

Untersuchungen zu einem neuartigen  
Abbaupfad der 1,5-Anhydro-D-fructose  
in Rhizobien an dem Modellorganismus  
*Sinorhizobium meliloti* 1021,  
Klonierung und Charakterisierung der  
beteiligten Enzymsysteme.

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von  
Beata Stosik  
Saarbrücken  
2008

Tag des Kolloquiums: 05.12.2008

Dekan: PROF. DR. ULI MÜLLER

Prüfungsausschuss: PROF. DR. MANFRED J. SCHMITT (1. Berichterstatter)

PROF. DR. FRIEDRICH GIFFHORN (2. Berichterstatter)

PROF. DR. ROLF MÜLLER (Vorsitzender)

DR. FRANK BREINIG

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2004 bis September 2008 am Institut für Angewandte Mikrobiologie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

## Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Friedrich Giffhorn für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die ständige Bereitschaft zu Diskussionen und den außerordentlichen Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Ich möchte mich bei ihm auch für die persönliche Aufmerksamkeit bedanken. Durch seine Fürsorge, habe ich auch Unterstützung außerhalb des Arbeitsbereiches erhalten, was in einem neuen Umfeld sehr von Bedeutung ist.

Bei Herrn Prof. Manfred Schmitt bedanke ich mich für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, für das große Interesse an der Entstehung dieser Arbeit und für die Unterstützung.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Angewandte Mikrobiologie an der Universität des Saarlandes möchte ich ganz herzlich für die tolle Zusammenarbeit und ausgezeichnete Atmosphäre danken: Dr. Gert-Wieland Kohring für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei allen auftretenden Problemen, die vielen wertvollen Ratschläge und objektiven Anregungen. Carmen Clemens für die sehr gute Zusammenarbeit und die stetige Unterstützung. Birgit Hasper und Herrn Klaus Witte für die tatkräftige Unterstützung bei den mikrobiologischen, enzymatischen und chromatographischen Arbeiten und für die unterhaltsamen Gespräche. Dr. Annette Kühn für die Einführung in das Thema und die Unterstützung in den ersten Monaten meiner Arbeit. Dr. Sabine Bastian und Dr. Christian Zimmer für die Hilfsbereitschaft bei den praktischen Arbeiten und die zahlreichen Diskussionen bei den auftretenden Problemen. Petra Kornberger für das angenehme Arbeitsklima und ihre freundliche Art. Nicole Jundel für ihre Hilfsbereitschaft bei den organisatorischen und bürokratischen Fragen, für ihre liebevolle Art und vor allem für ihre Unterstützung im Dienstlichen und Privaten.

Ein besonders herzlicher Dank gilt Susanne Dorscheid, in der ich eine tolle Freundin gewonnen habe, die mich in den guten und in den schlechten Zeiten mit Rat und Tat unterstützt hat und die immer bereit war, über die auftretenden Probleme mit mir zu diskutieren. Ebenfalls bedanke ich mich bei Martina Pitz, die mit mir und Susanne den Schreibraum geteilt hat und mir direkt ans Herz gewachsen ist. Mit ihren Lachen und der liebevollen Art haben die beiden meine Zeit hier sehr unterhaltsam und

schön gemacht. Ich werde euch beiden im Herzen behalten. Ein großer Dank an Euch beiden auch für die geduldige Korrektur dieser Arbeit.

Dank Euch allen habe ich mich in der für mich neuen Umgebung direkt wohl gefühlt, was den Anfang deutlich einfacher und angenehmer machte. Ich werde immer sehr gerne an die Zeit der Promotion und an Euch denken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten Marc Lind bedanken. Seine Liebe, bedingungslose Unterstützung, stetige Motivierung, außerordentliche Hilfsbereitschaft, die vielen Ideen, grenzenlose Geduld und das Verständnis, die zahlreichen Gespräche und Diskussionen haben den größten Beitrag zur Entstehung dieser Arbeit geleistet. Danke, dass Du da bist.

