

Titel des Projekts:

**Verwertung Co-Faktorunabhängiger Decarboxylasen für die
Produktion von doppelsubstituierten Essigsäurederivaten**

Projektkennziffer:

AZ 13133

Projektpartner:

Prof. Wolfgang Streit

Universität Hamburg, Abteilung für Mikrobiologie & Biotechnologie

Prof. Karl-Erich Jäger, Dr. Christian Leggewie

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Molekulare Enzymtechnologie
im Forschungszentrum Jülich

Dr. Steffen Osswald

Degussa AG

Dr. Hüseyin Aygün, Dr. Markus Kircher

BioSpring GmbH

Überblick:

Zusammenfassung.....	1
Projektziele und wissenschaftlicher Hintergrund	2
Verwendete Methoden.....	3
Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse.....	3
1. Malonsäuredecarboxylasen.....	3
1.1 Screening einer Mutantenbank der Decarboxylase aus <i>Bordetella bronchisepticus</i> (AMDase).....	3
1.2 Klonierung von homologen Genen nach Datenbankvergleich	3
1.3 Anreicherung von Umweltproben.....	4
1.4 Detektion von aktiven Isolaten.....	4
1.5 Identifizierung eines Bakterienstammes mit Aktivität gegen Phenylmalonat...	6
1.6 Isolierung des entsprechenden Decarboxylase-Gens.....	9
2. Aminosäure-Decarboxylasen.....	12
2.1 Synthese einer Lysin-Decarboxylase aus <i>Selenomonas ruminatium</i> und einer Histidin-Decarboxylase aus <i>Enterobacter aerogenes</i>	12
2.2 Assay-Etablierung.....	12
2.3 Screening einer Metagenombank nach Lysin- und Histidin-Decarboxylasen.....	13
2.4 Charakterisierung eines aktiven Metagenom-Klons.....	13
Soll-/Ist Vergleich.....	15
Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen.....	15
Diskussion.....	16
Kooperationen innerhalb des Projekts.....	17
Literatur.....	18
Präsentationen.....	19

Zusammenfassung

Bei den Co-Faktor-unabhängigen Arylmalonsäure-Decarboxylasen (AMDasen) handelt es sich um äußerst seltene Enzyme (1). Allerdings sind diese Decarboxylasen begehrte Biokatalysatoren, die bei einer Vielzahl spezifischer Umsetzungen (regio- und enantioselektiv) in der chemischen Industrie eingesetzt werden könnten. Zudem könnten durch den Einsatz dieser Enzymklasse erhebliche Schwermetall- (ca. 10 kg vanadiumhaltiger Abfall pro Tonne an Endprodukt) und blausäurehaltige Abfälle (ca. 1-2 Tonnen pro Tonne an Endprodukt) vermieden werden. Im Rahmen dieses Projekts sollen neue Decarboxylasen isoliert, charakterisiert und für den Industrieinsatz vorbereitet werden.

Zur Isolierung neuer Decarboxylasen wurden drei Vorgehensweisen parallel bearbeitet: i) die gerichtete Evolution der bereits bekannten und einzigen AMDase aus *Bordetella (Alcaligenes) bronchisepticus* (1), ii) die Klonierung von Decarboxylasegenen, die eine Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zur AMDase aufweisen, iii) die Identifizierung neuer Enzyme aus angereicherten Umweltproben.

So wurde mit der PHENOlution[®] Technik (Patent EP1327682) eine 5000 Klone umfassende Mutantenbank erstellt. Es konnte jedoch kein Klon mit verbesserten Eigenschaften identifiziert werden. Überdies wurden nach Datenbankvergleich drei putative Decarboxylasegene aus *Sinorhizobium meliloti* 1021, *Rhizobium* NGR234 und *Burkholderia glumae* kloniert und in *E. coli* überexprimiert. Jedoch konnte in verschiedenen Aktivitätstests keine Umsetzung von Malonsäurederivaten beobachtet werden. Eine Anreicherung von 15 verschiedenen Umweltproben mit aliphatischen oder aromatischen Malonsäuren als einzige Kohlenstoffquelle führte zur Isolierung aktiver Mikroorganismen. Bei einem Isolat mit Ähnlichkeit zu *Variovorax* sp. konnte die Aktivität mittels HPLC-Analyse bestätigt werden. Es konnte auch gezeigt werden, dass das entsprechende Enzym mit hoher Wahrscheinlichkeit Co-Faktorunabhängig agiert. Die korrespondierenden neuen Amd-Gene wurden im Zuge einer Genom-Sequenzierung identifiziert.

Weiterhin wurde ein Assay zur Detektion von Aminosäure-Decarboxylasen etabliert, dessen Funktionalität durch die innerhalb dieses Projektes synthetisierten Enzyme Lysin-Decarboxylase aus *Selenomonas ruminatum* (2) und Histidin-Decarboxylase aus *Enterobacter aerogenes* (3) bewiesen werden konnte. Mit Hilfe dieses Assays wurde bei einem Screening von Metagenombibliotheken ein aktiver Lysin-

Decarboxylaseklon identifiziert. Die Decarboxylierung von Lysin zu Cadaverin konnte durch eine HPLC-Analyse bestätigt werden.

Projektziele und wissenschaftlicher Hintergrund

Ziel dieses Projektes ist es, neue Enzyme bereit zu stellen, die für eine biotechnologische Anwendung in der chemisch/pharmazeutischen Industrie geeignet sind und zur Umweltentlastung beitragen. Der besondere Schwerpunkt des Projektes liegt dabei auf Decarboxylasen, die ohne Co-Enzym eine Decarboxylierung doppelsubstituierter Malonsäurederivate ermöglichen. Die Erschließung und Verwertung neuer Enzyme dieser Enzymklasse (EC 4.1.1.) ist als eine wichtige Alternative gegenüber dem chemischen Zugang zu einer Vielzahl an optisch aktiven α -substituierten Carbonsäuren anzusehen (1). Decarboxylasen sind begehrte Biokatalysatoren, da sie eine Vielzahl unterschiedlicher Reaktionen spezifisch (regio- und enantioselektiv) und mit einer hohen Umsatzzahl katalysieren können. Aus diesem Grund bietet sich ihr Einsatz in der chemischen Synthese an.

