

# Inhaltsangabe

## I. Einführung

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Einteilung und Klassifizierung Sauerstoff-verbrauchender Enzyme.....                                                             | 1  |
| 2. Der Reaktionstyp als Charakteristikum für die Einteilung der Dioxygenasen...                                                     | 2  |
| 3. Eine weitere Gruppe von Dioxygenasen wird durch die Abhängigkeit von einem Cosubstrat mit einer 2-Oxogruppe charakterisiert..... | 3  |
| 3.1 Reaktionsmechanismus einer 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase mit Hydroxylase-Aktivität.....                                  | 6  |
| 3.2 Bifunktionale Dioxygenasen mit Hydroxylase- und Epoxidase-Aktivität.....                                                        | 8  |
| 3.3 Cyclasen und Desaturasen als 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen .                                                             | 8  |
| 3.4 Verwendung alternativer Cosubstrate mit einer 2-Oxogruppe.....                                                                  | 9  |
| 4. In der Biosynthese der $\beta$ -Lactam-Antibiotika katalysieren Dioxygenasen verschiedene Syntheseschritte.....                  | 10 |
| 4.1 Enzyme der ersten gemeinsamen Stufe der $\beta$ -Lactam-Biosynthese aller Produzenten.....                                      | 11 |
| 4.2 Die Biosynthese der Penicilline durch <i>Penicillium chrysogenum</i> und <i>Aspergillus nidulans</i> .....                      | 13 |
| 4.3 Biosynthese der Cephalosporine und Cephamycine.....                                                                             | 15 |
| 4.4 Die Cephalosporin C-Biosynthese bei <i>Acremonium chrysogenum</i> .....                                                         | 17 |
| 4.5 Biosyntheseschritte der prokaryotischen Produzenten zum Endprodukt Cephamycin C.....                                            | 18 |
| 5. Ausblick.....                                                                                                                    | 20 |

## II. Problemstellung

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 1. Ziele der industriell genutzten Biotechnologie..... | 22 |
| 2. Problemstellung.....                                | 23 |

## III. Material und Methoden

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| 1. Material                       |    |
| 1.1 Stämme.....                   | 25 |
| 1.2 Plasmide.....                 | 25 |
| 1.3 Oligonukleotide.....          | 27 |
| 1.4 Nährmedien.....               | 28 |
| 1.5 Häufig verwendete Puffer..... | 29 |
| 1.6 Chemikalien.....              | 29 |
| 1.7 Enzyme.....                   | 30 |

## 2. Methoden

|        |                                                                             |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1    | Kulturbedingungen.....                                                      | 30 |
| 2.2    | Transformation.....                                                         | 30 |
| 2.3    | Isolierung von Nukleinsäuren.....                                           | 30 |
| 2.4    | Gelelektrophorese.....                                                      | 31 |
| 2.5    | Radioaktive Markierung von DNA.....                                         | 31 |
| 2.6    | Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....                                        | 31 |
| 2.7    | Elution von DNA aus Agarosegelen und Reinigung von DNA-Fragmenten.....      | 31 |
| 2.8    | DNA-Sequenzierung.....                                                      | 32 |
| 2.9    | Oligonukleotidsynthese.....                                                 | 32 |
| 2.10   | <i>In vitro</i> -Mutagenese und Klonierung der DNA-Fragmente.....           | 32 |
| 2.11   | Synthese und Reinigung rekombinanter Proteine.....                          | 34 |
| 2.11.1 | Synthese der rekombinanten Proteine.....                                    | 34 |
| 2.11.2 | Isolation des nativen Proteins.....                                         | 34 |
| 2.11.3 | Renaturierung und Dialyse von Proteinen in Einschlußkörpern.....            | 34 |
| 2.11.4 | Aufreinigung der Histidin-Fusionsproteine.....                              | 35 |
| 2.12   | Bestimmung der Proteinkonzentration.....                                    | 35 |
| 2.13   | Western-Blot und Immunodetektion.....                                       | 35 |
| 2.14   | Funktionsanalyse der Expandase/Hydroxylase in einem enzymatischen Test..... | 35 |
| 2.15   | Quantitativer Nachweis von $\beta$ -Lactam-Verbindungen.....                | 36 |
| 2.16   | Modellierung von 3-D-Proteinstrukturen.....                                 | 37 |
| 2.17   | Auswertung von Nukleotidsequenzen und allgemeine Software.....              | 38 |
| 2.18   | Sicherheitsbestimmungen.....                                                | 38 |