Ein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt meinen Eltern, Miroslawa und Michal Stosik. Dafür, dass sie immer für mich da sind, dass sie mich in allen Lebenslagen bedingungslos unterstützen und dass sie immer an mich glauben. Ihr habt mir ermöglicht, diesen Weg zu gehen und dafür bedanke ich mich bei Euch von ganzem Herzen.

Ich bedanke mich auch bei Dr. Frank Breinig, Björn Diehl und Esther Gießelmann für die angenehmen Gesprächen, unterhaltsamen Mittagspausen und die schöne Zeit.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1	1,5-Anhydro-D-fructose in biologischen Systemen	1
2	1,5-Anhydro-D-hexitole in biologischen Systemen	7
3	1,5-Anhydro-D-fructose-Weg in Rhizobien	9
4	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	11
5	Cytochrome P450	12
6	Zielsetzungen	15
<b>II</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
1	Organismen, Vektoren, Plasmide und Primer	17
2	Nährmedien	22
3	Puffer und Lösungen	25
3.1	DNA-Isolierung	25
3.2	Agarose-Gelelektrophorese	26
3.3	DNA-Sequenzanalyse	26
3.4	Zellaufschluss	27
3.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
3.6	Isoelektrische Fokussierung	28
3.7	Western Blot	29
3.8	Proteinanreicherung	30
3.9	Proteinbestimmung nach Pierce	30
3.10	Aktivitätstests	30
3.11	MALDI-TOF MS	31
3.12	Lösungen für Bestimmung des pH-Optimums	31
3.13	Antibiotika und andere Medienzusätze	32
4	Enzyme und Chemikalien	32
5	Kultivierung und Lagerung	34
6	Gentechnische Standardmethoden	36
6.1	Isolierung der genomischen DNA aus Rhizobien	36
6.2	Isolierung der genomischen DNA aus <i>Pseudomonas putida</i>	37
6.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und <i>P. putida</i>	37
6.4	Restriktionsspaltung der DNA	38

6.5	Agarose-Gelelektrophorese	38
6.6	Reisolierung von DNA-Fragmenten aus den Agarosegelen	39
6.7	Bestimmung der DNA-Konzentration	40
6.8	DNA-Fällung	40
6.9	Klonierung von PCR-Amplifikaten	41
6.9.1	TOPO-TA Cloning®	41
6.9.2	Ligation	41
6.10	Herstellung von elektrokompenten <i>E. coli</i> -Zellen	42
6.11	Transformation	43
6.11.1	Transformation durch Elektroporation	43
6.11.2	Transformation durch Hitzeschock	43
6.11.3	<i>Colony</i> -PCR	44
6.12	DNA-Sequenzierung	46
6.12.1	Sequenzierungs-PCR	46
6.12.2	TempliPhi®-Reaktion	47
6.12.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
6.12.4	Auswertung der Sequenzdaten	48
<b>7</b>	<b>Klonierung und heterologe Expression der 1,5-AF Reduktase-AFR-(His)<sub>6</sub> aus <i>S. meliloti</i></b>	<b>49</b>
7.1	<i>afr</i> -Gen Amplifikation aus der genomischen DNA	49
7.2	Expression von AFR-(His) <sub>6</sub> in <i>E. coli</i> BL21(DE3)Gold	50
7.2.1	Expression in Schüttelkultur	50
7.2.2	Expression in 2 Liter-Bioreaktor	50
<b>8</b>	<b>Klonierung und heterologe Expression den Monooxygenasen aus <i>S. meliloti</i> 1021</b>	<b>51</b>
8.1	Amplifikation des Y01812-Genes aus der genomischen DNA	51
8.2	Amplifikation des Y02579-Genes aus der genomischen DNA	52
8.3	Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3)Gold	53
8.3.1	Anzucht von MO1812-(His) <sub>6</sub>	53
8.3.2	Anzucht von MO2579-(His) <sub>6</sub>	54
<b>9</b>	<b>Bestimmung der P450 Konzentration</b>	<b>54</b>
<b>10</b>	<b>Klonierung der Putidaredoxin-Reduktase (PdR) und Putidaredoxin (Pdx) aus <i>Pseudomonas putida</i></b>	<b>54</b>
10.1	Amplifikation des <i>camA</i> -Genes aus der Plasmid-DNA	54

