

1. EINLEITUNG

Etherverbindungen sind ubiquitär in der Biosphäre verbreitet und sind entweder natürlichen oder anthropogenen Ursprungs. Zu den xenobiotischen Etherverbindungen gehören vor allem Agrochemikalien, wie Fungizide, Herbizide und Insektizide, und Detergenzien. Etherverbindungen werden aber auch im großen Maßstab in der Industrie eingesetzt, z.B. als Lösungsmittel, Schmiermittel, Antifrostmittel sowie in pharmazeutischen und kosmetischen Präparaten (WHITE *et al.*, 1996). Damit gelangen diese Verbindungen auch in die Umwelt. Da Etherverbindungen meist biologisch schwer abbaubar und oftmals toxische Substanzen sind, kann der erhöhte Eintrag in die Umwelt zu ernsthaften Störungen des ökologischen Gleichgewichts führen. Aufgrund dessen ist eine biologische oder technische Entsorgung dieser Substanzen dringend notwendig.

Ether sind aufgrund der Stabilität der C–O–C–Bindung relativ reaktionsträge Substanzen und erfordern zur chemischen Spaltung drastische Bedingungen wie konzentrierte Säuren und hohe Temperaturen (WHITE *et al.*, 1996; MO *et al.*, 1997). Der biologische Abbau von umweltrelevanten Verbindungen durch Mikroorganismen spielt eine bedeutende Rolle (VAN DER MEER *et al.*, 1992). Mikroorganismen sind in der Lage, xenobiotische, toxische Substanzen vollständig zu Kohlendioxid und Wasser zu metabolisieren, und somit das biologische Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. Über den mikrobiellen Abbau von Etherverbindungen ist bisher relativ wenig bekannt. Auch hier ist die Stabilität der Etherbindung das entscheidende Problem. Eine Labilisierung der C–O–C–Bindung kann durch Hydroxylierung eines Kohlenstoff–Atoms in Nachbarschaft zum Sauerstoff–Atom erfolgen. Das so entstandene Halbacetal ist instabil und wird spontan zum entsprechenden Alkohol und Aldehyd hydrolysiert (WHITE *et al.*, 1996). Diese Hydroxylierungsreaktion wird unter aeroben Bedingungen durch Oxygenasen katalysiert. Beispiele für solche Oxygenasen sind die 4–Methoxybenzoat–Demethylase aus *Pseudomonas putida* (BERNHARDT *et al.*, 1975), die Vanillat–Demethylase aus *Pseudomonas* sp. (BRUNEL und DAVISON, 1988) sowie die Veratrol, 2–Ethoxyphenol, 4–Methoxybenzoat und 7–Ethoxycoumarin umsetzenden P450–abhängigen Monooxygenasen (SUTHERLAND, 1986; TROWER *et al.*, 1989; KARLSON *et al.*, 1993). Weiterhin wird eine Oxidation von Dimethylether durch die Methan–Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) (STIRLING und DALTON, 1980), von Diethylether durch die Toluol–2–Monooxygenase aus *Burkholderia cepacia* G4/PR1 (HUR *et al.*, 1997) und von Dimethylether durch die Ammonium–Monooxygenase aus *Nitrosomonas europaea* (HYMAN *et al.*, 1994) beschrieben.

Unter anaeroben Bedingungen kann die Bildung eines Halbacetals und die Spaltung der Etherbindung durch Umlagerung einer vorhandenen Hydroxylgruppe im Substrat erfolgen, wenn der Ether aus einer C₂-Verbindung aufgebaut ist (WHITE *et al.*, 1996). Ein solcher Coenzym B₁₂-abhängiger Hydroxyl-Shift findet beispielsweise beim anaeroben Abbau von Polyethylenglykol und Phenoxyethanol statt (FRINGS und SCHINK, 1994). Methoxy-Verbindungen werden dagegen unter anaeroben Bedingungen durch O-Demethylasen gespalten. Diese katalysieren einen Transfer der Methylgruppe vom Substrat über ein Corrinoid-Protein (primärer Methylgruppen-Akzeptor) auf Tetrahydrofolat (sekundärer Methylgruppen-Akzeptor) (KREFT und SCHINK, 1993; KAUFMANN *et al.*, 1997).

