regel wird mit Mikrotiterplatten im 96er oder 384er Format gearbeitet. Nützlich ist auch ein rasches Prescreening auf Enzymaktivität auf Agarplatten. Hier kann schnell visuell eine große Zahl an Varianten, wie z. B. Lipasevarianten auf Tributyrinplatten durch Bildung eines klaren Hofes um die Kolonie²¹² oder Amylasevarianten durch Hofbildung auf Stärkeagarplatten durchmustert werden.²¹³ Dieses Vorscreening auf Agarplatten, welches auch als „hierarchisches HTS“ bezeichnet wird, mit Selektion positiver Varianten in Mikrotiterplatten und anschließender Weiterverarbeitung in einer HTS-Anlage reduziert die Zahl der zu untersuchenden Varianten stark. Dies steigert den Gesamtdurchsatz und minimiert dadurch die Kosten.²¹⁴ Die gesuchte Enzymaktivität kann in diesem Fall auch durch Umsetzung mit einer möglichst ähnlichen Verbindung, welche leicht durch Messung der Änderung einer physikalischen Eigenschaft, wie z. B. durch die Freisetzung einer chromophoren Verbindung detektiert werden kann, erfolgen. Nachteilig hierbei ist die Verwendung eines Reagenz, welches mit dem eigentlichen natürlichen Substrat nicht übereinstimmt und oft andere sterische Ansprüche an das Enzym stellt. Auch Parameter wie elektronische Einflüsse und unterschiedliche

Bindungsenergien können meist nur schwer berücksichtigt werden. Deshalb ist die direkte Verwendung des natürlichen Substrats bei der Durchmusterung von Enzymlibliotheken von großem Vorteil. Für die Suche in großen Variantenbanken sind Methoden der HPLC und GC wegen des Zeitaufwands und der oftmals notwendigen Probenvorbereitung weniger geeignet. Allerdings besitzen diese bei Biotransformationen den Vorteil, dass auch eine Aussage über Enantiomerenüberschuß und Enantioselektivität der Variante getroffen werden kann. Deshalb bieten sich diese Methoden für genauere Untersuchungen von positiven Varianten nach einem ersten Hochdurchsatzscreening an.^{215,216}

1.2 Durchmusterung von Stammsammlungen nach Enzymaktivitäten und Substratscreening

Die zweite Aufgabe für ein Screeningsystem ist die Durchmusterung von z. B. Stammsammlungen nach Enzymaktivitäten und die Bestimmung des Substratspektrums eines Enzyms bzw. einer Enzympräparation. Hier ist die Verwendung von Modellsubstraten nicht möglich, da die Aufgabenstellung normalerweise die Suche einer Enzymaktivität gegenüber eines bestimmten Substrates beinhaltet. Das bedeutet hier müssen Wege gefunden werden, das Produkt, das Substrat oder eine andere physikochemische Änderung, die durch die biochemische Reaktion ausgelöst wird (möglichst in dieser Reihenfolge), nachzuweisen. Die Zahl der durchzuführenden Tests ist in der Regel nicht so hoch wie im Falle der Durchmusterung von Enzymlibliotheken, aber chromatographische Methoden wie HPLC und GC können oftmals trotzdem nicht eingesetzt werden. Für jedes Substrat/Produktpaar muss eine HPLC, bzw. GC Trennmethode etabliert werden. Dies stellt für viele verschiedene Substrat/Produktpaare einen hohen Arbeits- und Materialaufwand dar und ist deshalb oft nicht tragbar.

Der direkte Nachweis von Produkt oder Substrat ist in vielen Fällen nicht möglich. Vor allem wenn verschiedene Produkte und Substrate, die zwar chemisch verwandt sind, aber nicht alle für den Nachweis nutzbare Eigenschaft haben, untersucht werden sollen. Ein Paradebeispiel für den Nachweis durch eine physikochemische Änderung, die mit fortschreitender Reaktion einhergeht, ist der Nachweis von Esterase, bzw. Lipaseaktivität durch die pH-Wert Änderung. Hier wird durch die freiwerdenden Carbonsäuren der pH-Wert erniedrigt, was durch verschiedenste Indikatoren nachweisbar ist.²¹⁷

Eine Übersicht über Methoden zum Nachweis von Enzymaktivitäten durch Messung der Änderung einer physikalischen Eigenschaft in Mikrotiterplatten ist in Tab. D.1 dargestellt.

Tab. D.1: Auswahl von Assayverfahren in Mikrotiterplatten im HTS.

Methode	Literatur (Auswahl)
Absorption	7,132,218-223
Fluoreszenz	122,224-227
Luminesenz	228
Radioaktive Nachweisverfahren	229
Zeitaufgelöste IR-thermographische Spektroskopie	230
Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	231-233

Nachteilig bei einigen Verfahren ist die Verwendung spezieller Apparate, wie eines konfokalen Mikroskops bei der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie oder spezieller Mikrotiterplatten, wie beim „scintillation proximity assay“ und bei der zeitaufgelösten IR-Spektroskopie. Dadurch steigt der Kapitaleinsatz beim Hochdurchsatzscreening stark an.²³⁴ Am einfachsten und schnellsten ist meist die direkte Messung der Absorption oder Fluoreszenz in der Mikrotiterplatte. Hierbei ist zu beachten, dass Fluoreszenzmessungen sehr viel sensitiver als Absorptionsmessungen sind, was die Detektion von geringen Enzymaktivitäten oder Aktivitätsunterschieden zulässt.

1.3 Entwicklung und Etablierung eines Assays auf Epoxidhydrolaseaktivität in Mikrotiterplatten unter Verwendung von Periodat und Schiffchem Reagenz (PSS-Assay)

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Assaysystem zum Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität gegenüber verschiedener Epoxide entwickelt werden. Dadurch sollte eine schnelle und zuverlässige Bestimmung des Substratspektrums ermöglicht werden.

Die zu Beginn der Arbeit bekannten und in der Einleitung Kapitel A3 vorgestellten Assaymethoden waren nur zum Teil zum Substratscreening geeignet. flüssigkeits- und gaschromatographische Nachweismethoden^{42,68,77,99-101,105,106,110,112} können prinzipiell mit allen Substraten und Produkten durchgeführt werden, sind aber sehr zeitaufwendig. Hierbei muss vor Beginn des Screenings die Trennung von Substrat und Produkt jedes Paares neu etabliert werden. UV/Vis-spektroskopische oder fluoreszenzspektroskopische Verfahren sind hier deutlich im Vorteil, da sie in der Regel einfach durchzuführen sind. Der Hauptnachteil dieser Methode liegt darin, dass hier nur mit bestimmten Modellsubstraten gearbeitet werden kann, die spezielle

absorptive bzw. fluoreszierenden Eigenschaften besitzen, damit deren Abbau des Substrates bzw. die Bildung von Produkt zu detektieren.^{109,113-120,200} Zusätzlich dazu sind die Absorptionskoeffizienten der verwendeten Substanzen klein im Gegensatz zu denen in Enzympräparationen ebenfalls vorliegenden Verbindungen, wie z. B. DNA-Moleküle, Proteine und Zuckerbestandteile. Testsysteme, die auf der Verwendung von Epoxiden, die nach der Hydrolyse chromophore Gruppen abspalten, basieren, sind ebenfalls nicht zur Charakterisierung von Substratspektren geeignet, da hier der Nachweis nur mit bestimmten Epoxiden möglich ist.

Ein Lösungsansatz zur Charakterisierung der Epoxidhydrolaseaktivität gegenüber vieler verschiedener Epoxide ist der Nachweis von nicht umgesetzten Epoxid mit 4-(*p*-Nitrobenzyl)-pyridin. 4-(*p*-Nitrobenzyl)-pyridin reagiert mit alkylierenden Substanzen, wie z. B. Epoxiden, zu einem blauen wasserunlöslichen Farbstoff.^{81,123-132} Ein Hauptnachteil dieses Testsystems liegt in der Wasserunlöslichkeit des gebildeten Farbstoffes. Um die Bildung photometrisch zu erfassen muss hier mit organischen Kosolventien bis zu 50 % (V/V) gearbeitet werden. Ein zweiter grundlegender Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die Epoxidhydrolaseaktivität durch das verbleibende Substrat und nicht des entstehenden Produktes, d. h. im Rückschluss, bestimmt wird. Die Bildung anderer Produkte als *vicinale* Diole durch die reaktiven Epoxide wird fälschlicherweise als Epoxidhydrolaseaktivität angezeigt. Rink *et al.* nutzen diese Methode für den Nachweis der Aktivität der Epoxidhydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 mit Epichlorhydrin als Substrat.⁸¹ Dieser Test wurde für reaktive Epoxide wie Styroloxid oder Indenoxid von F. Zocher optimiert.²³⁵ Die Nachweismethode ist aber gegenüber weniger reaktiven Epoxiden, speziell gegenüber 1,2-Epoxyalkanen, nicht geeignet.

Wichtigstes Ziel in der Entwicklung eines Assaysystems, das geeignet ist das Substratspektrum einer Epoxidhydrolase zu bestimmen, ist der direkte Nachweis der *vicinalen* Dirole. Um das in einfacher, schneller Form zu erreichen muss der Nachweis in Form einer Farbreaktion oder Fluoreszenzbildung erfolgen. Die Zahl der Reaktionen, die nur *vicinale* Dirole in wässrigem Medium durchführen ist sehr klein. Eine naheliegende Reaktion ist die Periodatspaltung. Periodat spaltet 1,2-Dirole oder α -Aminoalkohole oxidativ in Aldehyde bzw. Ketone (s. Abb. C.1). Die Reaktion ist in wässriger Lösung in einem pH-Bereich von 4,5 bis 8 durchführbar.¹⁷ Je nach Substitutionsmuster an den Hydroxyl- bzw. Aminokohlenstoffatomen entstehen Aldehyde oder Ketone. Primäre und sekundäre Alkohole werden zu Aldehyden, tertiäre Alkohole werden zu Ketonen oxidiert. Aldehyde lassen sich einfach durch eine Farbreaktion mit Schiffchem

Reagenz nachweisen.²⁰¹ Aldehyde reagieren mit Pararosanilin und Schwefeldioxid zu einem wasserlöslichen, violetten Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 560 nm.¹⁹⁸

Problem bei diesem Vorgehen zum Nachweis der 1,2-Diole war das überschüssige Spaltungsreagenz Periodat, welches die Bildung des Farbstoffes aus Aldehyd und Pararosanilin störte. Dieses Problem konnte durch die Reduktion des Spaltungsreagenzes mit Natriumsulfit, nach der Bildung der Aldehyde, gelöst werden. Dabei wird das Spaltungsreagenz zu Iodid reduziert und gleichzeitig die notwendige Schwefeldioxid Konzentration eingestellt. Der PSS-Assay wurde mit vier verschiedenen Epoxiden und ihren korrespondierenden *vicinalen* Diolen validiert. Dabei zeigte sich, dass der Assay für alle getesteten Substrate sehr gut in Mikrotiterplatten anwendbar ist. Hier konnte eine Endpunktbestimmung der 1,2-Diol Konzentration durch Messung der Absorption durchgeführt werden. Dabei war die Menge an 1,2-Diol der Absorption proportional, womit die Epoxidhydrolaseaktivität bestimmt werden konnte. Damit können Epoxidhydrolasen dann im Screening, bzw. für eine Epoxidhydrolase geeignete Substrate erkannt werden. In allen Fällen konnte ein Detektionslimit von 5 µmol/ml erreicht werden und ein Standardfehler von maximal 10 %.

Der PSS-Assay ermöglicht den Nachweis der Produkte der Epoxidhydrolyse mit allen möglichen Substraten und ist in Gegenwart von Zellextrakten anwendbar. Eine Störung durch andere Zellbestandteile wie Proteine, DNA oder Kohlenhydrate findet nicht statt. Damit konnte der Nachteil der anderen Testsysteme, die nur mit bestimmten Diolen möglich sind, wie z. B. der Nachweis von 1,2-Phenylethandiol durch die Zunahme der Absorption bei 280 nm nach der Periodatsplattung,²⁰⁰ ausgeglichen werden.

Der Assay wurde für das Substratscreening von Epoxidhydrolasen auf einer Pipettierroboter-Anlage programmiert. Bei Verwendung eines Pipettierroboters können sehr reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Durch Verwendung eines Beckman 2000-Laborroboters mit Greifarm ist die Durchmusterung von ca. 960 Varianten pro Tag möglich. Dabei ist zu beachten, dass dies trotz der manuell durchzuführenden Zentrifugations- und Inkubationsschritte möglich ist.

1.4 Entwicklung und Etablierung eines Assays auf Epoxidhydrolaseaktivität in Mikrotiterplatten unter Verwendung von Periodat und Carboxyfluorescein (PSC-Assay)

Der PSS-Assay hat zwei prinzipielle Nachteile. Erstens können nur solche *vicinale* Diole nachgewiesen werden, bei denen eines der Produkte der Periodatspaltung ein Aldehyd darstellt.

Das schränkt die Substratwahl geringfügig ein. Zweitens wird das Produkt mit einer Absorptionsmessung nachgewiesen. Absorptionsmessungen sind empfindlich gegenüber Trübungen die während der Reaktion entstehen. Aus diesem Grund ist mindestens ein Zentrifugationsschritt notwendig um die Trübung zu entfernen.

Die Detektion des nach der Periodatspaltung noch im Reaktionsgemisch vorhandenen Periodats ist ebenfalls eine Möglichkeit den 1,2-Diolgehalt zu bestimmen. Die Menge von Periodat im Reaktionsgemisch ist umgekehrt proportional zur in der Hydrolyse gebildetem *vicinalen* Diol. Das im Reaktionsgemisch verbliebene Periodat wird mit Carboxyfluorescein nachgewiesen. Dabei wird die Fluoreszenz durch Periodat zerstört und ist somit proportional zur 1,2-Diol Konzentration.

Der PSC-Assay wurde mit sieben verschiedenen Epoxiden und ihren korrespondierenden *vicinalen* Diolen validiert. Dabei zeigte sich, dass der Assay für alle Substrate sehr gut in Mikrotiterplatten anwendbar ist. Hier konnte eine Endpunktbestimmung der 1,2-Diol Konzentration durch Messung der Restfluoreszenz von Carboxyfluorescein durchgeführt werden. Dabei war die Menge an 1,2-Diol der Fluoreszenz proportional wodurch die Epoxidhydrolaseaktivität bestimmt werden konnte. Damit kann ein Screening auf veränderte Epoxidhydrolaseaktivität durchgeführt werden, bzw. nach geeigneten Substraten für Epoxidhydrolasen gesucht werden. In allen Fällen konnte ein Detektionslimit von 0,5 $\mu\text{mol/ml}$ erreicht werden und ein Standardfehler von maximal 3 %.

Der PSC-Assay ist ebenfalls in Zellextrakt anwendbar und ist gegenüber auftretenden Trübungen unempfindlich. Im Gegensatz zum PSS-Assay sind nicht alle Lösungsvermittler in der Reaktion möglich. DMSO verursachte ein sehr starkes Hintergrundsignal, welches eine Messung der Epoxidhydrolaseaktivität unmöglich machte. Ethanol, DMF und Aceton verursachten keine Störung.

Der Assay wurde für das Substratscreening von Epoxidhydrolasen auf einer Pipettierroboter-Anlage programmiert. Bei Verwendung eines Pipettierroboters können sehr reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Damit konnten ca. 1960 Einzeltests pro Tag durchgeführt werden.

Reymond *et al.* beschrieben ebenfalls eine Nachweis von Natriumperiodat zur Bestimmung der Epoxidhydrolaseaktivität.¹³³ Das überschüssige Periodat wird dort mit L-Adrenalin zurücktitriert. L-Adrenalin wird von Periodat zu farbigem Adrenochrom oxidiert, welches dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt werden kann (Abb. A.10). Das Detektionslimit und die Standardfehler dieser Methode sind etwas schlechter als die des PSC-Assays. Der Nachteil

des Vorgehens von Reymond *et al.* ist, wie für den PSS-Assay, dass hier die Absorption gemessen werden muss, und somit hier wieder Trübungen eine große Störquelle darstellen.

2 Substratsuche für putative Epoxidhydrolasen

Es wurden drei DNA Sequenzen, die für putative Epoxidhydrolasen aus *Bacillus subtilis* 168, *Corynebacterium glutamicum* und *Momordica Charantia* kodieren, von der BASF AG erhalten. In dieser Arbeit sollte das Substratspektrum dieser möglichen Epoxidhydrolasen bestimmt werden. Untersucht werden sollten vor allem industriell interessante Epoxide wie Styroloxid, 1,2-Epoxyalkane etc.

Alle drei mutmaßlichen Epoxidhydrolasen konnten nicht in *E. coli* aktiv exprimiert werden, in *E. coli* pQE-30 Expressionsvektor. Die putativen Epoxidhydrolasen konnten in *E. coli* BL21(DE3) rekombinant als lösliche Proteine hergestellt werden. Für alle drei Epoxidhydrolasen konnte sowohl im Cytosol als auch im Periplasma, eine lösliche Fraktion des Zielproteins nachgewiesen werden. Die Epoxidhydrolaseaktivität dieser Fraktionen gegen sieben Epoxide (Abb. C.25) wurde mit PSS und PSC-Assay bestimmt. Dabei konnte keine Aktivität gegenüber den Blindproben festgestellt werden.