Im geplanten Projekt sollen Decarboxylasen für die Synthese von (S)- oder (R)-Mandelsäuren zum Einsatz kommen. Der ökologische Vorteil eines biologischen Herstellungsverfahrens ist offensichtlich: Im klassischen chemischen Syntheseverfahren entstehen erhebliche Schwermetall- (ca. 10 kg vanadiumhaltiger Abfall pro Tonne an Endprodukt) und blausäurehaltige Abfälle (ca. 1-2 Tonnen pro Tonne an Endprodukt). Somit kann der Einsatz von Biokatalysatoren zu einer signifikanten Umweltentlastung beitragen. Die Decarboxylierung eines prochiralen Malonsäurederivates kann theoretisch zu 100% eines enantiomerenreinen Produktes führen. Die Chiralität wird dabei erst durch die enzymatische Reaktion in das Substrat eingeführt (s. Abb. 1).



Abb. 1: Reaktionsschema von Decarboxylasen.

Die enantioselektive Decarboxylierung erleichtert den Zugang zu zahlreichen neuen Feinchemikalien. Beispielsweise können durch eine solche Reaktionsführung über chemisch leicht zugängliche 2-Amino-Malonsäurederivate, viele natürliche und nicht-natürliche α -Aminosäuren hergestellt werden.

Die Isolierung neuer Decarboxylasen ist notwendig, um insbesondere die hohe Anzahl der bereits in der chemischen Industrie verwendeten und bekannten Derivate umzusetzen.

Verwendete Methoden

Metagenomtechnologien, Robotertechnik, PHENOlution[®] Technik (Patent EP1327682), 16S rRNA-Analyse, HPLC und rekombinante DNA-Technologien.

Aufzählung der wichtigsten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse und anderer wesentlicher Ereignisse

1 Malonsäuredecarboxylasen

1.1 Screening einer Mutantenbank der Decarboxylase aus *Bordetella bronchiseptica* (AMDase)

Bis heute wurde unseres Wissens nur ein Enzym beschrieben, welches Phenylmalonat Co-Faktor-unabhängig decarboxyliert, die sogenannte AMDase aus *Bordetella bronchiseptica* (1). Da diese Enzymklasse sehr selten ist, wurde in einem ersten Ansatz eine bereits auf die Codon-usage von *Escherichia coli* optimierte Variante des bekannten Decarboxylase-Gens einer Zufallsmutagenese unterzogen. Hierbei wurde die sogenannte PHENOlution[®] Technik (Patent EP1327682) der Firma BioSpring eingesetzt, wobei die Mutationen kontrollierbar mittels Gensynthese eingeführt wurden. Eine 5000 Klone umfassende Mutantenbank der AMDase in *E. coli* Top10 wurde auf Aktivität gegenüber verschiedenen aromatischen und aliphatischen Malonsäuren durchmustert. Es konnten jedoch keine aktiven Klone identifiziert werden. Ebenso konnte auch keine aktivere Variante der Wildtyp-AMDase gegenüber dem bekannterweise umsetzbaren Substrat Phenylmalonsäure identifiziert werden. Zusätzlich wurden durch die Fa. Biospring eine Reihe neuer Substrate synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Jedoch wurde auch damit keine neue Substratspezifität entdeckt.

1.2 Klonierung von homologen Genen nach Datenbankvergleich

Eine Homologiesuche in der Datenbank ERGO nach Enzymen, die eine Ähnlichkeit zur AMDase aus *Bordetella bronchiseptica* aufweisen, ergab keine Ähnlichkeiten >33 % auf Aminosäureebene. Jedoch zeigten drei Enzyme aus *Sinorhizobium*

meliloti 1021 (33%), *Rhizobium* NGR234 (47%) und *Burkholderia glumae* (27%) eine zwar geringe, aber signifikante Ähnlichkeit. Da alle drei Organismen in phylogenetisch relativ naher Verwandtschaft zu *Bordetella* stehen, wurden diese drei Gene aus dem jeweiligen Organismus isoliert und in Überexpressionsvektoren kloniert. Obwohl in allen Fällen die heterologe Überexpression und Reinigung problemlos erfolgte zeigten alle Enzyme jedoch keine Aktivität im Agarplattenassay, der auf einem pH-Shift beruht, gegenüber den Substraten Phenylmalonat, Benzylmalonat und Methylmalonat. Abb. 2 zeigt beispielhaft den Aktivitätstest des putativen Enzyms aus *Sinorhizobium meliloti* 1021 gegenüber dem Substrat Phenylmalonat.

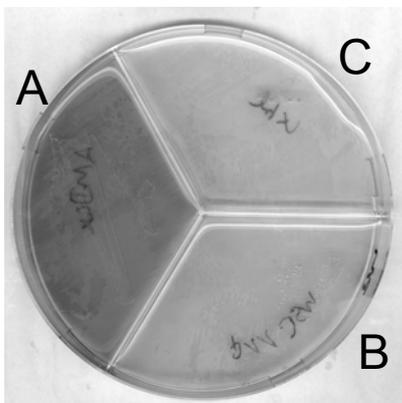


Abb. 2: Aktivitätstest von Zellausstrichen gegenüber dem Substrat Phenylmalonsäure. Aktive Zellen bewirken einen Farbumschlag von gelb nach blau (hell-dunkel). A: Positivkontrolle, AMDase aus *Alcaligenes bronchisepticus* in pBADHISA, B: Putative Decarboxylase aus *Sinorhizobium meliloti* 1021 in pET11a, *E. coli* BL21 (DE3), C: Leervektorkontrolle *E. coli* BL21 (DE3)

1.3 Anreicherung von Umweltproben

Wie schon erwähnt handelt es sich bei den gesuchten Decarboxylasen um äußerst seltene Enzyme (1). Deshalb sollte zunächst eine Anreicherung mit verschiedenen aliphatischen oder aromatischen Malonsäuren, die als alleinige Kohlenstoffquelle im Minimalmedium vorhanden waren, durchgeführt werden. Fünfzehn Umweltproben verschiedenster Herkunft (Boden, Biofilm, etc.) wurden direkt nach der Entnahme in dem jeweiligen Anreicherungsmedium (Gemisch entweder aliphatischer oder aromatischer Malonsäuren, 10 ml, 100 ml Erlenmeyerkolben) aufgenommen und für drei Tage bei 30°C und leichtem Schütteln inkubiert. In diesem Zeitraum gewachsene Kulturen wurden auf demselben festen Anreicherungsmedium ausgestrichen, so dass Einzelkolonien identifizierbar wurden.

1.4 Detektion von aktiven Isolaten mit Hilfe eines pH-abhängigen Verfahrens

Die Einzelkolonien mit unterschiedlichen Phänotypen wurden dann auf einem festen Decarboxylase-Indikatormedium angezogen. Nach etwa zwei Tagen Inkubation bei 30°C zeigten einige Bakterienausstriche ebenfalls eine Enzymaktivität, welche durch einen pH-Shift und einen geeigneten pH-Indikator sichtbar gemacht wurde (Abb. 3).