Die Oxygenasen werden grundsätzlich in Di- und Monooxygenasen unterteilt. Während bei Dioxygenase-Reaktionen beide Atome des molekularen Sauerstoffs in das Produkt eingehen, inkorporieren Monooxygenasen nur ein Sauerstoffatom in das Substrat, das zweite wird zu Wasser reduziert (HARAYAMA *et al.*, 1992). Oxygenasen können aus einer oder mehreren Komponenten aufgebaut sein. Einkomponenten-Monooxygenasen sind immer Flavoenzyme, bei denen die Hydroxylierungsreaktion am gebundenen Flavin stattfindet (HARAYAMA *et al.*, 1992). Nicht alle Substrate, wie z.B. Dimethylstyrol, Enamine und Enoether, können so hinreichend aktiviert werden (WALSH und CHEN, 1988). Der bekannteste Vertreter dieser Enzymgruppe ist die *p*-Hydroxybenzoat-Hydroxylase aus *Pseudomonas fluorescens* (SCHREUDER *et al.*, 1990; PALFEY *et al.*, 1999). In jüngster Zeit wurde eine weitere Klasse der flavinabhängigen Monooxygenasen beschrieben, die nun als TC-FDM (*two-component flavin-diffusible monooxygenase*) bezeichnet werden sollen (GALAN *et al.*, 2000). Diese bestehen aus einer Reduktase- und Oxygenase-Komponente. Beide Komponenten enthalten Flavin nicht als prosthetische Gruppe, sondern als „lose“ gebundenes Coenzym. Das für die Monooxygenaseaktivität essentielle Flavin wird von der Reduktase reduziert und dann von der Oxygenase-Komponente zur Hydroxylierungsreaktion genutzt (GALAN *et al.*, 2000). Beispiele für Monooxygenasen der TC-FDM-Familie sind die Pyrrol-2-Monooxygenase aus *Rhodococcus* sp. (BECKER *et al.*, 1997), die 4-Hydroxyphenylacetat-3-Hydroxylase aus *Klebsiella pneumoniae* M5a1 (GIBELLO *et al.*, 1997), die Styren-Monooxygenase aus *Pseudomonas putida* Y2 (VELASCO *et al.*, 1998) und die 4-Hydroxyphenylacetat-3-Hydroxylase aus *E. coli* W (GALAN *et al.*, 2000).

Neben den flavinabhängigen Enzymen gibt es die eisenhaltigen Mehrkomponenten-Monooxygenasen, bei denen die Aktivierung des molekularen Sauerstoffs am Übergangsmetall erfolgt (HARAYAMA *et al.*, 1992). Man unterscheidet Nicht-Häm Eisen Oxygenasen mit einem mononuklearen (BATIE *et al.*, 1991) oder binuklearen Eisenzentrum (FOX *et al.*, 1994; SHANKLIN *et al.*, 1994) und Cytochrom P450-abhängige Enzyme mit

einem Häm-Kofaktor (MUNRO und LINDSAY, 1996). Alle diese Mehrkomponenten-Oxygenasen enthalten neben der eigentlichen Oxygenase-Komponente ein Elektronentransportsystem, das für den Transfer der Elektronen von NAD(P)H auf die terminale Oxygenase-Komponente sorgt (HARAYAMA *et al.*, 1992).

Die Einteilung der Mehrkomponenten-Monooxygenasen mit einem mononuklearen Nicht-Häm Eisen im katalytischen Zentrum erfolgt nach der Anzahl der Elektronentransport-Komponenten sowie deren Kofaktoren (BATIE *et al.*, 1991). Klasse I sind die Zweikomponenten-Oxygenasen, deren Reduktase-Komponenten ein Chloroplasten-Typ [2Fe-2S]-Cluster und als Elektronentransfer-vermittelnder Kofaktor ein FMN (Klasse IA) oder FAD (Klasse IB) besitzen. Bei den Enzymen der Klasse II (Dreikomponenten-Monooxygenasen) befindet sich der Flavinkofaktor (immer FAD) und das Fe/S-Cluster vom Chloroplasten-Typ (Klasse IIA) oder vom Rieske-Typ (Klasse IIB) auf zwei verschiedenen Protein-Komponenten. Die Enzyme der Klasse III sind ebenfalls Dreikomponenten-Monooxygenasen. Das Elektronentransportsystem besteht wie beim Typ IB aus einer Reduktase mit FAD und einem Chloroplasten-Typ [2Fe-2S]-Cluster und aus einer zusätzlichen Ferredoxin-Proteinkomponente mit einem Rieske-Typ [2Fe-2S]-Cluster. Der Transfer der Elektronen erfolgt vom NAD(P)H über den Flavin-Kofaktor auf die [2Fe-2S]-Zentren, die dann die eigentliche Oxygenase-Komponente reduzieren (MASON und CAMMACK, 1992).