Die Proteinsequenzen der putativen Epoxidhydrolasen aus *B. subtilis*, *C. glutamicum* und *M. charantia* wurden mit den fünf bekannten Epoxidhydrolasen aus *Nicotiana tabacum*, *Glycine max*, *Mus musculus*, *Agrobacterium radiobacter* und *Oryctolagus cuniculus* mit clustalx verglichen. Die katalytischen Aminosäuren waren u.a. aus der Kristallstruktur der Epoxidhydrolase aus *Agrobacterium radiobacter* AD1 bekannt.¹²

Dieser Vergleich zeigte, dass die katalytische Triade sowie die anderen katalytisch wirksamen Aminosäuren in den putativen Epoxidhydrolasen aus *B. subtilis* und *M. charantia* konserviert sind. Aufgrund dieser Daten haben die Genprodukte aus *B. subtilis* und *M. charantia* die Funktion einer Epoxidhydrolase, trotzdem konnte keine Epoxidhydrolaseaktivität, mit den rekombinant in *E. coli* produzierten Proteinen, nachgewiesen werden. In der Sequenz aus *C. glutamicum* konnten nicht alle katalytisch notwendigen Aminosäuren gefunden werden. Hier war nur das HGX Motiv⁶⁴ und das als Nukleophil fungierende Aspartat konserviert, die weiteren katalytische Aminosäuren konnten nicht gefunden werden. Das katalytische Histidin aktiviert in den bekannten Epoxidhydrolasen, das Wassermolekül, das die zuvor gebildete Esterbindung zwischen Nukleophil und Substrat hydrolysiert. Es nimmt deshalb eine zentrale Stellung ein.¹²

Da unter anderen diese Aminosäure in der Sequenz von *C. glutamicum* fehlt, kann dieses Protein keine Epoxidhydrolase bekannten Typs sein. Für Halogen-carbonsäure Dehalogenasen ist bekannt, dass sie die Hydrolyse des Esterintermediates mit Wassermolekülen durchführen, die nicht über ein Histidin aktiviert sind.²³⁶ In diesem Fall ist noch nicht klar, ob das Wassermolekül überhaupt aktiviert wird. Das bedeutet die Hydrolyse scheint auch ohne Aktivierung möglich zu sein. Dieser Fall ist für Epoxidhydrolasen nicht bekannt. Somit ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass hier keine Epoxidhydrolasesequenz vorliegt und somit wurden die experimentellen Daten für *C. glutamicum* bestätigt.

Wird von der DNA Sequenz auf die Funktion des Genproduktes geschlossen, kann der endgültige Beweis der Funktion nur durch den Nachweis der Aktivität des Genproduktes geführt werden. Wird das Genprodukt heterolog produziert, ergibt sich falls keine Aktivität gezeigt werden kann, ein Problem. In diesem Fall wird nicht klar, aus welchen Gründen kein funktionelles Genprodukt vorliegt. Ist die Funktion des Genproduktes aus der Sequenz richtig erkannt worden? Wird heterolog überhaupt Protein exprimiert und falls ja, in Form unlöslicher Aggregate oder in löslicher Form? Wird das Protein funktionell exprimiert? Wird die Funktion mit dem geeigneten Substrat getestet? Das Problem ist schematisch in Abb. D.1 dargestellt.

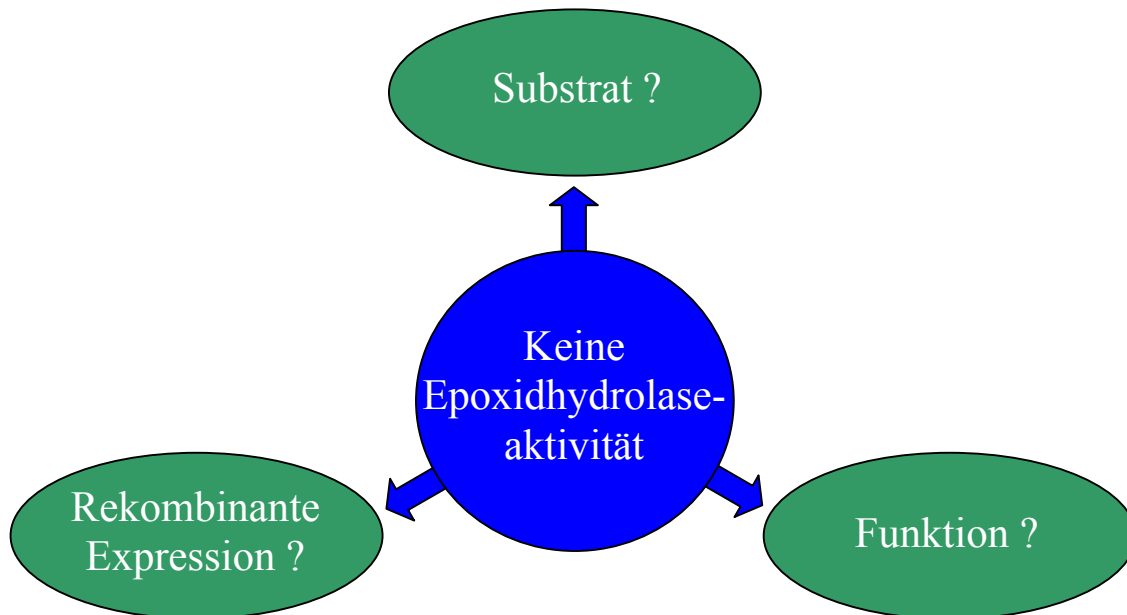


Abb. D.1: Problematik beim Nachweis von Epoxidhydrolaseaktivität putativer Epoxidhydrolasen, die rekombinant hergestellt werden.

Somit kann für die Epoxidhydrolasen aus *B. subtilis* und *M. charantia* eine stichhaltige Beweisführung nicht geführt werden, da die rekombinante Expression zwar zu löslichem Protein führte, aber nicht zwingend zu funktionellem Protein.

3 Weinsäurebildende Hydrolase aus *R. ruber* DSM44319

R. ruber DSM44319 ist in der Lage, sowohl in Form ganzer Zellen als auch in Form von Zellextrakt *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure zu L-Weinsäure zu hydrolysieren (Abb. C.27).^{1,2} Die Hydrolase aus *R. ruber* DSM44319, die diese Reaktion katalysiert, sollte nach dem eingesetzten Substrat und dem resultierenden Produkt eine Epoxidhydrolase sein. Das für diese Hydrolase verantwortliche Protein bzw. Gen war nicht bekannt.

Um das verantwortliche Gen aus *R. ruber* DSM44319 zu bestimmen wurden zwei Wege verfolgt. Zuerst sollte eine Expressionsgenbank aus chromosomaler DNA von *R. ruber* DSM44319 nach hydrolytischer Aktivität gegen *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure durchmustert werden. Parallel sollte eine Aufreinigung der Epoxidhydrolase aus Zellextrakt von *R. ruber* DSM44319 durchgeführt werden, um den N-Terminus sequenzieren zu können.

Für beide Strategien war es wichtig einen geeigneten Assay zu haben, durch den die entstehende Weinsäure detektiert werden sollte. Dazu konnte die von Maurer 1967 beschriebene kolometrische Methode zur Bestimmung von Weinsäure in Wein¹⁹ für Mikrotiterplatten werden und gezeigt werden, dass *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure diese Methode nicht stört. Der Assay benötigt nur die Zugabe zweier Komponenten mit anschließender Absorptionsmessung. Somit sind alle Kriterien für ein HTS System erfüllt.

3.1 Screening der Genbank von *R. ruber* DSM44319 nach *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure Hydrolyse

Es wurde eine aus 450 unabhängigen Klonen bestehende Cosmidbank in *E. coli* EPI100TM bzw. *E. coli* BL21(DE3) erstellt. Eine durchschnittliche Insertgröße von 40 kb wurde erreicht. Nach Expression in Mikrotiterplatten konnte keine Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure detektiert werden. Die Induktion mit Substrat oder Produkt, die mit *R. ruber* Zellen Erfolg hatte, brachte hier keinen Erfolg.

So stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob ein Gen unter Kontrolle des eigenen Promotors exprimiert wird, da auf dem verwendeten Cosmid pWEBTM kein eigener Promotor vor-

handen war. Die Informationen hierzu sind noch nicht vollständig. So zeigt beispielsweise eine Untersuchung von 139 für *Streptomyces* geeigneten Promotoren, dass etwa 20% davon aufgrund einer ausreichenden Sequenzhomologie in der -10 und/ oder -35 Region ebenfalls für den Einsatz in *E. coli* geeignet sind.²³⁷ Somit stellt sich die Frage, ob nicht ebenso Promotoren aus anderen Actinomyceten in *E. coli* in einem ähnlich geringen Umfang erkannt werden. Eine weitere hierbei nicht berücksichtigte Größe ist der Einfluss der α -Untereinheit der RNA Polymerase.²³⁸ In der Literatur ist kein Beispiel für einen Promotor aus einer *Rhodococcus* Spezies bekannt, der in *E. coli* funktionsfähig ist.

3.2 Aufreinigung und Charakterisierung der Hydrolase aus *R. ruber* DSM44319

Aus der Literatur sind die Proteinaufreinigungen von drei bakteriellen Epoxidhydrolasen bekannt. Die Epoxidhydrolase aus *Rhodococcus* sp. NCIMB11216 wurde über eine vierstufige Aufreinigung isoliert. Zuerst wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenylsepharose CL-4B durchgeführt. Die Epoxidhydrolase erwies sich als sehr lipophil und wurde ohne Zugabe von Salz vollständig an der Matrix gebunden. Es musste deshalb gegen Wasser eluiert werden. Anschließend wurde eine Anionenaustauschchromatographie an Source 30 Q durchgeführt und im Anschluss erfolgte eine weitere hydrophobe Interaktionschromatographie an Benzylthiosepharose. Auch dabei wurde eine starke Bindung an das Trägermaterial beobachtet. Nach Aufkonzentrierung erfolgte eine Gelfiltration an Superdex 75 HR und dadurch konnte ein homogenes monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 35 kDa erhalten werden. Die Proteinsequenzierung war wegen einer N-terminalen Blockierung nicht möglich.⁴²

Als dritte mikrobielle Epoxidhydrolase wurde das Enzym aus *Nocardia* sp. EH1, einem Stamm aus der Familie der Actinomyceten, aufgereinigt. Auch hier wurde eine vierstufige Aufreinigung analog zur Epoxidhydrolase aus *Rhodococcus* sp. durchgeführt. Die Epoxidhydrolase ist ebenfalls ein sehr lipophiles Protein und im aufgereinigten Zustand viel instabiler als unaufgereinigt. Durch den Zusatz von Tween 80 oder Triton X-100 bei der Aufreinigung konnte eine teilweise Stabilisierung des Proteins erreicht werden. Die N-terminale Sequenz des Proteins ist nicht bekannt.⁸⁵

Aus *Corynebacterium* sp. C12 wurde die Epoxidhydrolase durch Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose und anschließender hydrophober Interaktionschromatographie an Phenylsepharose aufgereinigt. Die Proteinsequenzierung des N-Terminus der Epoxidhydrolase konnte im Anschluss erfolgreich durchgeführt werden.⁶⁴ Analog zum Vorgehen von Misawa

et al. konnte die Hydrolaseaktivität der *R. ruber* Zellen durch Induktion mit *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure stark erhöht werden⁶⁴ und durch Zusätze die Enzymaktivität gesteigert werden.⁸⁵

Die Hydrolase aus *R. ruber* DSM44319 wurde in einer 6 stufigen Reinigungsprozedur aufgereinigt. Die Ausbeute der Fraktion mit dem besten Reinigungsfaktor von 462 war 0,3 %. Es konnten also ausgehend von ca. 560 U nur ca. 2 U mit einer spezifischen Aktivität von 96 U/mg erhalten werden. Eine Reinigung aus *R. ruber* DSM44319 als Alternative zu einer rekombinanten Darstellung kommt also für einen technischen Prozess nicht in Frage. Die größten Aufreinigungseffekte wurden erst im letzten Reinigungsschritt, der hochauflösenden Anionenaustausch Chromatographie erzielt. Die Reinigungsfaktoren der Gelfiltration, Anionenaustausch Chromatographie und der hochauflösenden HIC waren kleiner 1 und somit auf den ersten Blick unnötig. Die SDS-PAGE zeigte aber deutlich, dass nach jedem Reinigungsschritt eine weniger komplexe Proteinlösung vorlag. Der Grund für die teilweise sehr schlechten Reinigungsfaktoren war die Deaktivierung der nur begrenzt stabilen Hydrolase. Dem konnte zwar durch Zugabe von Glycerin entgegengewirkt, die Deaktivierung aber nicht ausgeschlossen werden.

Die biochemischen Eigenschaften der Hydrolase wurden bestimmt. Das pH-Optimum lag bei 8, das Temperaturoptimum bei 40°C. Mit steigender NaCl-Konzentration ging eine sinkende Hydrolaseaktivität einher. Natriumwolframat inhibierte die Enzymaktivität analog zu den von Mikova *et al.* bestimmten Werten.²³⁹ Ein interessantes Verhalten zeigte die Enantioselektivität der Hydrolyse. Wurde die Hydrolyse bei 30°C durchgeführt, konnte gaschromatographisch nur L(+)-Weinsäure detektiert werden. Als die Reaktionstemperatur erniedrigt wurde, sank der gemessene *ee*-Wert für L(+)-Weinsäure auf 67 %. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur verursachte ebenfalls eine Erniedrigung des *ee*-Wertes auf 90%. Die Abhängigkeit des *ee*-Wertes von der Temperatur ist auf die unterschiedliche Temperaturabhängigkeit von der Differenz der Aktivierungsenthalpien der Übergangszustände, $\Delta_{R-S}\Delta H^\ddagger$ und der Differenz der Aktivierungsentropien der Übergangszustände $\Delta_{R-S}\Delta S^\ddagger$ zurückzuführen.²⁴⁰⁻²⁴²

Der N-Terminus konnte nach der Aufreinigung problemlos sequenziert werden und zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu der Halogencarbonsäure Dehalogenase aus *Xanthobacter autotrophicus*. Die nach Proteasespaltung bestimmten Peptidfragmente konnten ebenfalls teilweise in der *Xanthobacter autotrophicus* Sequenz wiedergefunden werden. Der N-Terminus und die Peptidfragmente konnten eindeutig in der Proteinsequenz einer Epoxidhydrolase aus *R. rhodochrous* LMPG-18079^{20,21} zugeordnet werden. Mit Primern, abgeleitet aus der patentierten DNA-Sequenz

von *R. rhodochrous* LMPG-18079, konnte aus chromosomaler DNA von *R. ruber* DSM44319 das Hydrolasegen amplifiziert werden. Der Vergleich der beiden DNA-Sequenzen zeigte, dass die Hydrolasegene aus beiden Organismen identisch sind. Das Hydrolasegene konnte dann von H. Schewe im Rahmen einer Diplomarbeit in *E. coli* DH5 α funktionel exprimiert werden.²⁴³ Damit ist das *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure Hydrolasegen entweder hochkonserviert oder die beiden *Rhodococcus*-Stämme sind identisch.

3.3 Funktion und Proteinsequenz der Hydrolase aus *R. ruber* DSM44319

Die nachgewiesene Enzymaktivität klassifizierte das Enzym eindeutig als Epoxidhydrolase, da ein Epoxid als Substrat unter Anlagerung von Wasser in ein *vicinales* Diol hydrolysiert wurde (s. Abb. C.27). Die Proteinsequenz deutete auf eine andere Funktion, die einer Halogencarbonsäure Dehalogenase. Halogencarbonsäure Dehalogenasen katalysieren die Hydrolyse von α -Halogencarbonsäuren zu α -Hydroxycarbonsäuren (Abb. D.2). Wichtig ist bei dieser Enzymklasse, dass das Substrat durch seine Carboxylatfunktion in der Bindungstasche durch elektrostatische Wechselwirkungen gebunden wird. Dann erfolgt die Hydrolyse am α -Kohlenstoff durch eine saure Aminosäure. Die Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure muss ebenfalls am α -Kohlenstoff der Carboxylatgruppe erfolgen. Dabei wird ein Esterintermediat gebildet, welches in einer nachfolgenden Reaktion hydrolysiert wird. Dies entspricht einer Hydrolyse eines Epoxides durch eine Epoxidhydrolase.

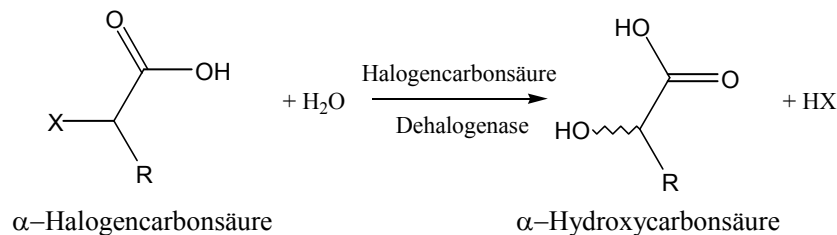


Abb. D.2: Hydrolyse von α -Halogencarbonsäuren zu α -Hydroxycarbonsäuren durch Halogencarbonsäure Dehalogenasen.

Auch die beiden Substrate sind von ihrer Chemie her ähnlich. Am α -Kohlenstoff findet der nukleophile Angriff statt. Im einen Fall wird einmal eine Kohlenstoff-Chlorbindung und im anderen eine Kohlenstoff-Sauerstoffbindung geöffnet. Die C-O Bindung ist etwas stärker als die C-Cl Bindung, aber bei der Öffnung des Oxiranringes werden 27 kcal/mol Ringenergie frei und diese gleichen den Unterschied in den Bindungsenergien aus.²⁴⁴ Auch die Fixierung des

Substrates in der Bindungstasche kann auf die selbe Weise erfolgen. Einziger Unterschied in der Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicaronsäure ist, dass das Nucleofug nicht durch die „Halogenid-Kralle“ gebunden wird, sondern immer noch am Substrat gebunden bleibt.

Die Hydrolase aus *R. ruber* DSM44319, bzw. *R. rhodochrous* LMPG-18079 ist aufgrund ihrer Funktion als Epoxidhydrolase, aufgrund ihrer Proteinsequenz als Halogencarbonsäure Dehalogenase zu klassifizieren.

E Zusammenfassung

Die Enzymklasse der Epoxidhydrolasen stellt einen interessanten Zugang zu enantiomerenreinen optisch aktiven Epoxiden und *vicinalen* Diolen dar, welche als wichtige chirale Bausteine in der organischen Chemie Anwendung finden.

Das Ziel der Arbeit war die Suche nach dem Substratspektrum dreier rekombinanter, putativer Epoxidhydrolasen und die Aufreinigung und Charakterisierung einer Hydrolase aus *R. ruber* DSM44319.