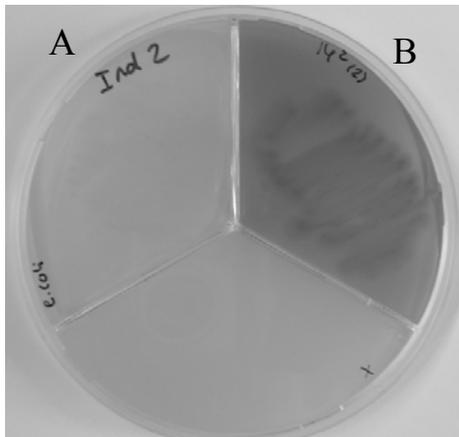


Abb. 3: Aktivitätstest von ganzen Zellen eines isolierten Stammes gegenüber dem Substrat Phenylmalonsäure. Aktive Zellen bewirken einen Farbumschlag von gelb nach blau (hell-dunkel). A: Negativkontrolle *E. coli* K12, B: Umweltisolat nach Anreicherung.

Fünf aktive Isolate konnten auf diese Weise detektiert werden. Bei der anschließenden Identifizierung durch 16S rRNA Analyse konnte in keinem Fall eine vollständige Übereinstimmung zu bereits bekannten Bakterien erzielt werden, jedoch können die Isolate aufgrund einer Ähnlichkeit von mindestens 95% (rev oder for-primer) mit einiger Wahrscheinlichkeit Gattungen zugeordnet werden (Tab. 1). Um auszuschließen, dass es sich bei den für die Aktivität verantwortlichen Enzymen um die bereits bekannte AMDase aus *B. bronchiseptica* handelt, wurde zusätzlich eine Test-PCR mit abgeleiteten Primern durchgeführt, die innerhalb des AMDase-Gens binden. Die PCR-Analyse, die mit isolierter genomischer DNA der Isolate als Template durchgeführt wurde, zeigte keine Bandenmuster der Produkte der entsprechenden Größen (ohne Abb.). Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich also nicht um das Decarboxylase-Gen aus *B. bronchisepticus*, sondern um neue, bisher unbekannte Enzyme.

Tabelle 1: 16S rRNA-Genanalyse Malonsäuredecarboxylase-aktiver Isolate

Isolat	Organismus	% Ähnlichkeit
A	<i>Varivorax</i> sp MD3	99% forward
	<i>Varivorax</i> sp MD3	92% reverse
B	<i>Pseudomonas</i> sp.	98% forward
	<i>Pseudomonas</i> sp.	85% reverse

C	<i>Comamonas testosteroni</i> <i>Comamonas testosteroni</i>	97% forward 95% reverse
D	<i>Delftia acidovorans</i> <i>Delftia acidovorans</i>	98% forward 96% reverse
E	<i>Variovorax sp.</i> <i>Variovorax sp.</i>	99% forward 99% reverse

Die Aktivitäten sollten auch im flüssigen Medium nach Zellaufschluß bestätigt werden. Allerdings zeigte nur das Isolat E mit Ähnlichkeit zu *Variovorax sp.* einen reproduzierbaren pH-Shift (Abb. 4). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der sichtbare pH-Shift nicht durch eine pH-Regulation ganzer Zellen verursacht wurde.

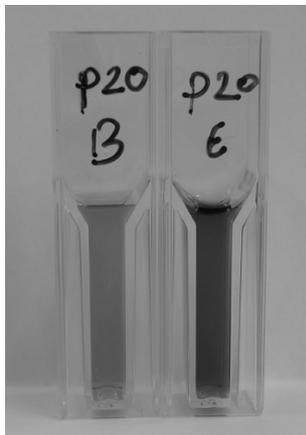


Abb. 4: Aktivitätstest von aufgeschlossenen Zellen (10 μ l, entsprechend einer $OD_{580} = 3$) des Isolats E (Ähnlichkeit zu *Variovorax sp.*) gegenüber dem Substrat Phenylmalonsäure. Aktive Zellen bewirken einen Farbumschlag von gelb nach blau (hell-dunkel). Links: Negativkontrolle *E. coli* K12, rechts: Isolat E.

Ob der pH-Shift jedoch wirklich durch die Umsetzung des Substrats Phenylmalonsäure zu Phenylacetat ausgelöst wird, konnte durch diese Tests noch nicht gezeigt werden, sondern musste im Folgenden durch HPLC-Assays erst verifiziert werden.

1.5 Identifizierung eines Bakterienstammes mit Aktivität gegen Phenylmalonat, HPLC- Analyse

Mit dem Nachweis sowohl des eingesetzten Substrats Phenylmalonsäure, als auch des entstehenden Produkts Phenylacetat mittels HPLC-Analyse (BioSpring) sollte die Aktivität des Isolats E überprüft werden. Tatsächlich steigt die Umsatzrate der Decarboxylierung mit der Zeit und ist abhängig von der eingesetzten Menge an Zellaufschluss (Abb. 5). So sind beispielsweise bei 100 μ l eingesetztem Zellaufschluss nach einem Tag mehr als 40 % der Phenylmalonsäure zu Phenylacetat umgesetzt. Der im Assay beobachtete pH-Shift wurde also durch diese

Decarboxylierung verursacht, d.h. Phenylmalonsäure wird enzymatisch umgesetzt und man kann daher davon ausgehen, dass es sich bei dem isolierten Enzym um eine Malonsäuredecarboxylase handelt.