Die Mehrkomponenten-Monooxygenasen, bei denen die Katalyse an einem binuklearen Eisenzentrum erfolgt, werden aufgrund der unterschiedlichen Eisenkomplexierung im katalytischen Zentrum in zwei Klassen eingeteilt (FOX *et al.*, 1994; SHANKLIN *et al.*, 1994). Während bei den löslichen Mehrkomponenten-Monooxygenasen mit binuklearem Eisenzentrum die Eisenatome durch zwei Histidin- und vier Glutamatreste im aktiven Zentrum fixiert werden (LIPSCOMB, 1994), benötigen die Membran-assoziierten Enzyme acht Histidinreste (SHANKLIN *et al.*, 1994; SHANKLIN *et al.*, 1997). Die löslichen Mehrkomponenten-Monooxygenasen, die eine Hydroxylierung und/oder Epoxidation des Substrates katalysieren, sind meist Dreikomponenten-Enzyme, die aus einer NAD(P)H-Akzeptor-Reduktase, einer komplex aufgebauten Oxygenase und einem Kopplungsprotein (bisher nur in dieser Enzymklasse identifiziert) ohne redoxaktiven Zentren bestehen. Die am besten untersuchten Enzyme dieser Klasse sind die lösliche Methan-Monooxygenase aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) und aus *Methylosinus trichosporium* OB3b (zur Übersicht: LIPSCOMB, 1994; MURRELL *et al.*, 2000; WESTERHEIDE *et al.*, 2000). Weitere Vertreter sind die Alken-Monooxygenase aus *Rhodococcus rhodochrous* B-276 (SAEKI und FURUHASHI, 1994) und die Phenol-Hydroxylase aus *Pseudomonas putida* Stamm H

(HERRMANN *et al.*, 1995). In der Literatur werden aber auch Vierkomponenten-Monooxygenasen beschrieben, bei denen am Elektronentransport noch eine zusätzliche [2Fe–2S]–Ferredoxin–Komponente beteiligt ist. Beispiele dafür sind die Toluol–4–Monooxygenase aus *Pseudomonas mendocina* KR1 (PIKUS *et al.*, 1996), die Alken–Monooxygenase aus *Xanthobacter* Stamm Py2 (ZHOU *et al.*, 1999) und die Isopren–Monooxygenase aus *Rhodococcus* sp. Stamm AD45 (VAN HYLCKAMA VLIEG *et al.*, 2000). Die Membran–assozierten Mehrkomponenten–Monooxygenasen mit binuklearem Eisenzentrum sind wie folgt aufgebaut: aus zwei Komponenten, wie beispielsweise die Xylen–Monooxygenase (XylA: Reduktase, XylM: Membran–gebundene Hydroxylase–Komponente) aus *Pseudomonas putida* (SUZUKI *et al.*, 1991), oder aus drei Komponenten, wie z.B. die Alkan–Hydroxylase (AlkB: Membran–gebundene Hydroxylase–Komponente, AlkT: NADH–Rubredoxin–Reduktase; AlkG: Rubredoxin) aus *Pseudomonas oleovorans* (SHANKLIN *et al.*, 1997).

Die bakteriellen Cytochrom P450–abhängigen Monooxygenasen sind lösliche Proteine (HARAYAMA *et al.*, 1992) und bestehen meist aus drei Komponenten: einer Flavin–enthaltenden Reduktase, einem Eisen/Schwefel–Protein und dem Cytochrom P450 mit einem Häm–Kofaktor, an dem die Aktivierung des Sauerstoffs und dann die Substrathydroxylierung stattfindet (MUNRO und LINDSAY, 1996). Das Cytochrom P450 ist ein b–Typ Cytochrom, das ein Eisen–Protoporphyrin IX als prosthetische Gruppe enthält und über das Thiolat des Cysteins am Enzym gebunden ist (SARIASLANI, 1991). P450–abhängige Enzyme sind oftmals am Abbau von xenobiotischen Verbindungen beteiligt (SIELAFF *et al.*, 2001), unter anderem auch – wie bereits erwähnt – am Abbau von Etherverbindungen.