Im ersten Teil der Arbeit wurden drei putative Epoxidhydrolasen aus *B. subtilis*, *C. glutamicum* und *M. charantia*, die durch Sequenzvergleiche identifiziert wurden, untersucht. Durch die Analyse der Proteinsequenz kann nicht auf die Substratspezifität rückgeschlossen werden, deshalb muss die Funktionalität mit mehreren, chemisch unterschiedlichen Epoxiden getestet werden. Keiner der zu Beginn der Arbeit bekannten Epoxidhydrolaseaktivitätstests war dazu in der Lage. Deshalb wurde ein Produktnachweis in Mikrotiterplatten für *vicinale* Diole entwickelt. Dies geschah auf zwei Arten. In beiden Fällen wurde eine Periodatspaltung mit dem Produkt der Epoxidhydrolyse durchgeführt.

Im ersten Assaysystem wurden die Spaltprodukte mit Pararosanilin in einer Farbreaktion nachgewiesen (PSS-Assay). Der PSS-Assay erlaubt den direkten Nachweis der 1,2-Diole in wässriger Lösung in Gegenwart von Zelllysat. Der PSS Test wurde mit vier Substrat/Produkt Kombinationen validiert:

1. ein aromatisches Epoxid und korrespondierendes 1,2-Diol (Styroxid und 1,2-Phenylethandiol),
2. ein aliphatisches Epoxid und 1,2-Diol (1,2-Epoxybutan und 1,2-Butandiol),
3. ein cyclisches Epoxid und 1,2-Diol (1,2-Epoxy cyclohexan und 1,2-Cyclohexandiol),
4. ein chloriertes Epoxid und 1,2-Diol (Epichlorhydrin und 3-Chlor-1,2-propandiol).

Diese Kombinationen deckten ein breites chemisches Spektrum ab. In allen Fällen konnte ein Diolgehalt von mindestens 5 $\mu\text{mol/ml}$ sicher detektiert werden. Die Standardfehler lagen unter 8% und somit ist der PSS-Assay auch zum Variantenscreening geeignet. Der Assay wurde mit einem Beckman 2000-Laborroboter mit Greifarm automatisiert, womit 960 Tests pro Tag durchgeführt werden konnten. Nachteile dieses Vorgehens sind die Beschränkung auf 1,2-Diole die mindestens eine sekundäre Hydroxylgruppe haben und die vielen Pipettierschritte. Vorteil des

PSS-Assays ist der direkte Produktnachweis. Mit dem PSS-Assay konnte die Epoxidhydrolaseaktivität von *S. antibioticus* TÜ4 bestimmt werden.

Im zweiten Assaysystem wurde das nach der Spaltung verbliebene Periodat mit Carboxyfluorescein nachgewiesen. Dabei wird die Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffes zerstört. Dadurch kann die Fluoreszenz als Maß für die Epoxidhydrolaseaktivität genommen werden. Der PSC-Assay wurde mit sieben verschiedenen Epoxiden und korrespondierenden 1,2-Diolen validiert. Die 1,2-Diole in den Substrat/Produkt Gemischen aus 1,2-Epoxybutan/1,2-Butandiol, 1,2-Epoxyhexan/1,2-Hexandiol, Epichlorhydrin/3-Chlor-1,2-propandiol, Epoxycyclohexan/*trans*-1,2-Cyclohexandiol, 2,3-Epoxybutan/2,3-Butandiol und Stilbenoxid/Hydrobenzoin konnten mit sehr guten Standardfehlern von unter 4 % und mit einem Detektionslimit von $<1 \mu\text{mol/ml}$ nachgewiesen werden und somit ist der PSC Test besser zum Variantenscreening geeignet. Im Falle des Styroloxids und 1,2-Phenylethandiols konnte kein linearer Zusammenhang zwischen Diolgehalt und Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dies konnte auf die Störung des PSC-Assays durch DMSO zurückgeführt werden. Andere Lösungsvermittler wie Aceton, Ethanol und DMF haben keinen Einfluss auf die Testreaktion. Nachteilig ist, dass hier nicht das Produkt der Enzymreaktion direkt nachgewiesen wird und dass nicht alle Lösungsvermittler anwendbar sind. Vorteile bei diesem Vorgehen sind die niedrigen Standardfehler und das sehr geringe Detektionslimit. Durch eine geringere Zahl von Pipettierschritten konnte in der Automatisierung die Testzahl verdoppelt werden.

Es wurden drei putative Epoxidhydrolasen aus *B. subtilis*, *C. glutamicum* und *M. charantia* untersucht. Es stellte sich heraus, dass in der Proteinsequenz aus *C. glutamicum* zwei der Aminosäuren der Katalytischen Triade und die Protonendonoren fehlten. Somit handelt es sich hierbei um keine Epoxidhydrolase. Alle Proteine konnten löslich, rekombinant in *E. coli* dargestellt werden. Diese Proteinfractionen wurden mit sieben Epoxiden mit Hilfe des PSS und PSC-Assay auf Epoxidhydrolaseaktivität untersucht. Dabei konnte keine Epoxidhydrolaseaktivität gegen die getesteten Epoxide festgestellt werden.

L(+)-Weinsäure wird in einem Maßstab von 30000 t/a bei Preisen von 5 €/kg vorwiegend aus Rückständen der Weinerzeugung hergestellt. Die sich daraus ergebenden starken jahreszeitlichen Schwankungen machen eine von Naturstoff unabhängigen Zugang zu L(+)-Weinsäure attraktiv. Ein interessanter, möglicher Zugang zu L(+)-Weinsäure ist die Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure. Dabei wird das substituierte Oxiran durch eine Epoxidhydrolase stereoselektiv zu

L(+)-Weinsäure umgesetzt. *R. ruber* DSM44319 ist in der Lage, sowohl in Form ganzer Zellen, als auch in Form von Zellextrakt *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure zu L(+)-Weinsäure zu hydrolysieren (Abb. C.27).^{1,2}

Das für die Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure verantwortliche Enzym wurde aus *R. ruber* DSM44319 durch eine mehrstufige Aufreinigung mit einem Reinigungsfaktor von rund 450 gereinigt. Das aufgereinigte Protein wurde charakterisiert und dabei das Temperaturoptimum zu 40°C und der optimale pH-Wert der Hydrolase zu 8 bestimmt. Die Hemmung des Enzyms durch Natriumwolframat aus der Substratsynthese konnte ebenfalls bestimmt werden. Die Temperaturabhängigkeit der Enantioselektivität bei der Bildung von Weinsäure wurde bestimmt. Bei 30°C wird L(+)-Weinsäure mit einem *ee*-Wert von > 99% gebildet. Das gereinigte Protein konnte N-terminal ansequenziert werden. Nach einer Proteasespaltung konnten die resultierenden internen Peptide sequenziert werden. Mit diesen Sequenzen wurde bei einer Datenbanksuche in den US Patenten eine Hydrolase aus *R. rhodochrous* LMPG-18079 gefunden, die ebenfalls die Hydrolyse von *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure zu L(+)-Weinsäure katalysiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Protein- und DNA Sequenz aus *R. rhodochrous* LMPG-18079 und *R. ruber* DSM44319 identisch sind. Durch Proteinsequenzvergleiche mit bekannten Epoxidhydrolasen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die vorliegende Hydrolase keine Epoxidhydrolase bekannten Typs ist, da ihr die dafür notwendigen katalytischen Aminosäure fehlen. Durch einen Vergleich mit bekannten Halogencarbonsäure Dehalogenasen aus *Xanthobacter autotrophicus* und *Pseudomonas* sp. YL konnte gezeigt werden, dass die Hydrolase aufgrund ihrer Proteinsequenz als Halogencarbonsäure Dehalogenase einzustufen ist, obwohl sie in ihrer Funktionalität einer Epoxidhydrolase entspricht.

F Literatur

1. Miura, Y., Yutani, K., Izumi, Y., Process for preparing L-tartratic acid, Patent, 4010072, United States (1976).
2. Sato, E., Yanai, A., Method for preparing D-tartratic acid, Patent, 3957579, United States (1976).
3. Weijers, C. A. G. M., Bont, J. A. M. d., Epoxide hydrolases from yeast and other sources: versatile tools in biocatalysis, *J Mol Catal B: Enzymatic* **6**, 199 (1999).
4. Fretland, A. J., Omiecinski, C. J., Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology, *Chem Biol Interact* **129**, 41 (2000).
5. Lacourciere, G. M., Armstrong, R. N., The catalytic mechanism of microsomal epoxide hydrolase involves an ester intermediate, *J Am Chem Soc* **115**, 10466 (1993).
6. Borhan, B., Jones, A. D., Pinot, F., Grant, D. F., Kurth, M. J., Hammock, B. D., Mechanism of soluble epoxide hydrolase - Formation of an alpha-hydroxy ester-enzyme intermediate through Asp-333, *J Biol Chem* **270**, 26923 (1995).
7. Rink, R., Janssen, D. B., Kinetic mechanism of the enantioselective conversion of styrene oxide by epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1, *Biochemistry* **37**, 18119 (1998).
8. Arand, M., Wagner, H., Oesch, F., Asp333, Asp495, and His523 form the catalytic triad of rat soluble epoxide hydrolase, *J Biol Chem* **271**, 4223 (1996).
9. Laughlin, L. T., Tzeng, H. F., Lin, S., Armstrong, R. N., Mechanism of microsomal epoxide hydrolase. Semifunctional site-specific mutants affecting the alkylation half-reaction, *Biochemistry* **37**, 2897 (1998).
10. Arand, M., Muller, F., Mecky, A., Hinz, W., Urban, P., Pompon, D., Kellner, R., Oesch, F., Catalytic triad of microsomal epoxide hydrolase: replacement of Glu404 with Asp leads to a strongly increased turnover rate, *Biochem J* **337 (Pt 1)**, 37 (1999).
11. Faber, K., Mischitz, M., Kroutil, W., Microbial epoxide hydrolases, *Acta Chem Scand* **50**, 249 (1996).
12. Nardini, M., Ridder, I. S., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Rink, R., Janssen, D. B., Dijkstra, B. W., The x-ray structure of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. An enzyme to detoxify harmful epoxides, *J Biol Chem* **274**, 14579 (1999).

13. Argiriadi, M. A., Morisseau, C., Hammock, B. D., Christianson, D. W., Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: structure, mechanism and evolution of liver epoxide hydrolase, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10637 (1999).
14. Zou, J., Hallberg, B. M., Bergfors, T., Oesch, F., Arand, M., Mowbray, S. L., Jones, T. A., Structure of *Aspergillus niger* epoxide hydrolase at 1.8 Å resolution: implications for the structure and function of the mammalian microsomal class of epoxide hydrolases, *Structure Fold Des* **8**, 111 (2000).
15. Archelas, A., Furstoss, R., Synthetic applications of epoxide hydrolases, *Curr Opin Chem Biol* **5**, 112 (2001).
16. Steinreiber, A., Faber, K., Microbial epoxide hydrolases for preparative biotransformations, *Curr Opin Biotechnol* **12**, 552 (2001).
17. Fatiadi, A. J., New applications of periodic acid and periodates in organic and bio-organic chemistry, *Synthesis-Stuttgart* **4**, 229 (1974).
18. Zocher, F., Enzelberger, M. M., Bornscheuer, U. T., Hauer, B., Wohlleben, W., Schmid, R. D., Epoxide hydrolase activity of *Streptomyces* strains, *J Biotechnol* **77**, 287 (2000).
19. Maurer, R., Eine einfache kolorimetrische Schnellmethode zur Weinsäurebestimmung für das Betriebslabor, *Weinberg und Keller* **14**, 323 (1967).
20. Dauvrin, T., Deslee, P., Epoxide hydrolase, Patent, EP 0911392A1, Europe (1999).
21. Dauvrin, T., Deslee, P., Epoxide hydrolase, Patent, US 6379938, USA (2002).
22. Ridder, I. S., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkstra, B. W., Crystal structures of intermediates in the dehalogenation of haloalkanoates by L-2-haloacid dehalogenase, *J Biol Chem* **274**, 30672 (1999).
23. Ridder, I. S., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W., Haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 refined at 1.15 Å resolution, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55 (Pt 7)**, 1273 (1999).
24. Pedragosa-Moreau, S., Archelas, A., Furstoss, R., Enantiopure epoxides - access via chemical or enzymatic routes, *B Soc Chim Fr* **132**, 769 (1995).
25. Gao, Y., Hanson, R. M., Klunder, J. M., Ko, S. Y., Masamune, H., Sharpless, K. B., Catalytic asymmetric epoxidation and kinetic resolution - Modified procedures including insitu derivatization, *J Am Chem Soc* **109**, 5765 (1987).
26. Hosoya, N., Hatayama, A., Irie, R., Sasaki, H., Katsuki, T., Rational design of Mn-Salen epoxidation catalysts: Preliminary results, *Tetrahedron* **50**, 4311 (1994).
27. Debont, J. A. M., Bioformation of optically pure epoxides, *Tetrahedron-Asymmetr* **4**, 1331 (1993).

28. Besse, P., Veschambre, H., Chemical and biological synthesis of chiral epoxides, *Tetrahedron* **50**, 8885 (1994).
29. Onumonu, A. N., Colocoussi, A., Matthews, C., Woodland, M. P., Leak, D. J., Microbial alkene epoxidation - merits and limitations, *Biocatalysis* **10**, 211 (1994).
30. Archelas, A., Furstoss, R., Biocatalytic approaches for the synthesis of enantiopure epoxides, *Top Curr Chem* **200**, 159 (1999).
31. Swaving, J., Bont, J. A. N. D., Microbial transformation of epoxides, *Enzyme Microb Technol* **22**, 19 (1998).
32. Orru, R. V., Archelas, A., Furstoss, R., Faber, K., Epoxide hydrolases and their synthetic applications, *Adv Biochem Eng Biotechnol* **63**, 145 (1999).
33. Archelas, A., Furstoss, R., Epoxide hydrolases: new tools for the synthesis of fine organic chemicals, *Trends Biotechnol* **16**, 108 (1998).
34. Hammock, B. D., Grant, D. F., Storms, D. H. in *Comprehensive Toxicology* (eds. Sipes, I., McQueen, C., Gandolfi, A.), 283 - 305 (Pergamon, Oxford, 1996).
35. Blée, E., Schuber, F., Stereocontrolled hydrolysis of the linoleic acid monoepoxide regioisomers catalyzed by soy-bean epoxide hydrolase, *Eur J Biochem* **230**, 229 (1995).
36. Linderman, R. J., Walker, E. A., Haney, C., Roe, R. M., Determination of the regiochemistry of insect epoxide hydrolase catalyzed epoxide hydration of juvenile-hormone by O-18-labeling studies, *Tetrahedron* **51**, 10845 (1995).
37. Weijers, C. A. G. M., Enantioselective hydrolysis of aryl, alicyclic and aliphatic epoxides by *Rhodotorula glutinis*, *Tetrahedron-Asymmetr* **8**, 639 (1997).
38. Morisseau, C., Nellaiah, H., Archelas, A., Furstoss, R., Baratti, J. C., Asymmetric hydrolysis of racemic *para*-nitrostyrene oxide using an epoxide hydrolase preparation from *Aspergillus niger*, *Enzyme Microb Technol* **20**, 446 (1997).
39. Pedragosa-Moreau, S., Morisseau, C., Zylber, J., Archelas, A., Baratti, J., Furstoss, R., Microbiological transformations. 33. Fungal epoxide hydrolases applied to the synthesis of enantiopure *para*-substituted styrene oxides. A mechanistic approach, *J Org Chem* **61**, 7402 (1996).
40. Grogan, G., Roberts, S. M., Willetts, A. J., Novel aliphatic epoxide hydrolase activities from dematiaceous fungi, *FEMS Microbiol Lett* **141**, 239 (1996).
41. Choi, W. J., Huh, E. C., Park, H. J., Lee, E. Y., Choi, C. Y., Kinetic resolution for optically active epoxides by microbial enantioselective hydrolysis, *Biotechnol Tech* **12**, 225 (1998).
42. Mischitz, M., Faber, K., Willetts, A., Isolation of a highly enantioselective epoxide hydrolase from *Rhodococcus* sp. NCIMB11216, *Biotechnol Lett* **17**, 893 (1995).

43. Osprian, I., Kroutil, W., Mischitz, M., Faber, K., Biocatalytic resolution of 2-methyl-2-(aryl)alkyloxiranes using novel bacterial epoxide hydrolases, *Tetrahedron-Asymmetr* **8**, 65 (1997).
44. Mischitz, M., Faber, K., Chemo-enzymatic synthesis of (2*R*,5*S*)- and (2*R*,5*R*)-5-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2-methyl-2-vinyl-tetrahydrofuran ('linalool oxide'): Preparative application of a highly selective epoxide hydrolase, *Syntlett* **10**, 978 (1996).
45. Mischitz, M., Kroutil, W., Wandel, U., Faber, K., Asymmetric microbial hydrolysis of epoxides, *Tetrahedron-Asymmetr* **6**, 1261 (1995).
46. Kroutil, W., Mischitz, M., Plachota, P., Faber, K., Deracemization of (±)-*cis*-2,3-epoxyheptane via enantioconvergent biocatalytic hydrolysis using *Nocardia* EH1-epoxide hydrolase, *Tetrahedron Lett* **37**, 8379 (1996).
47. Mischitz, M., Mirtl, C., Saf, R., Faber, K., Regioselectivity of *Rhodococcus* NCIMB 11216 epoxide hydrolase: Applicability of *E*-values for description of enantioselectivity depends on substrate structure, *Tetrahedron-Asymmetr* **7**, 2041 (1996).
48. Mischitz, M., Hacking, A., Francesconi, I., Faber, K., Enzyme-triggered opening of an epoxide - Chemoenzymatic synthesis of (2*r*,5*r*)-Pityol and (2*s*,5*r*)-Pityol, *Tetrahedron* **50**, 8661 (1994).
49. Mischitz, M., Faber, K., Asymmetric opening of an epoxide by azide catalyzed by an immobilized enzyme preparation from *Rhodococcus* sp, *Tetrahedron Lett* **35**, 81 (1994).
50. Kroutil, W., Osprian, I., Mischitz, M., Faber, K., Chemoenzymatic synthesis of (*S*)-(-)-frontalin using bacterial epoxide hydrolases, *Synthesis-Stuttgart* **2**, 156 (1997).
51. Kroutil, W., Mischitz, M., Plachota, P., Faber, K., Deracemization of (+/-)-*cis*-2,3-epoxyheptane via enantioconvergent biocatalytic hydrolysis using *Nocardia* EH1-epoxide hydrolase, *Tetrahedron Lett* **37**, 8379 (1996).
52. Shou, M., Gonzalez, F. J., Gelboin, H. V., Stereoselective epoxidation and hydration at the K-region of polycyclic aromatic hydrocarbons by cDNA-expressed cytochromes P450 1A1, 1A2, and epoxide hydrolase, *Biochemistry* **35**, 15807 (1996).
53. Beetham, J. K., Grant, D., Arand, M., Garbarino, J., Kiyosue, T., Pinot, F., Oesch, F., Belknap, W. R., Shinozaki, K., Hammock, B. D., Gene evolution of epoxide hydrolases and recommended nomenclature, *DNA Cell Biol* **14**, 61 (1995).
54. Zeldin, D. C., Wei, S. Z., Falck, J. R., Hammock, B. D., Snapper, J. R., Capdevila, J. H., Metabolism of epoxyeicosatrienoic acids by cytosolic epoxide hydrolase - Substrate structural determinants of asymmetric catalysis, *Arch Biochem Biophys* **316**, 443 (1995).
55. Oesch, F., Mammalian epoxide hydrolases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds, *Xenobiotica* **3**, 305 (1973).