10.2	Amplifikation des <i>camB</i> -Genes aus der Plasmid-DNA	56
<b>11</b>	<b>Fusionsprotein PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> und PdR/Pdx</b>	<b>57</b>
11.1	Herstellung des Konstruktes PdR/Pdx-(His) <sub>6</sub>	57
11.2	Expression des Fusionproteins PdR/Pdx-(His) <sub>6</sub> in <i>E. coli</i> BL21(DE3) Gold	58
11.3	Herstellung des Konstruktes PdR/Pdx	59
<b>12</b>	<b>Fusionprotein PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub></b>	<b>60</b>
12.1	Herstellung des Konstruktes PdR/Pdx-MO1812-(His) <sub>6</sub>	60
12.2	Expression des Fusionproteins PdR/Pdx-MO1812-(His) <sub>6</sub> in <i>E. coli</i> BL21(DE3)Gold	60
<b>13</b>	<b>Spektrumaufnahme des PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> Proteins</b>	<b>60</b>
<b>14</b>	<b>Coexpression der MO1812-(His)<sub>6</sub> mit dem Fusionprotein PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub></b>	<b>61</b>
<b>15</b>	<b>Bestimmung des Wachstums</b>	<b>62</b>
15.1	Optische Dichte	62
15.2	Wachstumsrate und Verdopplungszeit	62
<b>16</b>	<b>Herstellung zellfreier Extrakte</b>	<b>62</b>
16.1	Zellaufschluss von Rhizobien	62
16.2	Zellaufschluss von <i>E. coli</i>	63
<b>17</b>	<b>Anreicherung der rekombinanten Proteine</b>	<b>63</b>
17.1	Affinitätschromatographie	63
17.2	Umpufferung	64
17.3	Anionenaustauschchromatographie	64
<b>18</b>	<b>Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>	<b>65</b>
18.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	65
18.2	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	66
18.3	Coomassie-Färbung	66
<b>19</b>	<b>Protease-Verdau der 1,5-AF-Reduktase</b>	<b>66</b>
<b>20</b>	<b>Western Blot</b>	<b>67</b>
<b>21</b>	<b>Proteinbestimmung</b>	<b>68</b>
<b>22</b>	<b>Bestimmung der AFR-(His)<sub>6</sub>-Aktivität</b>	<b>69</b>
<b>23</b>	<b>Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität</b>	<b>70</b>
<b>24</b>	<b>Analytik</b>	<b>71</b>
<b>25</b>	<b>Biokonversionen</b>	<b>71</b>



25.1	Rohextrakt	71
25.2	AFR-(His) <sub>6</sub>	72
<b>26</b>	<b>Biochemische Charakterisierung</b>	<b>73</b>
26.1	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	73
26.2	Bestimmung der molekularen Masse	73
26.2.1	MALDI-TOF MS	73
26.2.2	Gelfiltration	74
26.3	K <sub>m</sub> -Wert Bestimmung	75
26.4	Temperaturstabilität	75
26.5	pH-Optimum	75
<b>27</b>	<b>Deletion des CYP-Systems <i>SmcY01812</i> in <i>S. meliloti</i> 1021</b>	<b>76</b>
27.1	Eigenschaften des verwendeten Vektors pK18 <i>mobsacB</i>	76
27.2	Konstrukterstellung mittels SOE-PCR	76
27.3	DNA-Übertragung durch Konjugation	78
27.4	Anzucht von Deletionsmutanten	79
27.5	Genetische Kontrolle von der Deletion	79
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>80</b>
<b>1</b>	<b>AF-Reduktase aus <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021</b>	<b>80</b>
1.1	Wachstumsuntersuchungen von <i>S. meliloti</i> 1021	80
1.2	Klonierung des <i>afr</i> -Genes aus <i>S. meliloti</i> 1021 und die Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3)Gold	81
<b>2</b>	<b>Charakterisierung der AFR-(His)<sub>6</sub> aus <i>S. meliloti</i> 1021</b>	<b>85</b>
2.1	Fermenteranzucht	85
2.2	Reinigung der AFR-(His) <sub>6</sub>	86
2.3	Bestimmung des Molekulargewichtes	87
2.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	89
2.5	Isoelektrischer Punkt	90
2.6	Substratspektrum	90
2.7	Biokonversionen	91
2.8	K <sub>m</sub> -Wert Bestimmung	93
2.9	pH-Optimum und Stabilität	94
<b>3</b>	<b>Kristallisation der 1,5-AF-Reduktase</b>	<b>95</b>
3.1	Herstellung der (His) <sub>6</sub> -Prot-AFR	96