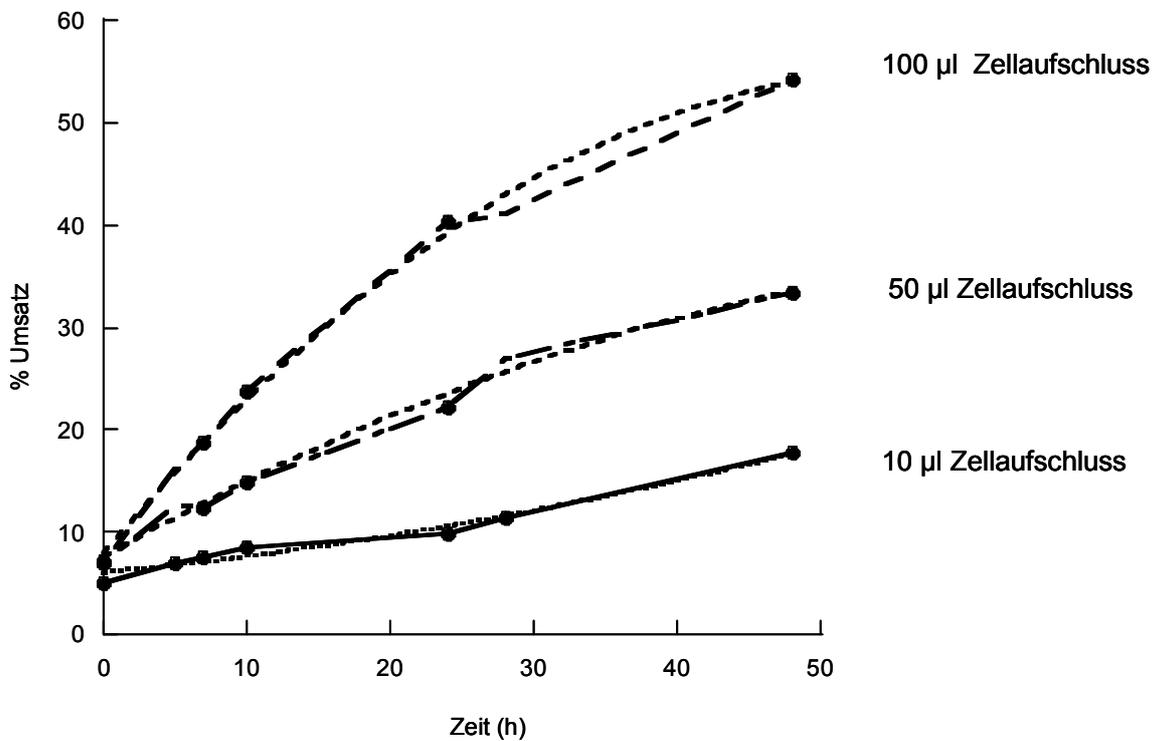
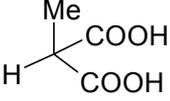
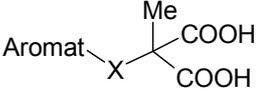
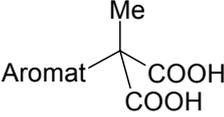
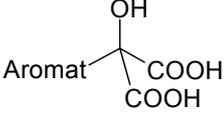
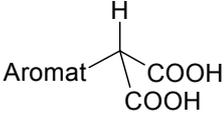


Abb. 5: HPLC-Analyse und Kinetiken von Aktivitätstests mit Zellaufschlüssen des isolierten Stammes E. Die Umsetzung von Phenylmalonsäure zu Phenylacetat wurde mit 10, 50 und 100 µl Zellextrakt dokumentiert.

Weitere Substrate, die auf Umsetzung getestet wurden sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2. Aktivitäten der bekannten und neu isolierten Malonsäuredecarboxylase mit unterschiedlichen Substraten.

Substrate	Enzym (neu)	Enzym (Σ -Mutante-Referenz)
Aktivität		
$\begin{array}{c} \text{Br} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{COOH} \end{array}$	Nein	Nein

	Nein	Nein
	Nein	Nein
	Ja	Ja
	Ja	Ja
	Ja	Ja

In früheren Arbeiten wurde angenommen, dass die Arylmalonsäure-Decarboxylase aus *A. bronchisepticus* das Substrat durch eine freie SH-Gruppe aktiviert und deshalb keinen Co-Faktor benötigt (1). In diesem Fall war das strukturell ähnliche Substrat α -Bromophenylacetat (BPA) ein potenter Inhibitor, welcher vermutlich mit dem Cystein des aktiven Zentrums interagiert. Bei Co-Faktor-abhängigen Decarboxylasen ist diese Position geschützt durch den Co-Faktor. Bromessigsäure wirkt dabei als sehr starker Inhibitor der Malonsäuredecarboxylase. Daher war es sinnvoll, mit dem neu identifizierten Enzym einen ähnlichen Test durchzuführen. Dabei zeigte sich, dass Zellaufschlüsse des Isolats **E** (Tabelle 1) ebenfalls durch BPA inhibiert wurden, wobei 10 mM BPA ausreichten um das unbekannte Enzym zu inhibieren (Abb. 6). Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist somit die neue Decarboxylase aus dem Isolat **E** Co-Faktorunabhängig.

A)

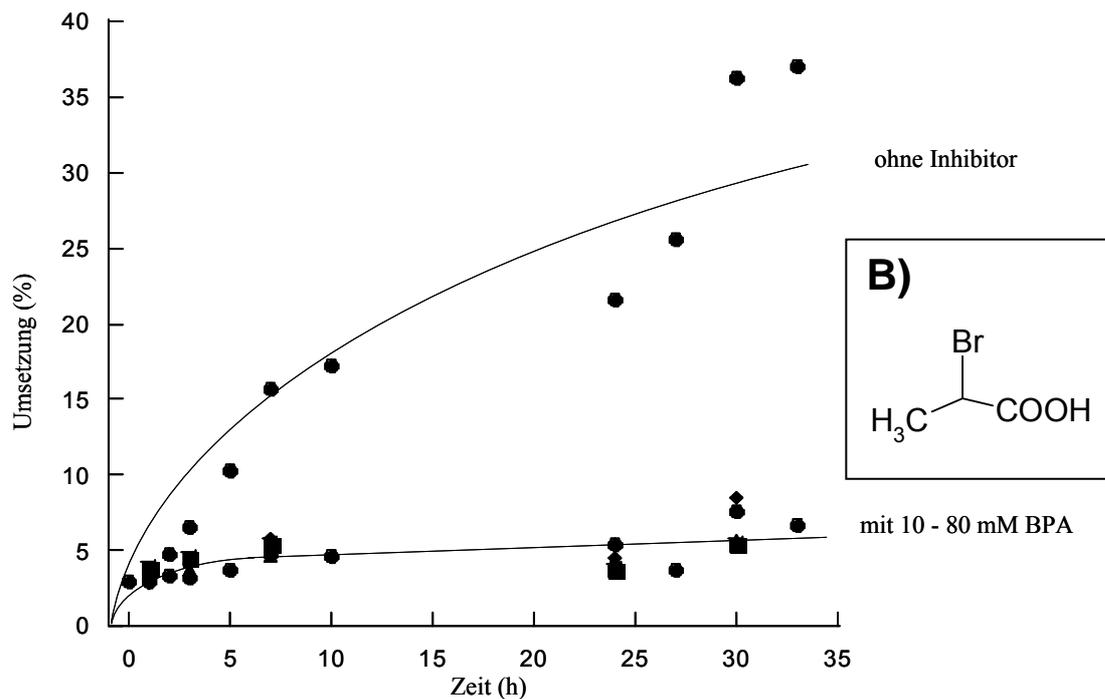


Abb. 6: A, HPLC-Analyse von Aktivitätstests mit Zellaufschlüssen des Isolats E nach Inkubation mit und ohne α -Bromophenylacetat (BPA). Gezeigt ist die Umsetzung von Phenylmalonsäure zu Phenylacetat; und B, α -Bromophenylacetat (BPA).