56. Mueller, M. J., Samuelsson, B., Haeggstrom, J. Z., Chemical modification of leukotriene A4 hydrolase. Indications for essential tyrosyl and arginyl residues at the active site, *Biochemistry* **34**, 3536 (1995).
57. Watabe, T., Kanai, M., Isobe, M., Ozawa, N., The hepatic microsomal biotransformation of delta 5-steroids to 5 alpha, 6 beta-glycols via alpha- and beta-epoxides, *J Biol Chem* **256**, 2900 (1981).
58. Pace-Asciak, C. R., Lee, W. S., Purification of hepoxilin epoxide hydrolase from rat liver, *J Biol Chem* **264**, 9310 (1989).
59. Schottler, M., Boland, W., Biosynthesis of dodecano-4-lactone in ripening fruits: Crucial role of an epoxide-hydrolase in enantioselective generation of aroma components of the nectarine (*Prunus persica var nucipersica*) and the strawberry (*Fragaria ananassa*), *Helv Chim Acta* **79**, 1488 (1996).
60. Blee, E., Schuber, F., Biosynthesis of cutin monomers - Involvement of a lipoxygenase peroxygenase pathway, *Plant J* **4**, 113 (1993).
61. Wojtasek, H., Prestwich, G. D., An insect juvenile hormone-specific epoxide hydrolase is related to vertebrate microsomal epoxide hydrolases, *Biochem Bioph Res Co* **220**, 323 (1996).
62. Schladt, L., Worner, W., Setiabudi, F., Oesch, F., Distribution and inducibility of cytosolic epoxide hydrolase in male Sprague-Dawley rats, *Biochem Pharmacol* **35**, 3309 (1986).
63. Puente, X. S., LopezOtin, C., The PLEES proteins: A family of structurally related enzymes widely distributed from bacteria to humans, *Biochemical Journal* **322**, 947 (1997).
64. Misawa, E., Chan Kwo Chion, C. K., Archer, I. V., Woodland, M. P., Zhou, N. Y., Carter, S. F., Widdowson, D. A., Leak, D. J., Characterisation of a catabolic epoxide hydrolase from a *Corynebacterium* sp, *Eur J Biochem* **253**, 173 (1998).
65. Allen, R. H., Jakoby, W. B., Tartaric acid metabolism .9. Synthesis with tartrate epoxidase, *J Biol Chem* **244**, 2078 (1969).
66. Bellucci, G., Chiappe, C., Ingrosso, G., Kinetics and stereochemistry of the microsomal epoxide hydrolase-catalyzed hydrolysis of *cis*-stilbene oxides, *Chirality* **6**, 577 (1994).
67. Bellucci, G., Chiappe, C., Cordini, A., Marioni, F., Enantioselectivity in the Rabbit liver microsomal biotransformation of styrene and phenylpropenes, *Biocatalysis* **10**, 149 (1994).
68. Bellucci, G., Chiappe, C., Cordini, A., Marioni, F., Different enantioselectivity and regioselectivity of the cytosolic and microsomal epoxide hydrolase catalyzed-hydrolysis of simple phenyl-substituted epoxides, *Tetrahedron Lett* **35**, 4219 (1994).

69. Bellucci, G., Chiappe, C., Cordoni, A., Ingrosso, G., Enantioconvergent transformation of racemic cis-dialkyl substituted epoxides to (*R,R*) threo diols by microsomal epoxide hydrolase catalysed hydrolysis, *Tetrahedron Lett* **37**, 9089 (1996).
70. Niehaus, W. G., Schroepf, G., Enzymatic stereospecificity in hydration of epoxy fatty acids. Stereospecific incorporation of oxygen of water, *J Am Chem Soc* **89**, 4227 (1967).
71. Michaels, B. C., Ruettinger, R. T., Fulco, A. J., Hydration of 9,10-epoxypalmitic acid by a soluble enzyme from *Bacillus megaterium*, *Biochem Biophys Res Commun* **92**, 1189 (1980).
72. Debont, J. A. M., Vandijken, J. P., Vanginkel, K. G., The metabolism of 1,2-propanediol by the propylene-oxide utilizing Bacterium *Nocardia-A60*, *Biochim Biophys Acta* **714**, 465 (1982).
73. Escoffier, B., Prome, J. C., Conversion of steroids and triterpenes by mycobacteria - Stereospecific hydrolysis of steroidal spiro-3-xi-oxiranes by *Mycobacterium aurum*, *Bioorg Chem* **17**, 53 (1989).
74. Jacobs, M. H., Van den Wijngaard, A. J., Pentenga, M., Janssen, D. B., Characterization of the epoxide hydrolase from an epichlorohydrin-degrading *Pseudomonas* sp, *Eur J Biochem* **202**, 1217 (1991).
75. Nakamura, T., Nagasawa, T., Yu, F., Watanabe, I., Yamada, H., Resolution and some properties of enzymes involved in enantioselective transformation of 1,3-dichloro-2-propanol to (*R*)-3-chloro-1,2-propanediol by *Corynebacterium* sp. strain N-1074, *J Bacteriol* **174**, 7613 (1992).
76. Wackett, L. P., Gibson, D. T., Metabolism of xenobiotic compounds by enzymes in cell extracts of the fungus *Cunninghamella elegans*, *Biochem J* **205**, 117 (1982).
77. Wandel, U., Mischitz, M., Kroutil, W., Faber, K., Highly selective asymmetric hydrolysis of 2,2-disubstituted epoxides using lyophilized cells of *Rhodococcus* sp. NCIMB11216, *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 735 (1995).
78. Archelas, A., Delbecq, J. P., Furstoss, R., Microbiological transformations .30. Enantioselective hydrolysis of racemic epoxides - the synthesis of enantiopure insect juvenile-hormone analogs (Bowers Compound), *Tetrahedron-Asymmetry* **4**, 2445 (1993).
79. Bartlett, P. A., Marlowe, C. K., Connolly, P. J., Banks, K. M., Chui, D. W. H., Dahlberg, P. S., Haberman, A. M., Kim, J. S., Klassen, K. J., Lee, R. W., Lum, R. T., Mebane, E. W., Ng, J. A., Ong, J. C., Sagheb, N., Smith, B., Yu, P., Synthesis of frontalin, the aggregation pheromone of the southern Pine-Beetle - a multistep organic-synthesis for undergraduate students, *J Chem Educ* **61**, 816 (1984).
80. Spelberg, J. H. L., Rink, R., Kellogg, R. M., Janssen, D. B., Enantioselectivity of a recombinant epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter*, *Tetrahedron-Asymmetry* **9**, 459 (1998).

81. Rink, R., Fennema, M., Smids, M., Dehmel, U., Janssen, D. B., Primary structure and catalytic mechanism of the epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1, *J Biol Chem* **272**, 14650 (1997).
82. Botes, A. L., Steenkamp, J. A., Letloenyane, M. Z., van Dyk, M. S., Epoxide hydrolase activity of *Chryseomonas luteola* for the asymmetric hydrolysis of aliphatic mono-substituted epoxides, *Biotechnol Lett* **20**, 427 (1998).
83. Orru, R. V. A., Kroutil, W., Faber, K., Deracemization of (\pm)-2,2-disubstituted epoxides via enantioconvergent chemoenzymic hydrolysis using *Nocardia* EH1 epoxide hydrolase and sulfuric acid, *Tetrahedron Lett* **38**, 1753 (1997).
84. Kroutil, W., Orru, R. V. A., Faber, K., Stabilization of *Nocardia* EH1 epoxide hydrolase by immobilization, *Biotechnol Lett* **20**, 373 (1998).
85. Kroutil, W., Genzel, Y., Pietzsch, M., Syldatk, C., Faber, K., Purification and characterization of a highly selective epoxide hydrolase from *Nocardia* sp. EH1, *J Biotechnol* **61**, 143 (1998).
86. Orru, R. V. A., Osprian, I., Kroutil, W., Faber, K., An efficient large-scale synthesis of (*R*)-(-)-mevalonolactone using simple biological and chemical catalysts, *Synthesis-Stuttgart* **9**, 1259 (1998).
87. van der Werf, M. J., Overkamp, K. M., de Bont, J. A. M., Limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 belongs to a novel class of epoxide hydrolases, *J Bacteriol* **180**, 5052 (1998).
88. Weijers, C. A. G. M., Botes, A. L., van Dyk, M. S., de Bont, J. A. M., Enantioselective hydrolysis of unbranched aliphatic 1,2-epoxides by *Rhodotorula glutinis*, *Tetrahedron-Asymmetr* **9**, 467 (1998).
89. Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift, *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 573 (2000).
90. Kuhn, T. S., *The structure of scientific revolutions* (Univ. of Chicago Press, Chicago, 1970).
91. Molin, J., Molin, S., CASE: Complex adaptive systems ecology, *Adv Microb Ecol* **15**, 27 (1997).
92. Wei, J. in *Proceedings of the 8th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering congress 1 - 5* (Seoul Korea, 1999).
93. Umezawa, H., *Enzyme inhibitors of microbial origin* (Univ. Park Pr., Baltimore, 1972).
94. Bains, W., Company strategies for using bioinformatics, *Trends Biotechnol* **14**, 312 (1996).

95. Smith, H. O., Tomb, J. F., Dougherty, B. A., Fleischmann, R. D., Venter, J. C., Frequency and distribution of DNA uptake signal sequences in the *Haemophilus influenzae* Rd genome, *Science* **269**, 538 (1995).
96. Roach, J. C., Siegel, A. F., van den Engh, G., Trask, B., Hood, L., Gaps in the Human Genome Project, *Nature* **401**, 843 (1999).
97. Marrs, B., Delagrave, S., Murphy, D., Novel approaches for discovering industrial enzymes, *Curr Opin Microbiol* **2**, 241 (1999).
98. Dong, G., Vieille, C., Zeikus, J. G., Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme, *Appl Environ Microbiol* **63**, 3577 (1997).
99. Pedragosa-Moreau, S., Archelas, A., Furstoss, R., Microbiological transformations. 28. Enantiocomplementary epoxide hydrolyses as a preparative access to both enantiomers of styrene oxide, *J Org Chem* **58**, 5533 (1993).
100. Nellaiah, H., Morisseau, C., Archelas, A., Furstoss, R., Baratti, J. C., Enantioselective hydrolysis of *p*-nitrostyrene oxide by an epoxide hydrolase preparation from *Aspergillus niger*, *Biotechnol Bioeng* **49**, 70 (1996).
101. Chen, X.-J., Archelas, A., Furstoss, R., Microbiological transformations. 27. The first examples for preparative-scale enantioselective or diastereoselective epoxide hydrolases using microorganisms. An unequivocal access to all four Bisabolol stereoisomers., *J Org Chem* **58**, 5528 (1993).
102. Elalaoui, M. A., Thaler-Dao, H., Chavis, C., Maury, G., Daiboun, T., Biotransformations of alpha/beta-epoxyalcohols catalyzed by epoxide hydrolases, *Biocatalysis* **1993**, 227 (1993).
103. Barili, P. L., Berti, G., Mastroilli, E., Regiochemistry and stereochemistry of the acid-catalyzed and of a highly enantioselective enzymatic-hydrolysis of some epoxytetrahydrofurans, *Tetrahedron* **49**, 6263 (1993).
104. Pedragosa-Moreau, S., Archelas, A., Furstoss, R., Microbiological transformations .32. Use of epoxide hydrolase mediated biohydrolysis as a way to enantiopure epoxides and vicinal diols: Application to substituted styrene oxide derivatives., *Tetrahedron* **52**, 4593 (1996).
105. Westkaemper, R. B., Hanzlik, R. P., A convenient reverse-phase liquid chromatographic assay for epoxide hydrolase, *Anal Biochem* **102**, 63 (1980).
106. Giuliano, K. A., Lau, E. P., Fall, R. R., Simplified liquid chromatographic assay for epoxide hydrolase, *J Chromatogr* **202**, 447 (1980).
107. Bellucci, G., Chiappe, C., Conti, L., Marioni, F., Pierini, G., Substrate enantioselection in the microsomal epoxide hydrolase catalyzed-hydrolysis of monosubstituted oxiranes - Effects of branching of alkyl chains, *J Org Chem* **54**, 5978 (1989).

108. Basavaiah, D., Raju, S. B., Enantioselective hydrolysis of 2,2-disubstituted oxiranes mediated by microsomal epoxide hydrolase, *Synthetic Commun* **25**, 3293 (1995).
109. Bhatnagar, T., Manoj, K. M., Baratti, J. C., A spectrophotometric method to assay epoxide hydrolase activity, *J Biochem Biophys Methods* **50**, 1 (2001).
110. Chiappe, C., Cordoni, A., Marioni, F., Bellucci, G., Substrate enantioselectivity in the rabbit liver microsomal epoxide hydrolase catalyzed hydrolysis of *trans* and *cis*-1 phenylpropene oxides. A comparison with styrene oxide, *Tetrahedron-Asymmetr* **4**, 1153 (1993).
111. Bellucci, G., Chiappe, C., Marioni, F., Benetti, M., Regio- and enantio-selectivity of the cytosolic epoxide hydrolase-catalyzed hydrolysis of racemic monosubstituted alkyloxiranes, *J Chem Soc Perkin Trans* **1**, 361 (1991).
112. Bellucci, G., Chiappe, C., Cordoni, A., Enantioconvergent transformation of racemic *cis*- β -alkyl substituted styrene oxides to (*R,R*) threo diols by microsomal epoxide hydrolase catalysed hydrolysis, *Tetrahedron-Asymmetr* **7**, 197 (1996).
113. Dietze, E. C., Kuwano, E., Hammock, B. D., Spectrophotometric substrates for cytosolic epoxide hydrolase, *Anal Biochem* **216**, 176 (1994).
114. Westkaemper, R. B., Hanzlik, R. P., Mechanistic studies of epoxide hydrolase utilizing a continuous spectrophotometric assay, *Arch Biochem Biophys* **208**, 195 (1981).
115. Wixtrom, R. N., Hammock, B. D., Continuous spectrophotometric assays for cytosolic epoxide hydrolase, *Anal Biochem* **174**, 291 (1988).
116. Watabe, T., Akamatsu, K., Photometric assay of hepatic epoxide hydrolase activity with safrole oxide (SAFO) as substrate, *Biochem Pharmacol* **23**, 2839 (1974).
117. Sone, T., Isobe, M., Takabatake, E., Ozawa, N., Watabe, T., 7-ethenyloxycoumarin as a new substrate for fluorophotometric assay of hepatic microsomal epoxidizing activities, *J Pharmacobiodyn* **12**, 149 (1989).
118. Hassett, C., Lin, J., Carty, C. L., Laurenzana, E. M., Omiecinski, C. J., Human hepatic microsomal epoxide hydrolase: comparative analysis of polymorphic expression, *Arch Biochem Biophys* **337**, 275 (1997).
119. Isobe, M., Sone, T., Takabatake, E., *p*-Nitrophenyl vinyl ether, a novel substrate for the assay of cytochrome P-450 dependent olefinic epoxidation in hepatic microsomes, *J Pharmacobiodyn* **8**, 614 (1985).
120. Armstrong, R. N., Levin, W., Jerina, D. M., Hepatic microsomal epoxide hydrolase. Mechanistic studies of the hydration of K-region arene oxides, *J Biol Chem* **255**, 4698 (1980).

121. Tzeng, H. F., Laughlin, L. T., Lin, S., Armstrong, R. N., The catalytic mechanism of microsomal epoxide hydrolase involves reversible formation and rate-limiting hydrolysis of the alkyl-enzyme intermediate, *J Am Chem Soc* **118**, 9436 (1996).
122. Badalassi, F., Wahler, D., Klein, G., Crotti, P., Reymond, J. L., A versatile periodate-coupled fluorogenic assay for hydrolytic enzymes, *Angew Chem Int Ed Engl* **39**, 4067 (2000).
123. Preussma, R., Schneide, H., Epple, F., Determination of alkylating agents .2. Detection of different classes by means of a modified colour reaction with 4-(4-nitrobenzyl)-pyridine (NBP), *Arznei-Forschung* **19**, 1059 (1969).
124. Hammock, L. G., Hammock, B. D., Casida, J. E., Detection and analysis of epoxides with 4-(p-Nitrobenzyl)-pyridine, *Bull Environ Contam Toxicol* **12**, 759 (1974).
125. Serrentino, R., Gervasi, P. G., Photometric determination of microsomal epoxide hydrase activity by the 4-(p-nitrobenzyl)pyridine test, *Boll Soc Ital Biol Sper* **56**, 2393 (1980).
126. Hemminki, A., Vayrynen, T., Hemminki, K., Reaction kinetics of alkyl epoxides with DNA and other nucleophiles, *Chem Biol Interact* **93**, 51 (1994).
127. Kim, J. H., Thomas, J. J., Use of 4-(nitrobenzyl)pyridine (4-NBP) to test mutagenic potential of slow-reacting epoxides, their corresponding olefins, and other alkylating agents, *Bull Environ Contam Toxicol* **49**, 879 (1992).
128. Eder, E., Neudecker, T., Lutz, D., Henschler, D., Correlation of alkylating and mutagenic activities of allyl and allylic compounds: standard alkylation test vs. kinetic investigation, *Chem Biol Interact* **38**, 303 (1982).
129. Barbin, A., Bereziat, J. C., Croisy, A., O'Neill, I. K., Bartsch, H., Nucleophilic selectivity and reaction kinetics of chloroethylene oxide assessed by the 4-(p-nitrobenzyl)pyridine assay and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Chem Biol Interact* **73**, 261 (1990).
130. Rietveld, E. C., van Gastel, F. J., Seutter-Berlage, F., Zwanenburg, B., Glutathione conjugation and bacterial mutagenicity of racemic and enantiomerically pure *cis*- and *trans*-methyl epoxycinnamates, *Arch Toxicol* **61**, 366 (1988).
131. Hemminki, K., Heinonen, T., Vainio, H., Alkylation of guanosine and 4-(p-nitrobenzyl)-pyridine by styrene oxide analogues in vitro, *Arch Toxicol* **49**, 35 (1981).
132. Zocher, F., Enzelberger, M. M., Bornscheuer, U. T., Hauer, B., Schmid, R. D., A colorimetric assay suitable for screening epoxide hydrolase activity, *Anal Chim Acta* **391**, 345 (1999).
133. Wahler, D., Reymond, J. L., The adrenaline test for enzymes, *Angew Chem Int Ed Engl* **41**, 1229 (2002).

