

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung	1
1.1 Asymmetrische Synthese chiraler Pharmaka	1
1.2 Pharmazeutisch aktive chirale Alkoholverbindungen	2
1.3 Ephedrin	4
1.3.1 Ephedrin aus dem Ephedrakraut	4
1.3.2 Industrielle Herstellungsrouten von (–)-Ephedrin und (+)-Pseudoephedrin	5
1.3.3 Biokatalytische Strategien zu (R)- oder (S)-PAC Synthese	7
1.4 Alkoholdehydrogenasen (ADH)	14
1.4.1 Allgemeine Beschreibung der ADH	14
1.4.1.1 Langkettige Dehydrogenasen (LDR)	15
1.4.1.2 Mittelkettige Dehydrogenasen (MDR)	15
1.4.1.3 Kurzkettige Dehydrogenasen (SDR)	15
1.4.2 Industrielle Anwendung der Alkoholdehydrogenasen	18
1.5 Wege zu neuen Biokatalysatoren	21
1.5.1 Screening nach Enzymen aus Naturproben oder aus Stammsammlungen	21
1.5.2 Screening nach enzymatischen Aktivitäten aus dem Metagenom	22
1.5.3 Genomining innerhalb vorhandener Datenbanken nach dem Zielgen	22
1.5.4 Proteinengineering bekannter Biokatalysatoren	22
1.6 Problemstellung und Zielsetzung	24
2 Materialien und Methoden	28
2.1 Geräte	28
2.1.1 Allgemeine Geräte	28
2.1.2 Geräte zur Produktsynthese	28
2.1.3 Analytische Messgeräte	28
2.2 Chromatographiesäulen	29
2.3 Molekulare biotechnologische Kits	29
2.4 Chemikalien	30
2.4.1 Mediensalze und Pufferbestandteile	30
2.4.2 Substrate zur Biokatalyse	31
2.4.3 Organische Lösungsmittel	32
2.4.4 PAGE- und Proteinanalytik	32
2.5 Stämme	33
2.6 Oligonukleotide und Plasmide	33
2.7 Medien	35
2.7.1 Komplexmedien	35
2.7.2 Minimalsalzmedium	36

2.8 Mikrobiologische Methoden	37
2.8.1 <i>Arthrobacter</i> sp. TS-15 Stammisolierung	37
2.8.2 Kultivierung von <i>Arthrobacter</i> sp. TS-15	38
2.8.3 Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen	38
2.8.4 Rekombinante Proteinsynthese	39
2.8.5 Zellaufschluss von TS-15 und <i>E. coli</i>	40
2.9 Molekularbiologische Methoden	40
2.9.1 Plasmid Präparation	40
2.9.2 Genomische DNA Extraktion aus TS-15	41
2.9.3 RNA Isolierung aus TS-15 und Sequenzierung	42
2.9.4 Genisolierung, Restriktion und Klonierung	42
2.9.5 Transformation in <i>E. coli</i>	44
2.10 Proteinbiochemische Methoden	46
2.10.1 Quantifizierung der Proteinkonzentration	46
2.10.2 Proteinanreicherung aus dem Stamm TS-15	46
2.10.3 Reinigung rekombinanter Enzyme	48
3.10.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
3.10.5 SDS-PAGE Färbung	50
3.10.6 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Native-PAGE)	50
2.10.7 Aktivitätsbestimmung in Native-PAGE	52
2.10.8 Native-PAGE Färbung	53
2.11 Analytische Methoden	54
2.11.1 Der oxidative und reduktive Aktivitätsassay	54
2.11.2 Bestimmung der kinetischen Parameter	54
2.11.3 Extraktion der Reaktionsprodukte	55
2.11.4 Gaschromatographie (GC)	56
2.11.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	56
2.11.6 Bestimmung der optischen Drehwerte	58
2.11.7 GC-MS und ¹ H-NMR Messungen	58
2.12 Bioinformatische Methoden	59
2.12.1 Allgemeine bioinformatische Softwares	59
2.12.2 Evolutionsanalyse von TS-15	59
2.12.3 Genomanalyse	60
2.12.4 Modellierung und Ligand-Rezeptor Docking	61
3 Ergebnisse und Diskussion	62
3.1 <i>Arthrobacter</i> sp. TS-15	62
3.1.1 Stammisolierung	62
3.1.2 Genomisolierung und Analyse	67

3.1.3 Bakterieller Abbau von Ephedrinisomeren	72
3.2 Pseudoephedrin und Ephedrin Dehydrogenasen	78
3.2.1 Proteinisolierung und Identifikation einer neuen Dehydrogenase.....	78
3.2.2 Heterologe Genexpression der Dehydrogenasen.....	82
3.2.3 Funktion der neuen kurzkettigen Dehydrogenasen	83
3.2.4 Kinetik der Oxidation der Ephedrinisomere.....	84
3.3 Diskussion der mikrobiologischen Ergebnisse.....	87
3.3.1 <i>Arthrobacter</i> als Isolat aus Umweltproben.....	87
3.3.2 Morphologische Eigenschaften von TS-15	87
3.3.3 Optimierung des Minimalsalzmediums.....	88
3.3.3.1 Kanamycin-Resistenz bei TS-15	88
3.3.3.2 Diphosphat als zusätzliches Additiv.....	90
3.3.4 Herkunft des Ephedrin Genclusters.....	92
3.3.5 Ephedrin-Abbau	93
3.3.5.1 Einfluss der Isomerie von Ephedrin	93
3.3.5.2 Ein neuer metabolischer Weg von Ephedrin in TS-15	95
3.4 Biochemische Eigenschaften von PsdH und EDH	104
3.4.1 Substratspektrum	104
3.4.2 Kinetische Parameter.....	107
3.4.3 Enantioselektivität.....	109
3.4.4 Oligomerisierungsstatus von PsdH und EDH.....	114
3.4.5 Strukturaufklärung von PsdH	115
3.4.6 Temperaturoptimum der katalytischen Aktivität.....	118
3.4.7 pH-Optimum der katalytischen Aktivität	119
3.4.8 Temperaturoptimum der Enzymstabilität.....	120
3.4.9 pH-Optimum für die Enzymstabilität.....	121
3.4.10 Effekt von Metallionen und EDTA auf die katalytische Aktivität.....	122
3.4.11 Effekt der Ionenstärke des Reaktionspuffers auf die katalytische Aktivität.....	122
3.5 Diskussion der molekular biotechnologischen Ergebnisse.....	124
3.5.1 Spezifische Aktivitäten und Substratspektrum.....	124
3.5.2 Stereoselektivität	126
3.5.3 Strukturelle Untersuchungen anhand Kristallstruktur und Homologiemodell	131
3.5.4 Cofaktor Spezifität.....	132
3.5.5 Cofaktor Bindung und Konformationsänderung	132
3.5.6 Strukturelle Analyse des aktiven Zentrums.....	133
3.5.7 Sequenzanalyse des Motivs GPXXXXPG	135
3.5.8 Temperatureinfluss auf Aktivität und Stabilität	137
3.5.9 Einfluss des pH-Werts auf Aktivität und Stabilität	138

3.5.10 Einfluss der Ionenstärke	139
3.6 Einsetzbarkeit von PseDH und EDH für die industrielle Anwendung.....	142
3.6.1 Synthese von (<i>S</i>)-/(<i>R</i>)-PAC im Ganzzellsystem.....	142
3.6.2 Stabilität von PseDH und EDH im Zweiphasensystem.....	146
Ausblick	148
Anhang	150
4 Literaturverzeichnis	154
Liste der Publikationen	174
Eidesstattliche Erklärung	175