1.6 Isolierung des entsprechenden Decarboxylase-Gens

Für die weitere Charakterisierung der Malonsäuredecarboxylase wurde damit begonnen, dieses Enzym einerseits aufzureinigen und andererseits rekombinant zu produzieren. Allerdings lag für die heterologe Überexpression in *E. coli* keine Gensequenz vor und DNA-DNA-Hybridisierungsversuche, sowie PCR-Tests mit konservierten Primern haben gezeigt, dass das in dieser Arbeit detektierte Gen aus den Isolaten nicht mit Hilfe von sequenzbasierter Suche identifiziert werden kann.

Aus diesem Grund haben wir zunächst eine Cosmidbank des **E-Isolates** generiert. Dabei wurden etwa 1.000 Cosmide in pWE15 hergestellt. Die Cosmide hatten eine Insertgröße von ca. 3-35 kb, so dass eine 5-6-fache Genomabdeckung gewährleistet war. Versuche ein Cosmid zu identifizieren, auf dem die Decarboxylase aktiv exprimiert wurde, schlugen jedoch fehl. Mögliche Ursachen, können in schwacher Genexpression, falscher Chaperone oder Codonusage gelegen haben. Aus diesem Grund wurde im zweiten Ansatz eine small-insert library generiert. Obwohl einige tausend Klone generiert und durchmustert wurden hat dieser Ansatz nicht zum Ziel geführt. Letztendlich stellte sich heraus, dass der hohe G+C-Gehalt des Organismus dafür verantwortlich war (siehe unten).

In weiteren Arbeiten haben wir die parallele Aufreinigung des Proteins aus dem Rohextrakt, bzw. die Etablierung eines Reinigungsprotokolls vorangetrieben. Auf diese Weise können wir sicherstellen, dass wir auf jeden Fall ein Protein in die Hände bekommen, selbst wenn der genetische Ansatz nicht zum Erfolg führt.

Die Reinigung hat dabei bisher folgendes ergeben:

1. Ammoniumsulfatfällung mit 45%; die Aktivität liegt dann im Überstand;
2. Ankonzentrierung des Überstandes mit Amicon; aktive Proteinfraction ist > 30 kDa.
3. Trennung über Anionensäule ergibt eine klaren Aktivitätspeak in wenigen Fraktionen (zumeist einer Fraktion).
4. Weitere Reinigung über Gelfiltrationssäule

Bis dato wurde die Aktivität auf wenige Proteinbanden im denaturierendem Gel eingengt. Die weiteren Schritte sehen jetzt eine N-terminale Ansequenzierung von 4-5 Proteinbanden vor und das Ableiten von degenerierten Oligonukleotiden mit dem Ziel das korrespondierende DNA-Fragment auf diese Weise zu identifizieren.

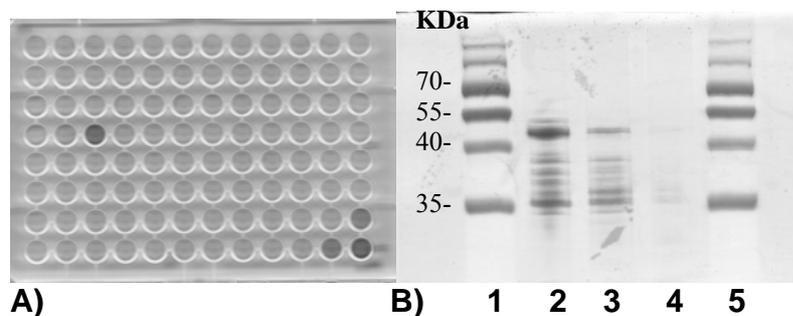


Abb. 7. **A)** Aktive Fraktion nach Reinigung über Gelfiltration in Position 39 in Mikrotiterrest; positive Kontrollen unten rechts; und **B)** SDS-Page von aktiven Fraktion in Spur **3** und **4**. Spur **2**, nicht aktive Fraktion

Alle Tests mit nativem Protein zeigen, dass die Hauptaktivität einem Protein mit einer molekularen Masse von über 30 kDa zukommt. Eine weitere Eingrenzung zeigte, dass es sich um ein Protein mit einer molekularen Masse von 35-42 kDa handeln musste.

Parallel zu diesen Arbeiten haben wir in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik Kiel eine vollständige Genomsequenzierung des E-Isolates initiiert. Dabei stellte sich dann heraus, dass der Organismus eine eigene Spezies darstellt und zur Gattung *Variovorax* einzuordnen ist. Der G+C-Gehalt liegt bei nahezu 68 % und ist somit recht hoch. Zudem erklärt dies auch, warum weder in der Comidbank in *E. coli* noch in der *small insert library* Aktivitäten gefunden wurden. Die Gesamtgenomgröße liegt bei ca. 6.2 Mb.

Die gesuchte Decarboxylase wurde letztendlich im Chromosom gefunden. Wir konnten das Gen für die Arylmalonsäure-Decarboxylase auf einem Contig von etwa 95 kb Größe lokalisieren. Das Gen (*amdA*) für die Arylmalonsäure-Decarboxylase liegt zusammen mit zwei anderen Genen, *amdB* und *amdC* in einem kleinen Operon. Die Ähnlichkeiten zur einzigen in der Datenbank vorhandenen bekannten anderen AMDase sind signifikant. Die Ähnlichkeit zur bekannten AmdA aus *Bordetella bronchiseptica* liegt bei 70 % und die Identität bei 54 % mit einem E-Wert von 2×10^{-65} über das gesamte Protein verteilt. Benachbart zum *amdA*-Gen wurden drei weitere Gene identifiziert, die vermutlich in Zusammenhang dazu stehen. Eines der Enzyme, *amdC*, kodiert für eine Mandelat-Racemase, eines für ein hypothetisches Protein (*amdB*) und bei *amdR* handelt es sich vermutlich um den dazugehörigen Regulator. Bis dato sind in den Genbanken keine ähnlich strukturierten Operons zu finden. Die beiden ORFs 1 und 2 (Abb.8) könnten ebenfalls in Zusammenhang zur Decarboxylasefunktion der *AmdA* stehen. Wir gehen auch davon aus, dass neben *AmdA* auch *AmdC*, die Racemase, Decarboxylaseaktivität aufweist. Dies ist mit der Biochemie der Racemasen begründet.