134. Goodfellow, M. in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (eds. Williams, S. T., Sharp, M. E., Holt, J. G.), 2362 - 2371 (Williams and Wilkins, Baltimore, 1989).
135. Lechavalier, H. A. in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (eds. Williams, S. T., Sharp, M. E., Holt, J. G.), 2348 - 2350 (Williams and Wilkins, Baltimore, 1989).
136. Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. J., Christofi, N., A review - The genus *Rhodococcus*, *J Appl Microbiol* **85**, 195 (1998).
137. Rainey, F. A., Burghardt, J., Kroppenstedt, R. M., Klatte, S., Stackebrandt, E., Phylogenetic analysis of the genera *Rhodococcus* and *Nocardia* and evidence for the evolutionary origin of the genus *Nocardia* from within the radiation of *Rhodococcus* species, *Microbiol-Uk* **141**, 523 (1995).
138. Ivshina, I. B., Kamenskikh, T. N., Liapunov, Y. E., *IEGM catalogue of strains of regional specialised collection of alkanotrophic microorganisms* (Russian Academy of Sciences, Moskau, 1994).
139. McNeil, M. M., Brown, J. M., The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology, *Clin Microbiol Rev* **7**, 357 (1994).
140. Finnerty, W. R., The Biology and Genetics of the Genus *Rhodococcus*, *Annu Rev Microbiol* **46**, 193 (1992).
141. Scott, M. A., Graham, B. S., Verrall, R., Dixon, R., Schaffner, W., Tham, K. T., *Rhodococcus equi* - an increasingly recognized opportunistic pathogen. Report of 12 cases and review of 65 cases in the literature, *Am J Clin Pathol* **103**, 649 (1995).
142. Arlotti, M., Zoboli, G., Moscatelli, G. L., Magnani, G., Maserati, R., Borghi, V., Andreoni, M., Libanore, M., Bonazzi, L., Piscina, A., Ciammarughi, R., *Rhodococcus equi* infection in HIV-positive subjects: a retrospective analysis of 24 cases, *Scand J Infect Dis* **28**, 463 (1996).
143. Donisi, A., Suardi, M. G., Casari, S., Longo, M., Cadeo, G. P., Carosi, G., *Rhodococcus equi* infection in HIV-infected patients, *Aids* **10**, 359 (1996).
144. Yuoh, G., Hove, M. G., Wen, J., Haque, A. K., Pulmonary malakoplakia in acquired immunodeficiency syndrome: an ultrastructural study of morphogenesis of Michaelis-Gutmann bodies, *Mod Pathol* **9**, 476 (1996).
145. Sabater, L., Andreu, H., Garcia-Valdecasas, J. C., Moreno, A., Vila, J., Rimola, A., Grande, L., Navasa, M., Visa, J., Rodes, J., *Rhodococcus equi* infection after liver transplantation, *Transplantation* **61**, 980 (1996).
146. Harvey, R. L., Sunstrum, J. C., *Rhodococcus equi* infection in patients with and without human immunodeficiency virus infection, *Rev Infect Dis* **13**, 139 (1991).
147. Vernazza, P. L., Bodmer, T., Galeazzi, R. L., *Rhodococcus erythropolis* infection in HIV-associated immunodeficiency, *Schweiz Med Wochenschr* **121**, 1095 (1991).

148. Takai, S., Fukunaga, N., Ochiai, S., Sakai, T., Sasaki, Y., Tsubaki, S., Isolation of virulent and intermediately virulent *Rhodococcus equi* from soil and sand on parks and yards in Japan, *J Vet Med Sci* **58**, 669 (1996).
149. Warhurst, A. M., Fewson, C. A., Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*, *Crit Rev Biotechnol* **14**, 29 (1994).
150. Yamada, H., Kobayashi, M., Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide, *Biosci Biotechnol Biochem* **60**, 1391 (1996).
151. Kobayashi, M., Shimizu, S., Versatile nitrilases - nitrile-hydrolyzing enzymes, *FEMS Microbiol Lett* **120**, 217 (1994).
152. Steinbuchel, A., Pieper, U., Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon-sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*, *Appl Microbiol Biot* **37**, 1 (1992).
153. Lee, S. Y., Bacterial polyhydroxyalkanoates, *Biotechnol Bioeng* **49**, 1 (1996).
154. Budavari, S., *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals* (Merck, Whitehouse Station, NJ, 1996).
155. Church, J. M., Blumberg, R., Synthesis of tartaric acid - by the hydroxylation of maleic acid, *Ind Eng Chem* **43**, 1780 (1951).
156. Kellersohn, T., Elvers, B., Bailey, J. E., *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry* (Wiley-VCH, Weinheim, 1998).
157. Ventre, J., *Dérivés Tartriques de la Vendange* (Librairie Coulet et fils, Montpellier, 1909).
158. Miall, L. in *Economic microbiology* (ed. Rose, E.), 90 - 93 (Academic Press, London, 1978).
159. Oludipe, J., Koiki, K., Litvintsev, I., Kinetics and mechanism of homogeneous catalytic hydroxylation of maleic acid by hydrogen peroxide. Part I. Formal kinetics, *J Chem Technol Biotechnol* **55**, 151 (1990).
160. Allan, G. G., Neogi, A. N., Macromolecular organometallic catalysis .1. Epoxidation - a comparative kinetic study of tungstate, molybdate, and vanadate ions as catalysts for epoxidation of maleic acid at pH 5, *J Catal* **16**, 197 (1970).
161. Kamatani, Y., Okazaki, H., Imai, K., Fujita, N., Yamazaki, Y., Ogino, K., Verfahren zur Herstellung von Weinsäure, Patent, 2600589, Deutschland (1976).
162. Martindale, W., Reynolds, J. E. F., *The extra pharmacopoeia : the universally acclaimed source of drug information* (Pharmaceutical Press, London, 1993).

163. Pharmaceutical Society of Great Britain (Londres Angleterre), *The pharmaceutical codex : incorporating the British pharmaceutical codex* (Pharmaceutical Press, London, Eng., 1979).
164. Hanahan, D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* **166**, 557 (1983).
165. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J., Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* **33**, 103 (1985).
166. Studier, F. W., Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system, *J Mol Biol* **219**, 37 (1991).
167. Studier, F. W., Moffatt, B. A., Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J Mol Biol* **189**, 113 (1986).
168. *pWEB™ Cosmid Cloning Kit* (Epicentre, Madison, 2002).
169. Bullock, W. O., Fernandez, J. M., Short, J. M., X11-Blue - a high-efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection, *Biotechniques* **5**, 376 (1987).
170. Bonacker, E., *Expression von DNA aus Bodenproben in Streptomyces für den Nachweis neuer Enzymaktivitäten*, Dissertation, (Universität Stuttgart, Stuttgart, 2002)
171. Pridmore, R. D., New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker, *Gene* **56**, 309 (1987).
172. Wahl, G. M., Lewis, K. A., Ruiz, J. C., Rothenberg, B., Zhao, J., Evans, G. A., Cosmid vectors for rapid genomic walking, restriction mapping, and gene transfer, *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2160 (1987).
173. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., *Molecular cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).
174. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A., *Current protocols in molecular biology* (ed. Struhl, K.) (John Wiley and Sons, New York, 1993).
175. Birnboim, H. C., Doly, J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* **7**, 1513 (1979).
176. Sharp, P. A., Sugden, B., Sambrook, J., Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose - ethidium bromide electrophoresis, *Biochemistry* **12**, 3055 (1973).
177. Maxam, A. M., Gilbert, W., Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages, *Methods Enzymol* **65**, 499 (1980).

178. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463 (1977).
179. Maier, E., Lehrach, H., Neue Techniken zur Automatisierung in der DNA-Sequenzierung, *Chemie in unserer Zeit* **2**, 66 (1997).
180. Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., Baumeister, K., A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides, *Science* **238**, 336 (1987).
181. Freeman, M., Baehler, C., Spotts, S., Automated laser-fluorescence sequencing, *Biotechnology (N Y)* **8**, 147 (1990).
182. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 (Pt 1)**, 263 (1986).
183. Chung, C. T., Niemela, S. L., Miller, R. H., One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172 (1989).
184. Ano, T., Shoda, M., Ultra-rapid transformation of *Escherichia coli* by an alkali cation, *Biosci Biotechnol Biochem* **56**, 1505 (1992).
185. Sheng, Y., Mancino, V., Birren, B., Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation, *Nucleic Acids Res* **23**, 1990 (1995).
186. Englard, S., Seifter, S., Precipitation techniques, *Methods Enzymol* **182**, 285 (1990).
187. Janson, J.-C., Ryden, L., *Protein purification, principles, high resolution methods and applications* (Wiley VCH, New York, 1998).
188. Hagel, L., Hartmann, A., Lund, K., Analytical gel filtration of dextran for the study of the glomerular barrier function, *J Chromatogr* **641**, 63 (1993).
189. Choudhary, G., Horvath, C., Ion-exchange chromatography, *Methods Enzymol* **270**, 47 (1996).
190. Rossomando, E. F., Ion-exchange chromatography, *Methods Enzymol* **182**, 309 (1990).
191. Kennedy, R. M., Hydrophobic chromatography, *Methods Enzymol* **182**, 339 (1990).
192. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680 (1970).
193. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem* **150**, 76 (1985).

194. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **72**, 248 (1976).
195. Edmann, P., Method for the determination of the aminoacid sequence in peptides, *Acta Chem Scand* **4**, 289 (1950).
196. Payne, G. B., Williams, P. H., Reactions of hydrogen peroxide .4. Sodium tungstate catalyzed epoxidation of alpha,beta-unsaturated acids, *J Org Chem* **24**, 54 (1959).
197. Butte, W., Rapid method for the determination of fatty-acid profiles from fats and oils using trimethylsulfonium hydroxide for trans-esterification, *J Chromatogr* **261**, 142 (1983).
198. Nauman, R. V., West, P. W., Tron, F., Gaeke, G. C., A spectrophotometric study of the Schiff reaction as applied to the quantitative determination of sulfur dioxide, *Anal Chem* **32**, 1307 (1960).
199. Gubitzi, G., Frei, R. W., Bethke, H., Fluorescence densitometric method for determination of gluconic and lactobionic acids (sugar acids) in pharmaceutical preparations, *J Chromatogr* **117**, 337 (1976).
200. Mateo, C., Archelas, A., Furstoss, R., A spectrophotometric assay for measuring and detecting an epoxide hydrolase activity, *Anal Biochem* **314**, 135 (2003).
201. Becker, H., *Organikum : organisch-chemisches Grundpraktikum* (Dt. Verl. d. Wiss., Berlin, 1976).
202. Papula, L., *Mathematische Formelsammlung für Ingenieure und Naturwissenschaftler* (Vieweg, Braunschweig; Wiesbaden, 2001).
203. Klaus, R., Ripphahn, J., Quantitative thin-layer chromatographic analysis of sugars, sugar acids and poly-alcohols, *J Chromatogr* **244**, 99 (1982).
204. Klaus, R., Fischer, W., Bayer, H., Identification and thin-layer chromatography of phenols for quantitative-analysis, *J Chromatogr* **398**, 300 (1987).
205. Klaus, R., Fischer, W., A means of analyzing glycols, especially ethylene-glycol and diethylene glycol, by a method used for the determination of carbohydrates in alcoholic beverages, *Chromatographia* **23**, 137 (1987).
206. Wickner, W., Driessen, A. J. M., Hartl, F. U., The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma-membrane, *Annu Rev Biochem* **60**, 101 (1991).
207. Rietsch, A., Belin, D., Martin, N., Beckwith, J., An in vivo pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13048 (1996).
208. Raina, S., Missiakas, D., Making and breaking disulfide bonds, *Annu Rev Microbiol* **51**, 179 (1997).

209. Sone, M., Akiyama, Y., Ito, K., Differential in vivo roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds, *J Biol Chem* **272**, 10349 (1997).
210. Macherey-Nagel, persönliche Mitteilung (2002).
211. Schulte, E., Weber, K., Rapid preparation of fatty-acid methyl-esters from fats with trimethylsulfoniumhydroxide or sodium methylate, *Fett Wiss Technol* **91**, 181 (1989).
212. Berete, Y. J., Schaeg, W., Bruckler, J., Blobel, H., Lipase and phospholipase C from *Staphylococcus aureus* of different origin. I. Determination and occurrence (author's transl), *Zentralbl Bakteriol A* **248**, 229 (1980).
213. Ceska, M., A new approach for quantitative and semi-quantitative determinations of enzymatic activities with simple laboratory equipment. Detection of amylase, *Clin Chim Acta* **33**, 135 (1971).
214. Demirjian, D. C., Shah, P. C., Moris-Varas, F., Screening for novel enzymes, *Top Curr Chem* **200**, 1 (1999).
215. Burbaum, J. J., Miniaturization technologies in HTS: how fast, how small, how soon?, *Drug Discov Today* **3**, 313 (1998).
216. Houston, J. G., Banks, M., The chemical-biological interface: Developments in automated and miniaturised screening technology, *Curr Opin Biotech* **8**, 734 (1997).
217. Moris-Varas, F., Shah, A., Aikens, J., Nadkarni, N. P., Rozzell, J. D., Demirjian, D. C., Visualization of enzyme-catalyzed reactions using pH indicators: rapid screening of hydrolase libraries and estimation of the enantioselectivity, *Bioorg Med Chem* **7**, 2183 (1999).
218. Furlan, S. A., CarvalhoJonas, M. F., Merkle, R., Bertoli, G. B., Jonas, R., Application of the microtiter reader system for screening of beta-D-galactosidase producing microorganisms, *Arq Biol Tecnol* **38**, 1261 (1995).
219. Cairns, A. J., Colorimetric microtiter plate assay of glucose and fructose by enzyme-linked formazan production - Applicability to the measurement of fructosyl transferase-activity in higher-plants, *Anal Biochem* **167**, 270 (1987).
220. Hergenrother, P. J., Haas, M. K., Martin, S. F., Chromogenic assay for phospholipase D from *Streptomyces chromofuscus*: Application to the evaluation of substrate analogs, *Lipids* **32**, 783 (1997).
221. Quesada, A. R., Canedo, A., Moreno, M. A., FernandezPuentes, J. L., A microtiter plate-based assay for the screening of beta-lactams, *Lett Appl Microbiol* **22**, 303 (1996).
222. Walker, J. M., Winder, J. S., Kellam, S. J., High-throughput microtiter plate-based chromogenic assays for glycosidase inhibitors, *Appl Biochem Biotech* **38**, 141 (1993).

223. Waslidge, N. B., Hayes, D. J., A colorimetric method for the determination of lipoxxygenase activity suitable for use in a high-throughput assay format, *Anal Biochem* **231**, 354 (1995).
224. Linkolopponen, S., Makinen, M., A microtiter plate assay for N-acetyl-beta-D-glucosaminidase using a fluorogenic substrate, *Anal Biochem* **148**, 50 (1985).
225. Levine, L. M., Michener, M. L., Toth, M. V., Holwerda, B. C., Measurement of specific protease activity utilizing fluorescence polarization, *Anal Biochem* **247**, 83 (1997).
226. Crespi, C. L., Miller, V. P., Penman, B. W., Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450, *Anal Biochem* **248**, 188 (1997).
227. Lubenow, N., Diepenbrock, F., Schickling, H., Bock, D., Heckler, R., Sander, J., Phenylketonuria screening with a fluorometric microplate assay, *Eur J Clin Chem Clin* **32**, 525 (1994).
228. Hill, D. C., Wrigley, S. K., Nisbet, L. J., Novel screen methodologies for identification of new microbial metabolites with pharmacological activity, *Adv Biochem Eng Biotechnol* **59**, 73 (1998).
229. Baker, C. A., Poorman, R. A., Kezdy, F. J., Staples, D. J., Smith, C. W., Elhammer, A. P., A scintillation proximity assay for UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, *Anal Biochem* **239**, 20 (1996).
230. Reetz, M. T., Becker, M. H., Kuhling, K. M., Holzwarth, A., Time-resolved IR-thermographic deflection and screening of enantioselectivity in catalytic reactions, *Angew Chem Int Edit* **37**, 2647 (1998).
231. Auer, M., Moore, K. J., Meyer-Almes, F. J., Guenther, R., Pope, A. J., Stoeckli, K. A., Fluorescence correlation spectroscopy: lead discovery by miniaturized HTS, *Drug Discov Today* **3**, 457 (1998).
232. Kettling, U., Koltermann, A., Schwille, P., Eigen, M., Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1416 (1998).
233. Koltermann, A., Kettling, U., Bieschke, J., Winkler, T., Eigen, M., Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: High throughput screening for enzyme activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1421 (1998).
234. Brandt, D. W., Core system model: understanding the impact of reliability on high-throughput screening systems, *Drug Discov Today* **3**, 61 (1998).
235. Zoicher, F., *Erstellung einer Enzybibliothek über gerichtete Evolution, Entwicklung von Assaysystemen zur Durchmusterung von Enzybibliotheken auf Epoxidhydrolaseaktivität, Aufreinigung einer Epoxidhydrolase aus Streptomyces antibiotikus*, Dissertation, (Universität Stuttgart, Stuttgart, 1999)

236. Li, Y. F., Hata, Y., Fujii, T., Hisano, T., Nishihara, M., Kurihara, T., Esaki, N., Crystal structures of reaction intermediates of L-2-haloacid dehalogenase and implications for the reaction mechanism, *J Biol Chem* **273**, 15035 (1998).
237. Strohl, W. R., Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters, *Nucleic Acids Res* **20**, 961 (1992).
238. Gourse, R. L., Ross, W., Gaal, T., UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition, *Mol Microbiol* **37**, 687 (2000).
239. Mikova, H., Rosenberg, M., Kristofikova, L., Liptaj, T., Influence of molybdate and tungstate ions on activity of cis-epoxysuccinate hydrolase in *Nocardia tartaricans*, *Biotechnol Lett* **20**, 833 (1998).
240. Ottosson, J., Rotticci-Mulder, J. C., Rotticci, D., Hult, K., Rational design of enantioselective enzymes requires considerations of entropy, *Protein Sci* **10**, 1769 (2001).
241. Ottosson, J., Fransson, L., Hult, K., Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: an experimental and molecular modeling study of a lipase, *Protein Sci* **11**, 1462 (2002).
242. Phillips, R. S., Temperature effects on stereochemistry of enzymatic-reactions, *Enzyme Microb Tech* **14**, 417 (1992).
243. Schewe, H., *cis-2,3-Oxirandicarbonsäure Hydrolase aus R. ruber DSM44319*, Diplomarbeit, (Universität Stuttgart, Stuttgart, 2003)
244. Cohen, N., Revised group additivity values for enthalpies of formation (at 298 K) of carbon-hydrogen and carbon-hydrogen-oxygen compounds, *J Phys Chem Ref Data* **25**, 1411 (1996).