## IV. Ergebnisse

|     |                                                                                                                                                 |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.  | Synthese und Aufreinigung der Expandase/Hydroxylase aus <i>A. chrysogenum</i> .....                                                             | 39 |
| 1.1 | Konstruktion des Expressionsvektors und des Synthesystems.....                                                                                  | 39 |
| 1.2 | Synthese und Reinigung des Fusionsproteins.....                                                                                                 | 40 |
| 2.  | Funktionsanalyse der Expandase/Hydroxylase mit Enzymmessungen.....                                                                              | 43 |
| 2.1 | Enzymaktivitätsvergleich des nativen und renaturierten Wildtyp-Proteins.....                                                                    | 43 |
| 2.2 | Bestimmung des pH- und Temperatur-Profiles der Expandase/Hydroxylase.....                                                                       | 45 |
| 3.  | Homologievergleich der Primärstruktur der Expandase/Hydroxylase mit Primärstrukturen verwandter Proteine und weiteren Dioxygenasen.....         | 47 |
| 4.  | 3-D-Strukturmodellierung zur Charakterisierung der Expandase/Hydroxylase.....                                                                   | 50 |
| 4.1 | Vergleich der Primär- und Sekundärstrukturen der DAOCS aus <i>S. clavuligerus</i> mit der Expandase/Hydroxylase aus <i>A. chrysogenum</i> ..... | 50 |
| 4.2 | Strukturmodellierung der Expandase/Hydroxylase aus <i>A. chrysogenum</i> .....                                                                  | 51 |
| 4.3 | Qualitätskontrolle der modellierten Struktur der Expandase/Hydroxylase.....                                                                     | 53 |
| 4.4 | Gesamtbeurteilung der Modellstruktur der Expandase/Hydroxylase.....                                                                             | 55 |

|     |                                                                                                                                                             |    |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5   | Lokalisierung von „Reaktionshöhlen“ .....                                                                                                                   | 56 |
| 6.  | Analyse funktions- und struktureller Aminosäurereste durch <i>in vitro</i> -<br>Mutagenese und Bestimmung der Aktivitäten der modifizierten Proteine ...    | 60 |
| 6.1 | Einfluß der Mutationen auf die Expression bei der Synthese und<br>Aufreinigung.....                                                                         | 60 |
| 6.2 | Auswirkungen von Modifikationen in konservierten und funktions-<br>relevanten Bereichen des putativen Aktivitätszentrums der<br>Expandase/Hydroxylase ..... | 62 |

## V. Diskussion

|     |                                                                                                                                                                  |    |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1   | Die funktionale Synthese der Expandase/Hydroxylase ist mit dem<br>prokaryotischen Expressionssystem <i>Escherichia coli</i> möglich.....                         | 65 |
| 2.  | Die Expandase/Hydroxylase hat nur eine Eisen-Koordinierungsstelle und<br>eine Bindestelle für 2-Oxoglutarat.....                                                 | 67 |
| 2.1 | Die Eisen-Koordinierungsstelle besteht aus zwei Histidinresten und<br>einem Asparaginsäurerest.....                                                              | 67 |
| 2.2 | Im konservierten Sequenzbereich befindet sich die einzige Bindestelle<br>für 2-Oxoglutarat.....                                                                  | 69 |
| 2.3 | Die Tertiärstruktur der Expandase/Hydroxylase weist mit dem<br>„jelly-roll“-Motiv Ähnlichkeiten zur IPNS und zur DAOCS auf.....                                  | 70 |
| 2.4 | Die Aktivitätszentren der IPNS, der DAOCS und der modellierten<br>Expandase/Hydroxylase weisen eine große Strukturähnlichkeit auf.....                           | 71 |
| 2.5 | Eine absolute Trennung der beiden Teilreaktionen ist in einem<br>bifunktionalen Reaktionszentrum nicht möglich.....                                              | 73 |
| 3.  | Möglicher Reaktionsmechanismus der bifunktionalen<br>Expandase/Hydroxylase.....                                                                                  | 78 |
| 3.1 | Vergleich der katalysierten Reaktionstypen innerhalb der $\beta$ -Lactam-<br>Biosynthese.....                                                                    | 79 |
| 4.  | Ziele der modernen Stamm- und Prozeßentwicklung.....                                                                                                             | 82 |
| 3.1 | Kenntnisse der molekularen Charakterisierung der Expandase/<br>Hydroxylase könnten für die industrielle Stamm- und Prozeß-<br>entwicklung verwendet werden ..... | 82 |
| 4.2 | Verfahrenstechnische Aspekte der industriellen Prozeßentwicklung.....                                                                                            | 84 |

|     |                      |    |
|-----|----------------------|----|
| VI. | Zusammenfassung..... | 85 |
|-----|----------------------|----|

|      |               |    |
|------|---------------|----|
| VII. | Summary ..... | 87 |
|------|---------------|----|

|       |                |    |
|-------|----------------|----|
| VIII. | Literatur..... | 89 |
|-------|----------------|----|

|     |             |     |
|-----|-------------|-----|
| IX. | Anhang..... | 110 |
|-----|-------------|-----|