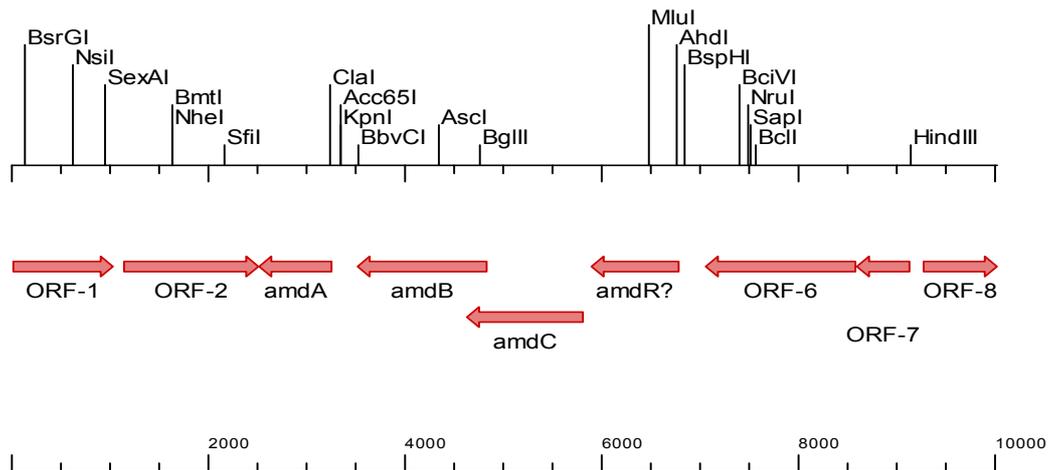


Abb. 8. 10 kb Ausschnitt aus Contig 295 der *Variovorax*-Genomsequenz (95.kb) mit den vermutlich vier Genen aus dem *amd*-Operon.

Derzeit laufende Arbeiten beschäftigen sich mit einer Überexpression der Proteine AmdA und AmdC und einer biochemischen Charakterisierung, um letztendlich eine kommerzielle Nutzung zu ermöglichen. Eine Expression in *E. coli* ist aufgrund des hohen GC-Gehaltes leider jedoch sehr aufwendig und mühsam. Diese Arbeiten werden jetzt jedoch kostenneutral im Rahmen von Diplomarbeiten fortgeführt. Die Hauptfragestellung, neue Decarboxylasegene zu identifizieren, wurde somit im Rahmen der Laufzeit des Projektes erfüllt.

Die Genomsequenzierung hat zudem gezeigt, dass in dem Isolat noch eine Reihe zusätzlicher Decarboxylasen kodiert sind, die in hohem Maße für die Biotechnologie interessant sind.

2. Aminosäure-Decarboxylasen

2.1 Synthese einer Lysin-Decarboxylase aus *Selenomonas ruminatum* und einer Histidin-Decarboxylase aus *Enterobacter aerogenes*

Um bei der Assayentwicklung zur Identifizierung von Aminosäure-Decarboxylasen Positivkontrollen zur Verfügung zu haben, sollten Vertreter dieser Enzymklassen zur Verfügung stehen. Deshalb wurden zwei Enzyme mit bekannten Substratspektren und hohen Umsatzraten ausgewählt, die Lysin-Decarboxylase aus *Selenomonas ruminatum* (2) und die Histidin-Decarboxylase aus *Enterobacter aerogenes* (3). Beide Enzyme wurden von der Firma BioSpring synthetisiert, wobei die Codon-usage

für die Expression in *E. coli* optimiert wurde. Beide Gene wurden in den Überexpressionsvektor pBADHisA (Invitrogen) unter die Kontrolle eines Arabinosepromotors kloniert. Die Optimierung der Gensequenzen, die eigentliche Synthese der Gene, sowie die Klonierung der erhaltenen Zielgene in den sehr gut regulierbaren *E. coli*-Expressionsvektor pBAD (Firma Invitrogen) wurde von der Firma BioSpring durchgeführt. Für die Totalsynthese der beiden Gene wurden terminal modifizierte Oligonukleotide hergestellt und über sequenzielle Ligation zum Zielgen vervollständigt. Die Überprüfung der erhaltenen Gene erfolgte durch beidseitige Sequenzierung des Plasmides. Anschließend wurden die Sequenzverifizierten Plasmide den anderen Projektteilnehmern zur Verfügung gestellt.

2.2 Assay-Etablierung

In Analogie zum Assaysystem zur Detektion von Malonsäuredecarboxylasen (s. Kap. 1.1 und 1.4) sollte ein Hochdurchsatz-Screening zur Durchmusterung von Metagenombanken nach Aminosäuredecarboxylasen etabliert werden. Hierbei dienen die Gene der Lysin-Decarboxylase aus *Selenomonas ruminatum* und der Histidin-Decarboxylase aus *Enterobacter aerogenes* exprimiert in *E. coli* als Positivkontrollen. Im Mikrotiterformat sollte der Zellaufschluss zunächst durch einen Lysispuffer durchgeführt werden. Dabei sollte der Puffer effizient Zellen lysieren, ohne jedoch die jeweiligen Enzyme zu inaktivieren. Als beste Alternative erwies sich ein Puffer mit 10mM Tris, 1mM EDTA, 100mM NaCl und 1mg/ml Lysozym. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer wurden 50 µl Überstand in den Assay mit Bromthymolblau oder Naphtolphtalein als pH-Indikator eingesetzt. Sowohl die Histidin-Decarboxylase aus *Enterobacter aerogenes* als auch in schwächerem Maße die Lysin-Decarboxylase aus *Selenomonas ruminatum* zeigten eine deutliche Aktivität, während Negativkontrollen (*E. coli* mit entsprechendem Leervektor) keinen Farbumschlag zeigten (ohne Abb.)

2.3 Screening einer Metagenombank nach Lysin- und Histidin-Decarboxylasen

Bereits vorhandene Metagenombibliotheken eines Biofilms (Durchschnittsinsertgröße 30 kb) und einer Bodenprobe (Durchschnittsinsertgröße 10 kb) wurden genutzt, um sie mit dem genannten Screeningverfahren nach Aminosäuredecarboxylasen zu durchmustern. Je Metagenombank wurden 1000 Klone untersucht, wobei etwa 20

Klone einen Farbumschlag zeigten. Nach einer Retransformation der entsprechenden Vektoren zeigte jedoch nur ein Klon (A2D3) eine reproduzierbare Aktivität gegenüber Lysin (Abb. 8).