Tetrahydrofuran (THF), dessen Abbau in dieser Arbeit untersucht wurde, ist ein gut wasserlöslicher, leicht flüchtiger, zyklischer Ether. Aufgrund seiner hohen Lösungskraft wird THF in der Industrie im großen Maßstab eingesetzt, z.B. bei der Produktion von Farben, Klebstoffen, Polystyrol, Polyurethan und Polyvinylchlorid (FALBE und REGITZ, 1992). Aufgrund der genannten Eigenschaften und dem breiten Anwendungsspektrum in der chemischen Industrie kann THF die Umwelt stark belasten. Zunächst galt THF als biologisch nicht abbaubar. Die ersten Hinweise auf die Existenz von THF–abbauenden Mikroorganismen kamen durch die Arbeiten von DMITRENKO *et al.* (1987) und GVOZDYAK *et al.* (1988). Von BERNHARDT und DIEKMANN (1991) wurde erstmals ein THF–abbauendes Bakterium in Reinkultur isoliert, das der Gattung *Rhodococcus* zugeordnet wurde. Dieser *Rhodococcus ruber* Stamm 219 zeigte ein Wachstum nur bei THF–Konzentrationen unter 10 mM. Die Fähigkeit des THF–Abbaus wurde auch für einen

1,4-Dioxan-abbauenden Actinomyceten (PARALES *et al.*, 1994) und für das Morpholin-abbauende *Mycobacterium* sp. Stamm RP1 (POUPIN *et al.*, 1998) beschrieben. Alle bisher beschriebenen THF-Abbauer können jedoch nur geringe THF-Konzentrationen tolerieren und zeigen ein sehr langsames Wachstum auf diesem Substrat. Der von KOHLWEYER *et al.* (2000) aus einer Abwasserprobe isolierte THF-abbauende *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 kann dagegen auf THF bis zu einer Konzentration von 70 mM wachsen und hat unter optimalen Bedingungen eine Generationszeit von 11 h. Auffallend ist, daß alle bisher beschriebenen THF-abbauenden Bakterien-Stämme vom Gram-positiven Zelltyp sind. Die Tolerierung und Adaptation an THF ist offensichtlich nur bei einer eng begrenzten Mikroorganismengruppe möglich. Organische Lösungsmittel können zur Zerstörung von biologischen Membranen führen (ISKEN *et al.*, 1999). Die komplex aufgebaute Zellwand der Gram-positiven Bakterien könnte als möglicher „Schutzwall“ dienen und so zur Tolerierung des Lösungsmittels beitragen. Für verschiedene Actinomyceten wurde gezeigt, daß unter Lösungsmittelstreß Veränderungen in der zellulären Fettsäurezusammensetzung auftreten, und man geht davon aus, daß diese auch im Zusammenhang mit dem Schutz vor Lösungsmitteln stehen (TSITKO *et al.*, 1999). Für eine Erniedrigung der Lösungsmittelkonzentration in der Zelle können Efflux-Systeme sorgen (KIEBOOM *et al.*, 1998).

Über den Abbauweg des THF's ist bisher wenig bekannt. Der von BERNHARDT und DIEKMANN (1991) isolierte *Rhodococcus ruber* Stamm 219 kann neben THF, γ -Butyrolacton, 1,4-Butandiol und Succinat umsetzen. Anhand dieses Substratspektrums wurde folgender möglicher Abbauweg postuliert (Abb. 1).

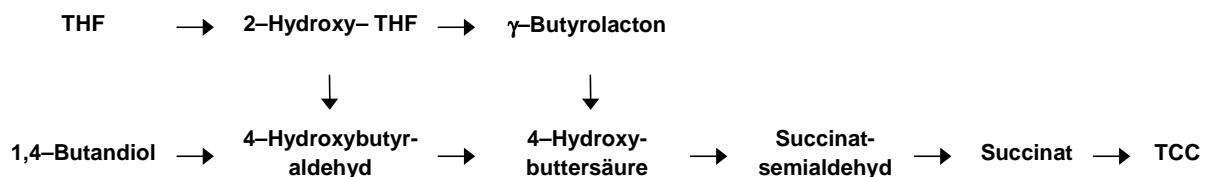


Abbildung 1 : Postulierter THF-Abbauweg (BERNHARDT und DIEKMANN, 1991).