3.2	Kultivierung und Reinigung der (His) <sub>6</sub> -Prot-AFR	97
3.3	Protease-Verdau	98
3.4	Western Blot	98
<b>4</b>	<b>Metabolismus der 1,5-AF in <i>S. meliloti</i> 1021</b>	<b>99</b>
4.1	Umsetzung der 1,5-AF	99
4.2	Umsetzung des 1,5-AM	100
<b>5</b>	<b>Monooxygenasen aus <i>S. meliloti</i> 1021</b>	<b>101</b>
5.1	Klonierung des Y01812-Genes aus <i>S. meliloti</i> 1021 und Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3)Gold	101
5.2	Klonierung des Y02579-Genes aus <i>S. meliloti</i> 1021 und Expression in <i>E. coli</i> BL21(DE3)Gold	104
<b>6</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung der rekombinanten Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> aus <i>E. coli</i> BL21(DE3)Gold</b>	<b>107</b>
6.1	Anzucht	107
6.2	Reinigung	107
6.3	Bestimmung des Molekulargewichtes	108
6.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	109
6.5	Isoelektrischer Punkt	110
6.6	UV/VIS-Spektrum der rekombinanten Monooxygenase MO1812-(His) <sub>6</sub>	111
<b>7</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung der rekombinanten Monooxygenase MO2579-(His)<sub>6</sub> aus <i>E. coli</i> BL21(DE3)Gold</b>	<b>112</b>
7.1	Anzucht	112
7.2	Reinigung	113
7.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	113
7.4	UV/VIS-Spektrum der rekombinanten Monooxygenase MO2579-(His) <sub>6</sub>	114
<b>8</b>	<b>Putidaredoxin-Reduktase (PdR) und Putidaredoxin (Pdx) aus <i>Pseudomonas putida</i></b>	<b>114</b>
8.1	Klonierung des <i>camA</i> -Genes aus <i>Pseudomonas putida</i>	115
8.2	Klonierung des <i>camB</i> -Genes aus <i>Pseudomonas putida</i>	118
<b>9</b>	<b>Das Fusionsprotein PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub></b>	<b>120</b>
9.1	Herstellung des Fusionsproteins PdR/Pdx und PdR/Pdx-(His) <sub>6</sub>	120
9.2	Expression des Fusionsproteins PdR/Pdx(His) <sub>6</sub> in <i>E. coli</i> BL21(DE3)	