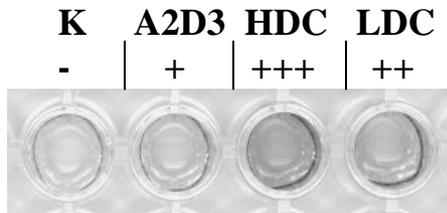


Abb. 9: pH-Shift Assay (Bromthymolblau als Indikator) zur Detektion von Aminosäure-Decarboxylasen. Aktive Zellen zeigen einen Farbumschlag von gelb nach blau (hell nach dunkel). Zur Verdeutlichung wurden die Farbumschläge durch Symbole von schwach (+) bis stark aktiv (+++) dokumentiert. K: Negativkontrolle, A2D3: Metagenomklon, HDC: Histidin-Decarboxylase, LDC: Lysin-Decarboxylase

Obwohl die induzierten und überexprimierten Kulturen mit den beiden bekannten Enzymen eine höhere Aktivität zeigten, war der Farbumschlag des uninduzierten Metagenomklons deutlich sichtbar. Eine Restriktionsanalyse zeigte, dass der identifizierte Klon A2D3 eine Insertgröße von ca. 35 kb besitzt.

2.4 Charakterisierung eines Metagenom-Klons mit Lysin-Decarboxylaseaktivität

Der gegenüber Lysin aktive Metagenomklon A2D3, sowie die klonierte Histidin- und Lysin Decarboxylase wurden mittels HPLC-Analyse auf die Umsetzung des entsprechenden Substrats getestet (Degussa, Abb. 10).

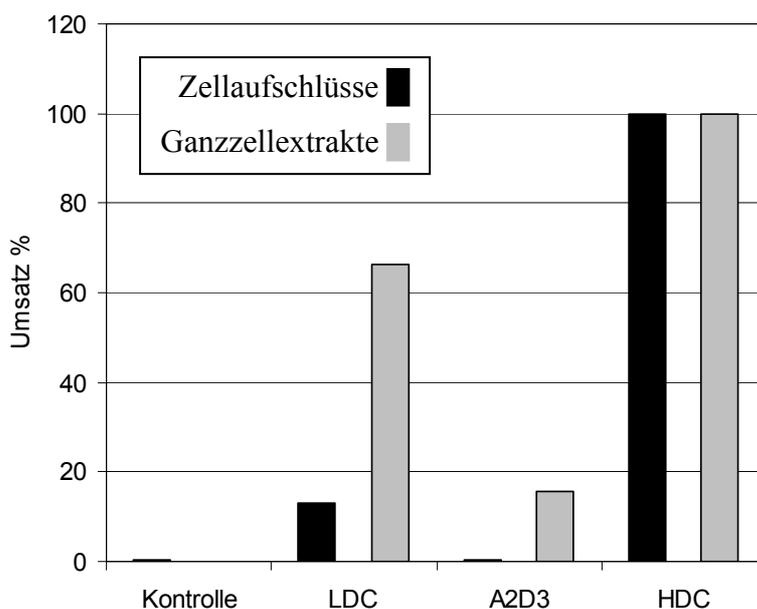


Abb. 10: HPLC Analyse von Aktivitätstests von Zellaufschlüssen und ganzen Zellen nach einer Inkubationsdauer von einem Tag. Hierbei wurden 20-100 mM Histidin bzw. Lysin eingesetzt und sowohl das jeweilige Substrat, als auch das Produkt detektiert. Kontrolle: *E. coli* mit pBADHisA, LDC: Lysin-Decarboxylase, A2D3: Metagenomklon, HDC: Histidin-Decarboxylase

Sowohl ganze Zellen, als auch durch Aufschlußpuffer lysierte Zellen von *E. coli* - Kulturen mit überexprimierter Histidin-Decarboxylase aus *Enterobacter aerogenes* zeigten einen Substratumsatz von 100 %. Die Umsatzraten der überexprimierten Lysin-Decarboxylase aus *Selenomonas ruminatum* waren geringer, wobei die Aktivität des Zellaufschlusses deutlich vermindert war. Der Zellaufschluß des Metagenomklons zeigte keine Aktivität, nur bei ganzen Zellen war ein deutlicher Umsatz meßbar. Allerdings konnte durch diesen Versuch tatsächlich gezeigt werden, dass der Metagenomklon A2D3 Lysin zu Cadaverin umsetzt und der pH-Shift durch diese Reaktion verursacht wird.

Im Rahmen einer laufenden Diplomarbeit wurde zudem eine weitere Lysindecaboxylase aus *Rhizobium* sp. isoliert, heterolog produziert und teilweise biochemisch charakterisiert.

Soll-/Ist Vergleich

Bisher wurden alle zeitlichen Zielvorgaben nahezu eingehalten. Geht man davon aus, dass für die beiden Universitätslabors insgesamt nur eine Postdocstelle für 18 Monate zur Verfügung stand, so ist die Bilanz sicher akzeptabel. Es ist uns gelungen, eine hochaktive Malonsäuredecarboxylase in *Variovorax* sp. zu identifizieren sowie vier weitere ähnliche Enzyme in noch nicht näher charakterisierten Organismen. Dabei sollte auch bedacht werden, dass es bis dato in den Datenbanken nur ein vergleichbares Enzym gibt und somit in kurzer Zeit durch unsere Arbeiten gezeigt wurde, dass ähnliche Enzyme in der Natur durchaus öfter zu finden sind. Es muss jedoch auch bedacht werden, dass eine TA im Labor der AG Streit ca. 6 Monate nur durch geschicktes Anreichern zu diesem Erfolg gelangt ist und zudem Proben weltweiter Herkunft hierzu Verwendung fanden. Darüber hinaus wurden in Metagenomscreens eine Lysindecaboxylase (A2D3) gefunden, die derzeit auch Gegenstand weiterer Untersuchungen ist. Für diese Versuche war es zudem notwendig, ein Screeningsystem zu entwickeln, so dass mit diesen Arbeiten auch erst nach der Etablierung eines Durchmusterungsverfahrens für Metagenombanken, begonnen werden konnte. Zudem wurde im Rahmen einer Diplomarbeit eine Lysindecaboxylase aus *Rhizobium* NGR 234 überexprimiert und teilweise charakterisiert.