G Anhang

1 Messwerte des PSS-Assays

1.1 Messungen in Glas-MTP

Alle Messwerte sind auf 2 Nachkommastellen gerundet. Zur Entwicklung der Färbung wurden alle Mikrotiterplatten 16 h bei 70°C inkubiert.

Tab. G.1: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung mit Styroloxid und Phenyl-1,2-ethandiol in Glas-MTP.

Phenyl-1,2-ethandiol [mM]	0	5	10	15	20	25
Styroloxid [mM]	25	20	15	10	5	0
ø (16 Einzelwerte)	0,05	0,50	0,78	1,44	2,32	3,69
Standardabweichung	0,01	0,07	0,16	0,22	0,32	0,14
3 x Standardabweichung	0,04	0,20	0,48	0,67	0,97	0,43
ø - 3 x Standardabweichung	>0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	0,01	0,02	0,06	0,08	0,11	0,05
Standardfehler [%]	10	5	7	6	5	1

Tab. G.2: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung mit 1,2-Epoxybutan und 1,2-Butandiol in Glas-MTP.

1,2-Butandiol [mM]	0	5	10	15	20	25
1,2-Epoxybutan [mM]	25	20	15	10	5	0
ø (16 Einzelwerte)	-0,02	0,15	0,40	0,73	0,92	1,01
Standardabweichung	0,01	0,01	0,03	0,02	0,04	0,07
3 x Standardabweichung	0,03	0,04	0,09	0,06	0,11	0,20
ø - 3 x Standardabweichung	<0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
Standardfehler [%]	24	3	3	1	1	2

Tab. G.3: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung mit Epoxycyclohexan und 1,2-Cyclohexandiol in Glas-MTP.

Cyclohexandiol [mM]	0	5	10	15	20	25
Epoxycyclohexan [mM]	25	20	15	10	5	0
ø (16 Einzelwerte)	0,05	1,24	1,59	1,98	2,25	2,93
Standardabweichung	0,03	0,09	0,08	0,12	0,23	0,42
3 x Standardabweichung	0,08	0,28	0,24	0,35	0,68	1,25
ø - 3 x Standardabweichung	<0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	0,01	0,03	0,03	0,04	0,08	0,15
Standardfehler [%]	20	3	2	2	4	5

Tab. G.4: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung mit Epichlorhydrin und 3-Chlor-1,2-propandiol in Glas-MTP.

3-Chlor-1,2-propandiol [mM]	0	5	10	15	20	25
Epichlorhydrin [mM]	25	20	15	10	5	0
ø (16 Einzelwerte)	0,01	0,07	0,24	0,38	0,78	1,00
Standardabweichung	0,01	0,01	0,01	0,04	0,07	0,13
3 x Standardabweichung	0,02	0,03	0,04	0,12	0,21	0,40
ø - 3 x Standardabweichung	<0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	0,00	0,00	0,01	0,02	0,03	0,05
Standardfehler [%]	24	7	2	4	4	6

1.2 Messungen in PP-MTP

Tab. G.5: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung mit Styroloxid und Phenyl-1,2-ethandiol in PP-MTP.

Phenyl-1,2-ethandiol [mM]	0	5	10	15	20	25
Styroloxid [mM]	25	20	15	10	5	0
ø (16 Einzelwerte)	0,24	0,51	0,66	1,00	1,76	2,49
Standardabweichung	0,05	0,13	0,14	0,22	0,06	0,26
3 x Standardabweichung	0,14	0,40	0,43	0,66	0,19	0,77
ø - 3 x Standardabweichung	>0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	0,02	0,05	0,05	0,08	0,02	0,09
Standardfehler [%]	7	9	8	8	1	4

Tab. G.6: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung mit 1,2-Epoxybutan und 1,2-Butandiol in PP-MTP.

1,2-Butandiol [mM]	0	5	10	15	20	25
1,2-Epoxybutan [mM]	25	20	15	10	5	0
ø (16 Einzelwerte)	-0,08	0,51	1,27	2,40	3,05	3,48
Standardabweichung	0,02	0,04	0,08	0,11	0,20	0,20
3 x Standardabweichung	0,05	0,12	0,23	0,33	0,61	0,59
ø – 3 x Standardabweichung	<0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	0,01	0,01	0,03	0,04	0,07	0,07
Standardfehler [%]	7	3	2	2	2	2

Tab. G.7: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung mit Epoxycyclohexan und 1,2-Cyclohexandiol in PP-MTP.

Cyclohexandiol [mM]	0	5	10	15	20	25
Epoxycyclohexan [mM]	25	20	15	10	5	0
ø (16 Einzelwerte)	0,05	0,31	0,47	0,81	1,26	1,84
Standardabweichung	0,03	0,03	0,09	0,10	0,22	0,10
3 x Standardabweichung	0,09	0,09	0,26	0,30	0,65	0,30
ø – 3 x Standardabweichung	<0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	0,01	0,01	0,03	0,04	0,08	0,04
Standardfehler [%]	24	3	7	4	6	2

Tab. G.8: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung mit Epichlorhydrin und 3-Chlor-1,2-propandiol in PP-MTP.

3-Chlor-1,2-propandiol [mM]	0	5	10	15	20	25
Epichlorhydrin [mM]	25	20	15	10	5	0
ø (16 Einzelwerte)	0,02	0,25	0,34	0,58	1,10	1,70
Standardabweichung	0,02	0,11	0,07	0,22	0,44	0,40
3 x Standardabweichung	0,07	0,34	0,21	0,65	1,33	1,20
ø – 3 x Standardabweichung	<0	<0	>0	<0	<0	>0
Standardfehler	0,01	0,04	0,03	0,08	0,16	0,14
Standardfehler [%]	41	16	7	13	14	8

2 Messwerte des PSC-Assays

Alle Messwerte sind auf die erste Stelle gerundet. Zur Entwicklung der Färbung wurden alle Mikrotiterplatten 1 h bei 70°C inkubiert.

Tab. G.9: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung des Fluoreszenztests mit 1,2-Epoxybutan und 1,2-Butandiol.

1,2-Butandiol [mM]	0	10	20	30	40	50
1,2-Epoxybutan [mM]	50	40	30	20	10	0
ø (16 Einzelwerte) [FE]	7649	9371	11061	12732	14253	14485
Standardabweichung	1093	854	840	752	895	1203
3 x Standardabweichung	3279	2562	2520	2255	2685	3609
ø - 3 x Standardabweichung	>0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	273	214	210	188	224	301
Standardfehler [%]	3,6	2,3	1,9	1,5	1,6	2,1

Tab. G.10: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung des Fluoreszenztests mit 1,2-Epoxyhexan und 1,2-Hexandiol.

1,2-Hexandiol [mM]	0	10	20	30	40	50
1,2-Epoxyhexan [mM]	50	40	30	20	10	0
ø (16 Einzelwerte) [FE]	8082	9376	10782	12166	13444	14624
Standardabweichung	884	1115	986	977	1117	1319
3 x Standardabweichung	2653	3345	2957	2932	3352	3957
ø - 3 x Standardabweichung	>0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	221	279	246	244	279	330
Standardfehler [%]	2,7	3,0	2,3	2,0	2,1	2,3

Tab. G.11: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung des Fluoreszenztests mit Epichlorhydrin und 3-Chlor-1,2-propandiol.

3-Chlor-1,2-propandiol [mM]	0	10	20	30	40	50
Epichlorhydrin [mM]	50	40	30	20	10	0
ø (16 Einzelwerte) [FE]	8240	11417	14021	17006	17668	17484
Standardabweichung	1565	1123	850	822	1040	1236
3 x Standardabweichung	4694	3368	2549	2465	3119	3709
ø - 3 x Standardabweichung	>0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	391	281	212	205	260	309
Standardfehler [%]	4,7	2,5	1,5	1,2	1,5	1,8

Tab. G.12: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung des Fluoreszenztests mit Epoxycyclohexan und 1,2-Cyclohexandiol.

Cyclohexandiol [mM]	0	10	20	30	40	50
Epoxycyclohexan [mM]	50	40	30	20	10	0
\bar{x} (16 Einzelwerte) [FE]	8820	11097	13359	15044	16657	18886
Standardabweichung	354	791	477	314	344	996
3 x Standardabweichung	1062	2372	1432	941	1033	2988
\bar{x} - 3 x Standardabweichung	>0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	89	198	119	78	86	249
Standardfehler [%]	1,0	1,8	0,9	0,5	0,5	1,3

Tab. G.13: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung des Fluoreszenztests mit 2,3-Epoxybutan und 2,3-Butandiol.

2,3-Butandiol [mM]	0	10	20	30	40	50
2,3-Epoxybutan [mM]	50	40	30	20	10	0
\bar{x} (16 Einzelwerte) [FE]	8587	11554	14435	16918	18647	19920
Standardabweichung	1427	676	375	258	303	425
3 x Standardabweichung	4281	2027	1124	774	908	1274
\bar{x} - 3 x Standardabweichung	>0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	357	169	94	64	76	106
Standardfehler [%]	4,2	1,5	0,6	0,4	0,4	0,5

Tab. G.14: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung des Fluoreszenztests mit 1,2-Epoxybutan und 1,2-Butandiol.

1,2-Butandiol [mM]	0	1	2	3	4	5
1,2-Epoxybutan [mM]	5	4	3	2	1	0
\bar{x} (16 Einzelwerte) [FE]	12097	14935	18134	19650	20548	20975
Standardabweichung	817	831	515	926	941	540
3 x Standardabweichung	2452	2493	1544	2779	2823	1621
\bar{x} - 3 x Standardabweichung	>0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	204	208	129	232	235	135
Standardfehler [%]	1,7	1,4	0,7	1,2	1,1	0,6

Tab. G.15: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung des Fluoreszenztests mit *trans*-Stilbenoxid und Hydrobenzoin.

Hydrobenzoin [mM]	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
<i>trans</i> -Stilbenoxid [mM]	2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	0,0
ø (16 Einzelwerte) [FE]	15490	15985	16685	17005	17640	18080
Standardabweichung	500	365	35	165	30	60
3 x Standardabweichung	1500	1095	105	495	90	180
ø - 3 x Standardabweichung	>0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	289	211	20	95	17	35
Standardfehler [%]	1,9	1,3	0,1	0,6	0,1	0,2

3 Messwerte des Weinsäure Assays

Alle Messwerte sind auf die erste Stelle gerundet. Die Messung erfolgte direkt nach der Zugabe der Schwefelsäure bei Raumtemperatur.

Tab. G.16: Messwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Evaluierung des Weinsäureschnelltest mit *cis*-2,3-Oxirandicarbonsäure und Weinsäure in Mikrotiterplatten.

Weinsäure [mM]	0	10	20	30	40	50
<i>cis</i> -2,3-Oxirandicarbonsäure [mM]	50	40	30	20	10	0
ø (16 Einzelwerte)	0,16	0,67	1,25	1,81	2,33	2,55
Standardabweichung	0,02	0,13	0,08	0,09	0,07	0,08
3 x Standardabweichung	0,05	0,38	0,24	0,26	0,21	0,25
ø - 3 x Standardabweichung	>0	>0	>0	>0	>0	>0
Standardfehler	0,00	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02
Standardfehler [%]	2,50	4,60	1,60	1,20	0,80	0,80

4 Aminosäuresequenzen

4.1 Epoxidhydrolase aus *Bacillus subtilis* 168 (DSM 402)

```
MDGVKQCQFVNTNGITLHVAAAGREDGPLIVLLHGFPEFWYGWKNQIKPLVDAGYRVIAPDQRGYNLSDKPEGIDSYRI
DTLRDDIIGLITQFTDEKAIVIGHDWGGAVAWHLASTRPEYLEKLIAINIPHPHVMKTVTPLYPPQWLKSSYIAYFQL
PDIPEASLRENDYDTLDKAIGLSDRPALFTSEDVSRYSKEAWKQPGALTAMLNWYRALRKGSLAEKPSYETVPIRMIWG
MEDRFLSRKLAKETERHCPNGHLIFVDEASHWINHEKPAIVNQLILEYLKNQ
```

4.2 Epoxidhydrolase aus *Corynebacterium glutamicum*

MAFFSFSTSPPLRLIPGSRSKATGAKRRLSSTIASIERSPGIIALDGPFFTHDHVSVRGIRLHLAEAGSPTKPLVLLIH
GAFGGWYDYREVIGPLADAGFHVAIIDLRGYGMSDKPPTGYDLRHAAGELSSVIAALGHDDALLVGSDTGASIAWAIA
SMYPERVRGLISLGAIHPLDMRRAIRRKPHLHVSDLSRLAPFRLPSFLHNLHFHFGITSEARREIVNNTSSSYQRSNAF
TETVLLRKKALSIDHTITPIIRTNRYLVGSI PSKTVSAPVWLLRNTNRRWEHLANTARTRTTGPFTTIAIPGGYELPY
LENPSEFAATIAEFARTTF

4.3 Epoxidhydrolase aus *Momordica charantia*

MDAIEHTTVNTNGIKMHIASIGTGPPVLLLHGFPELWYSWRHQLLYLSVGYRAIAPDLRGYGDTSPESTSYALH
IVGDLVGALDGLGIDKVFVGHWDGAI IAWYFCLFRPDRIKALVNLVHFLPRNPAISFVEGFRAAYGDDFYICRFQA
PGEAEQHFTSVDTALVLKALLSNRSTDPKLPKEVGFGRGRPPENLPSWLTEEDINYFAAKFKHTGFTGGLNYRAFD
LTWELTAPWTGAQIQVPVKFVVGDLDMTYHFAGAKEYIHNGGFKKDVPFLEEYVVMKDTAHFINQERPQEISTHIDF
IKKF

4.4 Epoxidhydrolase aus *R. ruber* DSM44319 und *R. rhodochrous* LMPG-18079

MQLNNANDNTQFRALLFDVQGTLTDFRSTLIEHGLSILGDRVDRELWHEELVDQWRGCRYDELDSLKQEKWRSVRVYRD
SLINLLAKFSDSFCATSAEVELLTDGWERLRSWPDVPSGLEQLRSKYLVAALTNADFSIAIVNVGRSAKLQWDAVLSAQLF
GAYKPHRSTYEGAATLLGIAPSEILMVASHAYDLEAAREVGAGTAYVRRPLEYGPTRTEDVDPGRFDFLVDSISELADQ
LGCPRGGTAGID

5 DNA-Sequenzen

5.1 Epoxidhydrolase aus *Bacillus subtilis* 168 (DSM 402)

ATGGACGGAGTTAAATGCCAGTTTGTCAATACGAACGGAATCACGCTTCACGTTGCAGCCGCAGGACGGGAAGATGGC
CCGTTAATTGTCTGCTCCATGGATTTCCCTGAGTTTTGGTACGGCTGGAAAAATCAAATCAAACCGCTTGTGATGCG
GGTTACCGGGTCATTGCTCCTGATCAGCGGGGCTACAATCTCAGTGACAAACCGGAAGGAATTGATTCGTATCGGATT
GATACATTAAGAGATGATATCATCGGGCTTATTACGCAATTCAGTATGAAAAAGCAATTGTCATCGGTTCATGACTGG
GGAGGAGCTGTGCGATGGCATTGGCTTCCACACGCCCGGAATATCTTGAAAAACTGATCGCGATCAATATCCCGCAC
CCGCACGTGATAAAACCGTAACGCCGCTTTATCCGCCGCAATGGCTGAAAAGCTCGTATATCGCATACTCCAGCTG
CCCGATATACCGGAGGCATCACTAAGGGAAAATGATTATGATACATTAGACAAAGCGATTGGATTATCCGACCGTCCC
GCGCTTTTTTACATCCGAGGATGTCAGCAGGTACAAAGAAGCGTGGAAGCAGCCGGGCGCGCTGACAGCTATGCTGAAC
TGGTACAGAGCCCTCAGAAAAGGAAGCTTGGCAGAGAAACCCTCTTACGAAACAGTACCTTACCGAATGATCTGGGGA
ATGGAAGACCGCTTTTTGAGCAGAAAGCTTGCGAAAGAGACGGAAAGGCATTGCCCGAATGGACATCTCATCTTTGTT
GATGAAGCTTCCCATTTGGATTAACCACGAAAAGCCAGCCATCGTCAATCAGCTGATTTTTGGAATATCTTAAGAACCAA
TAA