Aus den Arbeiten von BOCK *et al.* (1996) und SPALLEK (1998) ergaben sich Hinweise, daß als einleitender Schritt beim THF-Abbau eine Hydroxylierung am C2-Atom des THF's erfolgt, die zur Bildung eines Halbacetals führt. Für die Umsetzung des dann entstehenden 2-Hydroxy-THF's werden zwei Möglichkeiten postuliert, aber entsprechende Intermediate konnten bisher nicht nachgewiesen werden. 2-Hydroxy-THF könnte zum einen durch

spontane hydrolytische Ringöffnung in 4-Hydroxybutyraldehyd überführt werden, wobei danach die Aldehydgruppe zu 4-Hydroxybuttersäure oxidiert wird, oder 2-Hydroxy-THF wird über eine Alkohol-Dehydrogenase weiter zu γ -Butyrolacton oxidiert, aus dem nach hydrolytischer Ringöffnung ebenfalls 4-Hydroxybuttersäure entstehen könnte. Nach weiterer Oxidation der Alkoholgruppe von 4-Hydroxybuttersäure zu Succinatsemialdehyd und der Aldehydgruppe zu Succinat wäre der Anschluß zum Tricarbonsäurezyklus gegeben. In dieses Abbauschema fügt sich auch der mögliche Abbau von 1,4-Butandiol problemlos ein, das ein Substrat von *R. ruber* und von *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 ist. Bereits nach Oxidation von 1,4-Butandiol zu 4-Hydroxybutyraldehyd durch eine Alkohol-Dehydrogenase könnte der Abbau nach dem skizzierten THF-Abbauweg erfolgen. Über die am Abbau von THF und 1,4-Butandiol beteiligten Enzyme lagen zu Beginn der Arbeit keinerlei vertieften Informationen vor. Untersuchungen von BOCK (1994) und SPALLEK (1998) mit *R. ruber* Stamm 219 zeigten, daß eine sehr instabile Monooxygenase für den initialen Angriff von THF verantwortlich sein könnte.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, das einleitende Enzym beim THF-Abbau in *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 zu identifizieren und zu charakterisieren. Sowohl in ganzen als auch in permeabilisierten, THF-gewachsenen Zellen war ein THF-abhängiger Sauerstoffverbrauch meßbar, der darauf hinwies, daß die einleitende Reaktion durch eine Monooxygenase katalysiert wird (KOHLWEYER, 2000). Problematisch war jedoch, daß nach Aufschluß der Zellen keine substratabhängige Reaktion mehr meßbar war, so daß das entsprechende Enzym nicht über eine Aktivitätsmessung aufgereinigt und charakterisiert werden konnte. In der vorliegenden Arbeit mußte eine neue Strategie entwickelt werden, um die postulierte THF-induzierte Monooxygenase zu identifizieren. Da viele Oxygenasen – wie bereits erwähnt – eine separate Reduktase-Komponente besitzen, könnte durch Vergleich der Reduktaseaktivitäten in THF- und Succinat-gewachsenen Zellen eine durch THF spezifisch induzierte Reduktase nachgewiesen werden. Nach Aufreinigung und N-terminaler Aminosäurebestimmung der THF-induzierten Reduktase sollte es möglich sein, deren Gen mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden zu identifizieren. Da die Strukturgene von Mehrkomponenten-Monooxygenasen meist in einem Gencluster vorliegen, könnten Informationen über weitere Komponenten durch Analyse der dem Gen der Reduktase benachbarten Regionen erhalten werden. Die THF-induzierte Transkription der identifizierten Gene kann dann durch Northern-Hybridisierungen gezeigt werden.

Da die Enzyme kataboler StoffwechsellLeistungen oftmals durch extrachromosomale DNA – zirkuläre oder lineare Plasmide – kodiert sind (SAYLER *et al.*, 1990; MEINHARDT *et al.*, 1997), wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Frage nach der Lokalisation der Gene, die für Enzyme des THF–Katabolismus kodieren, nachgegangen, zumal THF als Komponente von Naturstoffen kaum bekannt ist. Somit könnte die Befähigung der Etherspaltung durch *Pseudonocardia* sp. Stamm K1 durch Anpassung von vorhandenen Enzymen oder durch lateralen Gentransfer erworben worden sein. Der Abbau der danach wahrscheinlich entstehenden Intermediate beim THF–Abbau ist dagegen weniger problematisch, da diese natürlich vorkommende Substanzen sind.