In Bezug auf die heterologe Expression und biochemische Charakterisierung der Enzyme ist es letztendlich gelungen im Rahmen einer Kooperation mit dem Universitätsklinikum Kiel eine Genomsequenz von einem der Isolate zu etablieren und die neuen Decarboxylasen zu identifizieren.

Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen

Wirtschaftlichkeitsbetrachtungen in der Art, dass eine Firma mit der Erstellung einer Ökoeffizienzanalyse und oder Marktpotentialanalyse beauftragt wurde, wurden bis dato noch nicht durchgeführt, da zunächst abgewartet werden soll, bis rekombinante Proteine vorliegen und sich deren Eignung für eine Verwertung tatsächlich abzeichnet. In Bezug auf evt. konkurrierende enzymatische Verfahren ist jedoch nichts bekannt, so dass wir davon ausgehen, dass die Charakterisierung der identifizierten Proteine, in jedem Fall zu einer Verwertung führen wird. Wie bereits oben angeführt, gibt es zurzeit lediglich ein bekanntes Enzym, dass für die

Decarboxylierung von Malonsäuren eingesetzt werden kann. Zudem hat die Fa. Biospring das Verfahren zur Decarboxylierung von Arylmalonsäuren patentrechtlich schützen lassen. Es ist jedoch zu erwarten, dass eine stabile Decarboxylase mit einem breiten Substratspektrum ein nicht unerhebliches Marktpotential besitzt.

Diskussion

Ziel des Projektes war die Isolierung und biochemische Charakterisierung von Co-Faktor-unabhängigen Arylmalonsäure-Decarboxylasen und von ausgewählten Aminosäuredecarboxylasen. Zu Beginn des Projektes lag in den Datenbanken lediglich eine Co-Faktor-unabhängige AMDase aus *B. bronchisepticus* vor (GB # 728844). Wir haben es in der relativ kurzen Projektlaufzeit geschafft zumindest einen weiteren Organismus zu identifizieren, bei dem eine Co-Faktor-unabhängige Decarboxylase vorliegt (Tabelle 1 und Abb. 6,8). Die Co-Faktorunabhängigkeit wurde durch die in Abb. 6 durchgeführten Tests verifiziert. Darüber hinaus wurden vier weitere Organismen isoliert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit über derartige Enzyme verfügen. Allerdings sind die gemessenen Aktivitäten in diesen vier Organismen niedrig im Vergleich zu unserem ersten E-Isolat *Variovorax* sp. Überraschend ist die extrem hohe Aktivität in den Rohextrakten des *Variovorax*-Isolates im Vergleich zu allen anderen Isolaten und im Vergleich zur bekannten Decarboxylase aus *Bordetella bronchisepticus*. Aufgrund der hohen Aktivitäten im *Variovorax*-Isolat wurde zunächst damit begonnen, dieses Enzym zu charakterisieren. Diese Arbeiten sind jedoch aufgrund der nur geringen Fördersumme, die dem Hamburger und Jülicher Labor zur Verfügung standen noch nicht zum Abschluss gekommen. Immerhin ist es aber gelungen, die DNA-Sequenz zu ermitteln und erste Versuche zur Expression in *E. coli* durchzuführen.

Die beiden Aminosäuredecarboxylasen wurden ebenfalls heterolog exprimiert und werden derzeit noch abschließend charakterisiert. Von daher kann man davon ausgehen, dass eine Überexpression hier zügiger voranschreiten wird als bei der ausgewählten AMDase. Ausgehend von diesen Arbeiten wird es das Ziel der weiteren Arbeiten sein, das jeweilige Protein rekombinant zu produzieren um somit letztendlich eine weitere Verwertungsprüfung durchzuführen.

Kooperationen innerhalb des Projekts

Bisher haben alle Gruppen sehr intensiv miteinander kooperiert. Die Degussa AG hat vor allen Dingen die Arbeiten zu den Aminosäuredecarboxylasen unterstützt und die Fa. Biospring die Arbeiten zur Malonsäuredecarboxylase. Darüber hinaus haben die AGs Streit und Jaeger sehr gut kooperiert in Bezug auf die Etablierung der unterschiedlichen Durchmusterungsverfahren zur Isolierung der Decarboxylaseklone aus dem Metagenom und der Einzelorganismen. In den AGs Streit und Jaeger wurden die Arbeiten im Wesentlichen von Dr. Christian Leggewie durchgeführt. Zur weiteren Unterstützung wurden bisher 3 Diplomarbeiten zu der Thematik vergeben, davon eine in Jülich und 2 in Hamburg.

Darüber hinaus haben drei Projekttreffen mit allen Partnern stattgefunden (Sept. 05 und Juni 06 und Juni 07). Die Berichtprotokolle dazu können bei Bedarf an die DBU geleitet werden. Darüber hinaus haben mehrere bilaterale Treffen der Projektpartner an den diversen Orten stattgefunden.

Die Genomsequenzierung des *Variovorax* sp. HH01 Isolates wurde im Rahmen einer Kooperation mit dem IKB (AG Prof. Schreiber (Dr. Schilhabel) initiiert und hat letztendlich zur Identifizierung der *amdA-C* Gene geführt.

Literatur

(1) Ohta H., (1999) Biocatalytic asymmetric decarboxylation. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 63:1-20.

(2) Takatsuka Y., Yamaguchi Y., Ono M., Kamio Y. (2000) Gene cloning and molecular characterization of lysine decarboxylase from *Selenomonas ruminantium* delineate its evolutionary relationship to ornithine decarboxylases from eukaryotes. J. Bacteriol. 182:6732-6741.

(3) Kamath A.V., Vaaler G.L., Snell E.E. (1991) Pyridoxal phosphate-dependent histidine decarboxylases. Cloning, sequencing, and expression of genes from *Klebsiella planticola* and *Enterobacter aerogenes* and properties of the overexpressed enzymes. J. Biol. Chem. 266:9432-9437.

Präsentationen

Leggewie, C., Grooters, M., Kircher, M., Ayguen, H., Jaeger, K.-E., Streit, W.R. (2006) Isolation of novel decarboxylases for the production of double substituted acetic acid derivatives. Tagung Biocat, Hamburg, Germany, Posterpräsentation

Horn, S, Leggewie, C., Grooters, M., Kircher, M., Ayguen, H., Jaeger, K.-E., Streit, W.R. (2006) Isolation of novel decarboxylases for the production of double substituted acetic acid derivatives.

VAAM –Tagung 2007 und 2008

Biotechnika 2007

Streit, W; Dechema Jahrestagung 2007, Wiesbaden. Vortrag