5.1.1 pBS3000 Konstrukt

CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAA
TTTACACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAAATTAATCTATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCATGGAC
GGAGTTAAATGCCAGTTTGTCAATACGAACGGAATCACGCTTCACGTTGCAGCCGCAGGACGGGAAGATGGCCCGTTA
ATTGTCTGCTCCATGGATTTCCCTGAGTTTTGGTACGGCTGGAAAAATCAAATCAAACCGCTTGTGATGCGGGTTAC
CGGGTCATTGCTCCTGATCAGCGGGGCTACAATCTCAGTGACAAACCGGAAGGAATTGATTCGTATCGGATTGATACA
TTAAGAGATGATATCATCGGGCTTATTACGCAATTCAGTATGAAAAAGCAATTGTCATCGGTTCATGACTGGGGAGGA
GCTGTGCGATGGCATTGGCTTCCACACGCCCGGAATATCTTGAAAAACTGATCGCGATCAATATCCCGCACCCCGCAC
GTCATGAAAACCGTAACGCCGCTTTATCCGCCGCAATGGCTGAAAAGCTCGTATATCGCATACTTCCAGCTGCCCGAT

ATACCGGAGGCATCACTAAGGGAAAATGATTATGATACATTAGACAAAGCGATTGGATTATCCGACCGTCCC GCGCTT
TTTACATCCGAGGATGTCAGCAGGTACAAAGAAGCGTGGAAAGCAGCCGGGCGCGCTGACAGCTATGCTGAAC TGGTAC
AGAGCCCTCAGAAAAGGAAGCTTGGCAGAGAAAACCTCTTACGAAACAGTACCTTACCGAATGATCTGGGGAATGGAA
GACCGCTTTTTGAGCAGAAAGCTTGCAGAAAGAGACGGAAAGGCATTGCCCGAATGGACATCTCATCTTTGTTGATGAA
GCTTCCCATTTGGATTAACCACGAAAAGCCAGCCATCGTCAATCAGCTGATTTTGGAAATATCTTAAGAACCAATAAGCG
GTACCCCGGGTTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGA
ACTCCATCTGGATTTGTTT CAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGCTTGGCGA
GATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATAACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATC
GTAAAGAACATTTTGAGGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTCAGCTGGATATTAAGCCCT
TTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTTATCCGGCCTTTATTACATCTTGGCCCGCTGATGAAAGCTC
ATCCGGAATTTTCGTATGGCAATGAAAGACGGT GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCCTGTTACACCGTTTTCC
ATGAGCAAAC TGAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTTCTACACATATATTTCG
AAGATGTGGCGTGTTCAGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTTATTGAGAATATGTTTTTTCGTCTCAGCCA
ATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAAC TTTCTCGCCCCCGTTTTTACCATGG
GCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATT CAGGTTTCATCATGCCGCTGTGTGATGGCTTCC
ATGTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTT
ATTTGGTGCCCTTAAACGCC TGGGGTAATGACTCTCTAGCTT GAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGAC
TGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCTCTAGAGCTGCCTC
GCGCGTTTTCGGTGATGACGGT GAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGT CACAGCTTGTCTGTAAGCGGAT
GCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGT CAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGT
AGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTG
AAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCT
CGGCTGTGTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACG
CAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATA
GGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGAT
ACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCGGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCT
TTCTCCCTTCGGGAAGCTGGCGCTTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGTCTGCTCCGCTCA
AGCTGGGCTGTGTGACGCAAGCCCGCTT CAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAC TATCGTCTTGTAGTCCAAC
CGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTA
CAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC TACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAG
TTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCA
AGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGA
ACGAAAAC TACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTTAGATCCTTTTAAATTA AAAAT
GAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTA
TCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGCTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCT
TACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGC
CAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAG
CTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGT CACGCTCGT
CGTTTTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAG
CGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGT CAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCAC
TGCATAATTCTCTTACTGT CATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTTCTGAG
AATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT GCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAA
AAGTGTCTATCATTTGAAAACGTTCTTCCGGGCGAAAAC TCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCCGATGT
AACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTT CAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGC
AAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATTTATTGAA
GCATTTATCAGGGTTATTGCTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAAATAGGGGTTCCGC
GCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTTAAGAAAACCATTATTTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTA
TCACGAGGCCCTTTTCGTCTTAC

5.1.2 pETBS Konstrukt

ATCCGGATATAGTTCCCTCTTT CAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATT
GCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAAC T CAGCTTCTTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGT
GCTCGAGTTGGTTCTTAAGATATTTCCAAAATCAGCTGATTGACGATGGCTGGCTTTTTCTGGTTAATCCAATGGGAAG
CTTCATCAACAAAGATGAGATGTCCATTCGGGCAATGCCTTTCCGCTCTTTTCGCAAGCTTTCTGCTCAAAAAGCGGT
CTTCCATTTCCCAGATCATTCGGTAAGGTACTGTTTCGTAAGAGGGTTTTCTCTGCCAAGCTTCTTTTCTGAGGGCTC
TGTACCAGTTCAGCATAGCTGT CAGCGCGCCCGGCTGCTTCCACGCTTCTTTGTACCTGCTGACATCCTCGGATGTAA

AAAGCGGGGACGGTCCGATAATCCAATCGCTTTGTCTAATGTATCATAATCATTTTTCCCTTAGTGATGCCCTCCGGTA
TATCGGGCAGCTGGAAGTATGCGATATACGAGCTTTTCAGCCATTGCGGGCGATAAAGCGGGCTTACGGTTTTTCATGA
CGTGCGGGTGC GG GATATTGATCGCGATCAGTTTTTCAAGATATTCCGGGCGTGTGGAAGCCAAATGCCATGCGACAG
CTCCTCCCCAGTCATGACCGATGACAATTGCTTTTTTCATCAGTGAATTGCGTAATAAGCCCGATGATATCATCTCTTA
ATGTATCAATCCGATACGAATCAATTCCTTCCGGTTTTGTCACTGAGATTGTAGCCCCGCTGATCAGGAGCAATGACCC
GGTAACCCGCATCAACAAGCGGTTTTGATTTGATTTTTCCAGCCGTACCAAAACTCAGGAAATCCATGGAGCAGGACAA
TTAACGGGCCATCTTCCCGTCTGCGGCTGCAACGTGAAGCGTGATTCGGTTCGTATTGACAAACTGGCATTTAACTC
CGTCTGAATTCGGATCCGAATTAATTCGGATATCCATGGCCATCGCCGGCTGGGCAGCGAGGAGCAGCAGACCAGCAG
CAGCGGTGCGCAGCAGGTATTTTCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTAATTTCTAGAGGGAAACCGTT
GTGGTCTCCCTATAGTGAGTGTATTAATTTCCGCGGATCGAGATCTCGGGCAGCGTTGGGTCTGGCCACGGGTGCG
CATGATCGTGCTCCTGTCTGTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGAT
ACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGTCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTTCCG
TGTTTTCGTAAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTG
GCTACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCCG
CATCCATACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAG
CATCCTCTCTCGTTTTCATCGGTATCATTACCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAACA
GGAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAACTCAACGAGCTGGA
CGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTT
CGGTGATGACGGTGA AAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAG
CAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAG
CGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATATGCGGTGTGAAATAC
CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTG
TTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA
AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCC
GCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGG
CGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCGGACCCGTCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCC
CTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGTCTCGTCCAAGCTGG
GCTGTGTCAGCAAGAACCCCTTCCAGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGTAGTCCAACCCGGTAA
GACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGT
TCTTGAAGTGGTGGCTAACCTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCT
TCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGC
AGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAA
ACTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTT
TTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAG
CGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCATAGTTGCCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCAT
CTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCG
GAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGAG
TAAGTAGTTCCGCAGTTAATAGTTTGC GCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTG
GTATGGCTTCAATCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTA
GCTCCTTCCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATA
ATTTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTTCTGAGAATAGT
GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGC
TCATCATTTGAAAACGTTCTTCCGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCA
CTCGTGACCCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATG
CCGAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTTTCAATATTTTGAAGCATTT
ATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAAGGGTTCCGCGCACAT
TTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAAATTTGTAACGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCT
CATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTG
TTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCG
ATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCTA
AAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAG
CGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTAC
AGGGCGCGTCCCATTCCGCA

5.2 Epoxidhydrolase aus *Corynebacterium glutamicum*

ATGGCCTTTTTTAGCTTTTCGACGTCTCCCCCTCACCCGCTCATCCCCGGCAGCCGCTCCAAAGCCACAGGCGCCAAA
 CGGCGCCTGAGCAGCACAATCGCGTCGATTGAACGCTCCCCCGGCATCATTTGCCCTAGACGGACCGTTCCCCACGAT
 CACGTCTCCGTACGTGGCATTTCGCTCCATTTAGCAGAGGCAGGCTCCCCACCAAACCCCTGGTTCTTCTGATCCAC
 GGGGCTTTTCGGCGGTGGTACGACTACCGCGAAGTCATCGGCCACTCGCAGATGCCGGCTTCCACGTGCGCGCCATC
 GATCTACGCGGCTACGGCATGTCCGACAAACCCCCAACAGGCTACGACCTCCGCCACGCAGCCGGAGAACTCAGCAGC
 GTTATCGCAGCTCTCGGCCACGATGACGCACCTTCTTGTTCGGCTCCGACACCGGCGCCAGCATCGCCTGGGCTATCGCT
 TCCATGTACCCCGAACGGGTCCGCGGCCATAATTTCCCTCGGCGCGATCCACCCCTTGACATGCGACGCGCCATCCGA
 CGAAAACCCACCTACACGTCTCTGACCTCAGCCGACTTGCTCCTTTTCGGTTGCCCTCATTCCTGCATAACCTCTTC
 CACTTCGGAATCACCAGCGAAGCTCGACGTGAGATCGTCAACAACACGTCCTCGTCTACCAGCGCAGCAACGCATTC
 ACAGAGACAGTGCTCCTCCGCAAAAAGCACTATCGATCGACCACACCATCACCCCGATCATCCGCACCAACCGCTAC
 CTCGTTGGGTTCGATCCCCAGCAAAACAGTCTCCGCACCGGTGTGGCTGCTCAGAACCAACTCGACGCTGGGAACAT
 CTAGCCAATACTGCGCGCACTCGAACGACAGGGCCATTACCACCATCGCGATCCCCGGCGGCTACGAACCTCCCCTAC
 CTCGAGAACCCTTCCGAATTTGCAGCAACCATCGCAGAGTTTCGCGCGCACCACGTTTTTAA

5.2.1 pCG3000 Konstrukt

CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGATAACAA
 TTTTACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACATATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCATGGCC
 TTTTTTAGCTTTTCGACGTCTCCCCCTCACCCGCTCATCCCCGGCAGCCGCTCCAAAGCCACAGGCGCCAAAACGGCGC
 CTGAGCAGCACAATCGCGTCGATTGAACGCTCCCCCGGCATCATTTGCCCTAGACGGACCGTTCCCCACGATCACGTCT
 TCCGTACGTGGCATTTCGCTCCATTTAGCAGAGGCAGGCTCCCCACCAAACCCCTGGTTCTTCTGATCCACGGGGCT
 TTCGGCGGTGGTACGACTACCGCGAAGTCATCGGCCACTCGCAGATGCCGGCTTCCACGTGCGCGCCATCGATCTA
 CGCGGCTACGGCATGTCCGACAAACCCCCAACAGGCTACGACCTCCGCCACGCAGCCGGAGAACTCAGCAGCGTTATC
 GCAGCTCTCGGCCACGATGACGCACCTTCTTGTTCGGCTCCGACACCGGCGCCAGCATCGCCTGGGCTATCGCTTCCATG
 TACCCCGAACGGGTCCGCGGCCATAATTTCCCTCGGCGCGATCCACCCCTTGACATGCGACGCGCCATCCGACGAAAA
 CCCACCTACACGTCTCTGACCTCAGCCGACTTGCTCCTTTTCGGTTGCCCTCATTCCTGCATAACCTCTTCCACTTC
 GGAATCACCAGCGAAGCTCGACGTGAGATCGTCAACAACACGTCCTCGTCTACCAGCGCAGCAACGCATTCACAGAG
 ACAGTGCTCCTCCGCAAAAAGCACTATCGATCGACCACACCATCACCCCGATCATCCGCACCAACCGCTACCTCGTT
 GGGTCGATCCCCAGCAAAACAGTCTCCGCACCGGTGTGGCTGCTCAGAACCAACTCGACGCTGGGAACATCTAGCC
 AATACTGCGCGCACTCGAACGACAGGGCCATTACCACCATCGCGATCCCCGGCGGCTACGAACCTCCCCTACCTCGAG
 AACCTTCCGAATTTGCAGCAACCATCGCAGAGTTTCGCGCGCACCACGTTTTAAGGTACCCCGGGTCGACCTGCAGCC
 AAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAA
 CGCTCGGTTGCCGCGGGCGTTTTTTATTTGGTGAAGATCCAAGCTAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCT
 AAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATAACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTT
 CAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTACGCTGGATATTACGGCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAAT
 AAGCACAAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTTTCGCCCGCTGATGAATGCTCATCCGGAATTTTCGTATGGCAATG
 AAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTACCCCTTGTACACCGTTTTTCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTCA
 TCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAA
 AACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGT
 TTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTTCTTCGCCCCCGTTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGAC
 AAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAGGTTTCATCATGCCGCTGTGATGGCTTCCATGTCCGGCAGAATGCTTAATGAA
 TTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGGCCTTAAACGCCTGGG
 GTAATGACTCTCTAGCTTGAAGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTTCGTTTTATCTGTTG
 TTTGTTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCTTAGAGCTGCCGCGCTTCCGGTATGACGGTGA
 AAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAAGCCGTCAG
 GAGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGAGTGTATACCTGG
 CTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGG
 AGAAAAACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTCGGCTGCGGCGAGCG
 GTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA
 GGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT
 CACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGC
 TCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCG
 CTTTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCC
 CCCGTTACGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCA

CTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCT
AACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGT
AGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA
AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATT
TTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGT
ATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGT
TCATCCATAGCTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCA
ATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCCGAGA
AATGGTCTTGCACACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTT
AATAGTTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACG
TCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCG
ATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTTACTGTCTATG
CCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGT
TGCTCTTGCCCGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATCATTTGGAAAACGT
TCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGA
TCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATA
AGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTTATGAAGCATTTATCAGGGTTATTTGTCTC
ATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCA
CCTGACGTCTAAGAAACCATTATTTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTTAC

5.2.2 pETCG Konstrukt

ATCCGGATATAGTTCCTCCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATT
GCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACCTCAGCTTCCTTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT
GCTCGAGTGGCGCCGCAAGCTTGTGACGGAGCTCGAATTCAGAAACGTGGTGGCGCGCAACTCTGCGATGGTTGCTG
CAAATTCGGAAGGGTTCTCGAGGTAGGGGAGTTTCGTAGCCGCCGGGGATCGCGATGGTGGTGAATGGCCCTGTCTTC
GAGTGGCGCAGTATTGGCTAGATGTTCCAGCGTTCGAGTGTGGTTCTGAGCAGCCACACCGGTGCGGAGACTGTTT
TGCTGGGGATCGACCAACGAGGTAGCGGTTGGTGGCGATGATCGGGGTGATGGTGTGGTTCGATCGATAGTGTCTTTT
TGCGGAGGAGCACTGTCTCTGTGAATGCGTTGCTGCGCTGGTAGGACGAGGACGTGTTGTTGACGATCTCACGTCGAG
CTTCGCTGGTGTATCCGAAGTGAAGAGGTTATGCAGGAATGAGGGCAACCAGAAAGGAGCAAGTCGGCTGAGGTGAG
AGACGTGTAGGTGGGGTTTTTCGTGGATGGCGCGTTCGATGTCAAGGGGTGGATCGCGCCGAGGGAATTAGGCCGC
GGACCCGTTCCGGGTACATGGAAGCGATAGCCAGGCGATGCTGGCGCCGGTGTGCGAGCCGACAAGAAGTGCCTCAT
CGTGGCCGAGAGCTGCGATAACGCTGCTGAGTTCTCCGGCTGCGTGGCGGAGGTGCTAGCCGTTTGGGGTTTTGTCGG
ACATGCCGTAGCCGCTAGATCGATGGCGGCGACGTGGAAGCCGGCATCTGCGAGTGGGCCGATGACTTCGCGTAGT
CGTACCAACCGCCGAAAGCCCGTGGATCAGAAGAACCAGGGGTTTTGGTGGGGGAGCCTGCCCTCTGCTAAATGGAGGC
GAATGCCACGTACGGAGACGTGATCGTGGGTGAACGGTCCGCTTAGGGCAATGATGCCGGGGGAGCGTTCAATCGACG
CGATTGTGCTGCTCAGGCGCCGTTTTGGCGCCTGTGGCTTTGGAGCGGCTGCCGGGGATGAGGCGGGTGGGGGAGACG
TCGAAAAGCTAAAAAGGCCATGGCCATCGCCGGCTGGGCAGCGAGGAGCAGCAGACCAGCAGCAGCGGTGCGCAGCA
GGTATTTTCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTTATTTCTAGAGGGAAACCCTTGTGGTCTCCCTATAG
TGAGTCGTATTAATTTTCGCGGGATCGAGATCTCGGGCAGCGTTGGGTCTGGCCACGGGTGCGCATGATCGTGTCTCT
GTCGTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGAATCACCGATACGCGAGCGAACGTG
AAGCGACTGCTGCTGCAAAACGCTTGCAGCTGAGCAACAACATGAATGGTCTTCGGTTTTCCGTGTTTTCGTAAAGTCT
GGAAACGCGGAAGTCAGCGCCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAAC
ACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCCTGAGTGATTTTTCTCTGGTCCCGCCGATCCATACCGCCAG
TTGTTTTACCCTCACACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTT
CATCGGTATCATTTACCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGTGACCAAACAGGAAAAAACCGCCCT
TAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAACTCAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGC
AGACATCTGTGAATCGCTTACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTTCCGTGATGACGGTGA
AAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCA
GGGCGGTGAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGAGCCATGACCCAGTACGATAGCAGTAGCGGAGTGTATACTGG
CTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATATGCGGTGTGAAATACCGCAGATGCGGTAA
GGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTTTCGCTTCTCCGCTCAGTACTGCGTTCGCTCGCTCGGTCGTTCCGGTGCGGCAG
CGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAA
AAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGC
ATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAA
GCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGG
CGTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC

CCCCCGTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGC
 CACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGC
 CTAACCTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTG
 GTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA
 AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGA
 TTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAA
 GTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTT
 GTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTG
 CAATGATACCAGCAGACCCACGCTCACCAGCTCCAGATTATCAGCAATAAACACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCA
 GAAGTGGTCCGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAG
 TTAATAGTTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCA
 GCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTC
 CGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTCA
 TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGA
 GTTGCTCTTGCCCGGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTGGAAAAC
 GTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACT
 GATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAA
 TAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTTATGAAGCATTTATCAGGGTTATTTGTC
 TCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGC
 CACCTGAAATTTGTAACGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTTAACCAAT
 AGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAA
 AGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTG
 AACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGAT
 TTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGC
 TGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATT
 CGCCA

5.3 Epoxidhydrolase aus *Momordica charantia*

ATGGACCGGATTGAGCACACCACCGTCAACACCAATGGCATCAAAATGCACATCGCCTCCATCGGCACAGGCCCGT
 GTCCTTCTCCTCCACGGCTTCCCGGAGCTCTGGTACTCATGGCGCCACCAGCTTCTGTACCTTCTCCTCCGTCGGATAC
 CGCGCCATCGCGCCCGATCTCCGCGGCTACGGCGACACGGACTCGCCGGAATCGCATACTGCTCAGCTCCAC
 ATCTGTCGGCGATTTGGTTGGGGCTCTGGACGGGCTCGGGATCGACAAGGTGTTCTTGGTAGGGCACGATTTGGGGGCG
 ATAATCGCCTGGTACTTCTGCTTGTTCAGGCCAGATCGGATCAAGGCGCTGGTGAATCTCAGCGTCCATTTCTTACCT
 AGGAACCTGCGATTTCTGTTTGTGCGAGGGTTTCAGAGCTGCGTATGGCGATGACTTCTACATTTGCAGGTTTCAGGCT
 CCAGGAGAGGCAGAGCAACATTTTACCTCGGTTGACACAGCTCTGGTTTTGAAGGCATTGTTAAGTAATAGAAGTACA
 GATCCTCCAAAGTTGCCTAAAGAAGTTGGATTCCGTGGGAGACCACCTCCAGAAAACCTTCTTCTTGGCTGACAGAA
 GAAGACATCAACTATTTTGTGCCAAATTTAAGCACACAGGCTTTACTGGAGGATTGAACTACTATCGAGCTTTCGAC
 CTAACTTGGGAGCTGACCGCGCCATGGACGGGAGCACAGATCCAGGTGCCGGTGAAGTTCTGCTCGTGGGGATTTGGAT
 ATGACCTATCATTTTGCAGGAGCCAAGGAATACATCCACAACGGCGGATTCAAAAGGATGTGCCGTTTCTGGAGGAA
 GTGGTGGTAATGAAAGATACTGCTCACTTCATCAACCAAGAAAGGCCACAGGAAATCAGTACTCACATCCATGACTTC
 ATCAAGAAATTCTGA

5.3.1 p93momo12H05 Konstrukt

CACCTAAATTTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATA
 GGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAA
 GAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGA
 ACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCCTAAAGGGAGCCCCGAT
 TAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCT
 GGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATT
 GCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTTCTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGG
 ATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAATAACGACGGCCAGTGAAT
 GTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGGCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCCCCGGGCT
 GCAGGAGAGAACGAGAGAAGCTGCCATGGACCGGATTTGAGCACACCACCGTCAACACCAATGGCATCAAAATGCACAT

CGCCTCCATCGGCACAGGCCCGCTCGTCCTTCTCCTCCACGGCTTCCCGGAGCTCTGGTACTCATGGCGCCACCAGCT
TCTGTACCTTTTCCCTCCGTCGGATACCGCGCCATCGCGCCCCGATCTCCCGGGCTACGGCGACACGGACTCGCCGGAATC
GCATACGTACACTCTGCGCTCCACATCGTCGGCGATTTGGTTGGGGCTCTGGACGGGCTCGGGATCGACAAGGTGTT
CCTGGTAGGGCACGATTGGGGGGCGATAATCGCCTGGTACTTCTGCTTGTTCAGGCCAGATCGGATCAAGGCGCTGGT
GAATCTCAGCGTCCATTTCTTACCTAGGAACCCCTGCGATTTCTGTTTGTTCGAGGGTTTCAGAGCTGCGTATGGCGATGA
CTTCTACATTTGCAGGTTTCAGGCTCCAGGAGAGGCAGAGCAACATTTTACCTCGGTTGACACAGCTCTGGTTTTGAA
GGCATTTGTTAAGTAATAGAAGTACAGATCCTCCAAAGTTGCCTAAAGAAGTTGGATTCCGTGGGAGACCACCTCCAGA
AAACCTTCCCTTCTTGGCTGACAGAAGAAGACATCAACTATTTTGTGCCAAATTTAAGCACACAGGCTTTACTGGAGG
ATTGAACTACTATCGAGCTTTTCGACCTAACTTGGGAGCTGACCGGCCATGGACGGGAGCACAGATCCAGGTGCCGGT
GAAGTTCGTCGTCGGGATTTGGATATGACCTATCATTTTGCAGGACCAAGGAATACATCCACAACGGCGGATTCAA
AAAGGATGTGCCGTTTTCTGGAGGAAGTGGTGGTAATGAAAGATACTGCTCACTTCATCAACCAAGAAAGGCCACAGGA
AATCAGTACTCACATCCATGACTTCATCAAGAAATTTCTGAACCTCATTCTCCATTCACAGACTTTGAATTCATAAAG
TAAAATCCTTCTTTGCATATTTGAACAGTCATTGATTACGATGTCTGTTGCCACTTTTTCTTTGGGATACAAAAACA
GGAATTTGTTTATCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCGAGGGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAG
GGTAAATTTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACA
ACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTCGCTTGCCT
CACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGCGGTT
TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAG
CTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGC
AAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAA
ATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTTGAAGCTCCCTCG
TGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC
ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTGAGGTGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTT
AGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAATCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAG
CAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACG
GCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTT
GATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGAT
CTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTGGTCA
TGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTCATCCA
TAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATAC
CGCGAGACCCACGCTCACCAGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTC
CTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTT
TGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTT
CCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTG
TCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTATGCCATCCG
TAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTT
GCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAATTTAAAAGTGTCTCATATTGGAAAACGTTCTTCGG
GGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAG
CATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAAATAAGGGCGA
CACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTAATGAAGCATTTATCAGGGTTATTTGTCTCATGAGCG
GATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGC

5.3.2 pMO3000 Konstrukt

CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTTGTGAGCGGATAACAA
TTTACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCATGGAC
GCGATTGAGCACACCACCGTCAACACCAATGGCATCAAAATGCACATCGCCTCCATCGGCACAGGCCCGCTCGTCCTT
CTCCTCCACGGCTTCCCGGAGCTCTGGTACTCATGGCGCCACCAGCTTCTGTACCTTTCTCCGTCCGATACCGCGCC
ATCGCGCCCGATCTCCGCGGCTACGGCGACACGGACTCGCCGGAATCGCATAACGTCATACTCTGCGCTCCACATCGTC
GGCGATTTGGTTGGGCTCTGGACGGGCTCGGGATCGACAAGGTGTTTCTGGTAGGGCACGATTTGGGGGCGATAATC
GCCTGGTACTTCTGCTTGTTCAGGCCAGATCGGATCAAGGCGCTGGTGAATCTCAGCGTCCATTTCTTACCTAGGAAC
CCTGCGATTTCTGTTTGTTCGAGGGTTTTAGAGCTGCGTATGGCGATGACTTCTACATTTGCAGGTTTTAGGCTCCAGGA
GAGGCAGAGCAACATTTTACCTCGGTTGACACAGCTCTGGTTTTGAAGGCATTGTTAAGTAATAGAAGTACAGATCCT
CCAAAGTTGCCTAAAGAAGTTGGATTCCGTGGGAGACCACCTCCAGAAAACCTTCTTCTTGGCTGACAGAAGAAGAC
ATCAACTATTTTGTGCCAAATTTAAGCACACAGGCTTTACTGGAGGATTTGAACACTATCGAGCTTTTCGACCTAACT
TGGGAGCTGACCGCGCCATGGACGGGAGCACAGATCCAGGTGCCGGTGAAGTTCTGTCGTCGGGGATTTGGATATGACC

TATCATTTTTGCAGGAGCCAAGGAATACATCCACAACGGCGGATTCAAAAAGGATGTGCCGTTTTCTGGAGGAAGTGGTG
GTAATGAAAGATACTGCTCACTTCATCAACCAAGAAAGGCCACAGGAAATCAGTACTCACATCCATGACTTCATCAAG
AAATTCGAACGGTACCCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGT
AATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAAGACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAG
CTAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATAACCACCGTTGATATAT
CCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGGAGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTTACAGCTGG
ATATTACGGCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCCTTGCCCGCC
TGATGAATGCTCATCCGGAATTTTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCCTTGT
ACACGTTTTTCCATGAGCAAACGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTAC
ACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTTCAGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTTATTGAGAATATGTTTT
TCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTCTTCGCCCCCG
TTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTCT
GTGATGGCTTCCATGTCCGCGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTT
TTAAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGGGTAATGACTCTCTAGCTTGGAGCATCAAATAAAACGAAAGGCT
CAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCTC
TAGAGCTGCCTCGCGCGTTTTTCGGTGATGACGGTAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTTCACAGCTTGT
CTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGGCGCAGCCATG
ACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACC
ATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCCTCGCTCACTG
ACTCGCTGCGCTCGGTCTGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAAT
CAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGG
CGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAG
GACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGAT
ACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGG
TCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTC
TTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATG
TAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTTAACACGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTC
TGCTGAAGCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTATGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTT
TTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTG
ACGCTCAGTGGAACGAAAACCTACGTTAAGGGATTTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTT
TAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCA
GTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGCTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGA
TACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCAGGCTCCAGATTTATCAG
CAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATT
GTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGG
TGTACGCTCGTCTGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGT
TGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGG
TTATGGCAGCACTGCATAATTTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCA
AGTCATTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATA
GCAGAACTTTTAAAGTGCTCATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCAGCTGTTGAGAT
CCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAA
AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTT
AATATTAATGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA
TAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTCAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATA
AAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTTAC

5.3.3 pETMO Konstrukt

ATCCGGATATAGTTCCTCCTTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATT
GCTCAGCGGTGGCAGCAGCCAACCTCAGCTTCTTTTCGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGT
GCTCGAGGAATTTCTTGTAGTGAAGTCATGGATGTGAGTACTGATTTCTTGTGGCCTTTCTTGGTTGATGAAGTGAAGCAG
TATCTTTTATTACCACCATTCTCCAGAAAACGGCACATCCTTTTTGAATCCGCCGTTGTGGATGTATTCCTTGGCTC
CTGCAAAAATGATAGGTATATCCAAAATCCCGACGACGAACTTACCAGGACCTGGATCTGTGCTCCCGTCCATGGCG
CGGTCAGCTCCCAAGTTAGGTGCAAGACTCGATAGTAGTTCAATCCTCCAGTAAAGCCTGTGTGCTTAAATTTGGCAG
CAAAATAGTTGATGTCTTCTTGTGTCAGCCAAGAAGGAAGTTTTCTGGAGGTGGTCTCCACGGAATCCAACCTCTT
TAGGCAACTTTGGAGGATCTGTACTTCTATTACTTAAACAATGCCTTCAAAAACCAGAGCTGTGTCAACCGAGGTAAAAT
GTTGCTCTGCCTCTCCTGGAGCCTGAAACCTGCAAAATGTAGAAGTATCGCCATACGCAGCTCTGAAACCCCTCGACAA

ACGAAATCGCAGGGTTCC TAGGTAAGAAATGGACGCTGAGATTCACCAGCGCCTTGATCCGATCTGGCCTGAACAAGC
AGAAGTACCAGGCGATTATCGCCCCCAATCGTGCCCTACCAGGAACACCTTGTGATCCCGAGCCCGTCCAGAGCCC
CAACCAATCGCCGACGATGTGGAGCGCAGAGTATGACGATGCGATTCCGGCGAGTCCGTGTGCCGTAGCCGCGGA
GATCGGGCGCGATGGCGCGGTATCCGACGGAGGAAAGGTACAGAAGCTGGTGGCGCCATGAGTACCAGAGCTCCGGGA
AGCCGTGGAGGAGAAGGACGACGGGGCCTGTGCCGATGGAGGCGATGTGCATTTTGATGCCATTTGGTGTGACGGTGG
TGTGCTCAATCGCGTCCATTTGGATCCGAATTAATTCGATATCCATGGCCATCGCCGGCTGGGCAGCGAGGAGCAGCA
GACCAGCAGCAGCGGTCCGACGAGGATTTTCATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTAATTTCTAGAGG
GAAACCGTTGTGGTCTCCCTATAGTGAGTCTGATTAATTTTCGCGGGATCGAGATCTCGGGCAGCGTTGGGTCTGGCC
ACGGGTGCGCATGATCGTCTCCTGTCTGTTGAGGACCCGGCTAGGCTGGCGGGTTGCCTTACTGGTTAGCAGAATGA
ATCACCGATACGCGAGCGAACGTGAAGCGACTGCTGCTGCAAAACGCTGCGACCTGAGCAACAACATGAATGGTCTT
CGTTTTCCGTGTTTTCGTAAAGTCTGGAAACGCGGAAGTCAAGCGCCTGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGG
ATGCTGCTGGCTACCCTGTGGAACACCTACATCTGTATTAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGATTTTTCTCTG
GTCCCGCCGATCCATACCGCCAGTTGTTTTACCCTCACAACGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCG
TATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTTCATCGGTATCATTACCCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCATCAGT
GACCAAACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAACTCAA
CGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCT
CGCGCGTTTTCCGTGATGACGGTAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGA
TGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAAGGCGCGTCAAGCGGTTGTTGGCGGGTGTGCGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACG
TAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATATGCGGT
GTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGC
GCTCGGTGCTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAACAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATA
ACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAA
GATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCG
CCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCT
CCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCCGACCCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA
ACCCGTAAGACAGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGACAGGATAGCAGAGAGGATAGCAGAGGATGTTAGGCGTG
CTACAGAGTTCTTGAAGTTGGCTTAACACGCTTACACTAGAAGCAGATTTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC
CAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTT
GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT
GGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTTAAATTTAA
AATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCAC
CTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGG
GCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACC
AGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTGCCGGG
AAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCT
CGTCTGTTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAA
AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAG
CACTGCATAATTTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCATTCT
GAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT
TAAAAGTGTCTCATCATTTGGAAAACGTTCTTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCCTGTGAGATCCAGTTTCA
TGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAA
GGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTTAT
GAAGCATTTATCAGGGTTATTTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTT
CGCGCACATTTCCCCGAAAAGTCCACCTGAAATTTGTAACGTTAATATTTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTT
AAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCCGAGATAGGGT
TGAGTGTGTTCCAGTTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTTCAAAGGGCGAAAAACCGTCT
ATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATC
GGAACCTTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAG
CGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATG
CGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCA

5.4 Epoxidhydrrolase aus *R. ruber* DSM44319 und *R. rhodochrous* LMPG-18079

ATGCAACTGAACAATGCGAACGACAACACGCAGTTCCGGGCCCTGCTTTTCGACGTGCAGGGGACTCTGACAGATTTCC
CGTTCCACACTCATCGAGCACGGCTTATCGATTCTCGGAGACAGAGTGGATCGAGAACTCTGGGAGGAATTTGGTTCGAC
CAATGGCGCGGCTGCTATCGAGACGAGCTCGATTCCCTTGGTCAAACAGGAGAAATGGCGCTCGGTCCGCGCCGTGTAC

CGAGATTCTCTTATCAATCTTCTCGCAAAATTCTCTGACAGTTTCTGCGCCACCTCGGCCGAAGTGGAATTGCTGACC
GATGGTTGGGAACGTCTTCGGTCGTGGCCGGACGTCCCCCTCTGGATTGGAACAGCTGCGGTCTAAGTACCTCGTCGCG
GCACTGACGAATGCGGACTTTTCTGCCATCGTCAACGTGGGGCGTAGCGCCAAACTGCAATGGGACGCTGTTCTTTCA
GCTCAACTCTTTGGAGCCTACAAGCCCCACCGGTCAACATATGAGGGAGCCGCGACACTCCTGGGTATCGCTCCGTCA
GAGATCCTCATGGTCGCCTCCCATGCATACGATCTCGAAGCGGCGCGGGAAGTGGGAGCCGGCACAGCGTACGTCAGA
CGGCCACTGGAATACGGACCGACGGGGCGAACCGAGGACGTTCCCGATGGACGTTTCGATTTCTTGGTCGACAGCATC
AGTGAACTGGCTGATCAGCTGGGCTGCCCACGACTCGGTGGAAGTGCCGGTATCGATTGA

H Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname	Doderer
Vorname	Kai
Geburtstag	30. November 1972
Geburtsort	Ulm (Donau)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Adresse	Alexanderstraße 14, 73733 Esslingen

Schulbildung

Juni 1979 – Juli 1983	Längenfeldgrundschule in Ehingen/Donau
Juni 1983 – Mai 1992	Gymnasium Ehingen/Donau
	Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Wissenschaftliche Ausbildung

Oktober 1992 – 1994	Grundstudium Chemie (Diplom) an der Universität Stuttgart
September 1994	Vordiplom Chemie
Oktober 1994 – Juni 1998	Hauptstudium mit Vertiefungsfach: Theoretische Chemie
Juli 1998	Diplomprüfungen
August 1998 – Februar 1999	Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Bertagnolli am Institut für physikalische Chemie, Universität Stuttgart: „Untersuchungen der Bildung von Monoschichten mit Hilfe der IR- und Raman-Spektroskopie“

Zivildienst

März 1999 – März 2000	Zivildienst als Pfleger im Katharinenhospital Stuttgart
-----------------------	---

I Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Stuttgart, den 24. September 2003