	Gold-Zellen	121
9.3	Anreicherung des Proteins PdR/Pdx-(His) <sub>6</sub>	122
9.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	122
<b>10</b>	<b>Coexpression der MO1812-(His)<sub>6</sub> mit dem Fusionprotein PdR/Pdx (His)<sub>6</sub></b>	<b>123</b>
10.1	Herstellung des <i>E. coli</i> -Stammes	123
10.2	Anzucht der MO1812-(His) <sub>6</sub> - und PdR/Pdx-(His) <sub>6</sub> -tragenden <i>E. coli</i> BL21(DE3)Gold-Zellen	123
10.3	Coexpression	124
<b>11</b>	<b>Das Fusionsprotein PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub></b>	<b>124</b>
11.1	Herstellung des Konstruktes PdR/Pdx-MO1812-(His) <sub>6</sub>	124
11.2	Expression des Fusionsproteins PdR/Pdx-MO1812-(His) <sub>6</sub> in <i>E. coli</i> BL21(DE3)Gold	126
11.3	Anreicherung des Proteins PdR/Pdx-MO1812-(His) <sub>6</sub>	126
11.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	127
11.5	UV/VIS-Spektrum des Fusionsproteins PdR/Pdx- MO2579-(His) <sub>6</sub>	128
<b>12</b>	<b>Aktivitätsbestimmung der Monooxygenase MO1812</b>	<b>128</b>
12.1	MO1812-(His) <sub>6</sub>	129
12.2	PdR/Pdx-MO1812-(His) <sub>6</sub>	129
<b>13</b>	<b>Die Deletion des Monooxygenase Genes Y01812 in <i>S. meliloti</i> 1021</b>	<b>130</b>
13.1	Herstellung des Deletionskonstrukts	131
13.2	Konjugation und homologe Rekombination	133
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b>	<b>137</b>
<b>1</b>	<b>Metabolismus der 1,5-AF</b>	<b>137</b>
<b>2</b>	<b>1,5-AF-Reduktase aus <i>S. meliloti</i> 1021</b>	<b>139</b>
<b>3</b>	<b>Biologische Funktion der AF-Reduktase</b>	<b>145</b>
<b>4</b>	<b>Die Monooxygenase MO1812 aus <i>S. meliloti</i> 1021</b>	<b>148</b>
<b>5</b>	<b>Die Proteinfamilie der Monooxygenase 1812 aus <i>S. meliloti</i> 1021</b>	<b>151</b>
<b>V</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>155</b>
<b>VI</b>	<b>Summary</b>	<b>156</b>

<b>VII</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>157</b>
<b>VIII</b>	<b>Anhang</b>	<b>180</b>
<b>IX</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>191</b>

# I Einleitung

## 1 1,5-Anhydro-D-fructose in biologischen Systemen

### 1.1 Vorkommen

Die 1,5-Anhydro-D-fructose (1,5-Anhydro-D-*arabino*-hex-2-ulose, 1,5-AF) wurde erstmals 1980 chemisch synthetisiert und ist wegen ihrer verschiedenen funktionellen Eigenschaften ein interessanter Synthesebaustein (Lichtenhaler et al., 1980). So besitzt die 1,5-AF wegen des Fehlens eines anomeren Kohlenstoffatoms eine stabile pyranoide Ringstruktur und kann somit auch als zyklischer Ether betrachtet werden. Die primäre Alkoholgruppe sowie die beiden sekundären Alkoholgruppen und die prochirale Carbonylgruppe an C-2 machen die 1,5-AF zu einer sehr geeigneten Ausgangsverbindung für Modifikationen zu höherwertigen Produkten (Andersen et al., 2002).

1,5-AF wird als seltener Zucker bezeichnet, der in der Natur weit verbreitet ist und sowohl in prokaryontischen als auch in eukaryontischen Organismen nachgewiesen wurde. Allerdings ist die Konzentration der 1,5-AF in Zellen und Geweben sehr gering. 1986 wurde 1,5-AF erstmals in einem biologischen System nachgewiesen und aus *Morchella* sp. isoliert und charakterisiert (Baute et al., 1986a; Baute et al., 1988; Deffieux et al., 1986). Später wurde 1,5-AF in den Myzelien verschiedener *Morchella*-Spezies (Deffieux et al., 1986; Baute et al., 1988; Yu et al., 1997) und in Rotalgen (Broberg et al., 1999; Yu et al., 1993) gefunden. Des Weiteren konnte die 1,5-AF in Pflanzen und Früchten wie z.B. in Samen von Fuchsschwanzgewächsen (*Aceraceae*) und Bananen (*Musaceae*) (Konishi et al., 2000), aber auch in Rattenleber (Kametani et al., 1996) und in menschlichen Zelllinien (Suzuki et al., 1996) nachgewiesen werden. Das Vorkommen der 1,5-AF wurde auch in Mikroorganismen beschrieben, wobei es in *Escherichia coli* C600 näher untersucht werden konnte (Shiga et al., 1999). Da dieser Zucker bis jetzt nur in wenigen taxonomischen Gruppen nachgewiesen werden konnte, wird angenommen, dass die 1,5-AF in biologischen Systemen nicht akkumuliert (Baute et al., 1991; Broberg et al.,

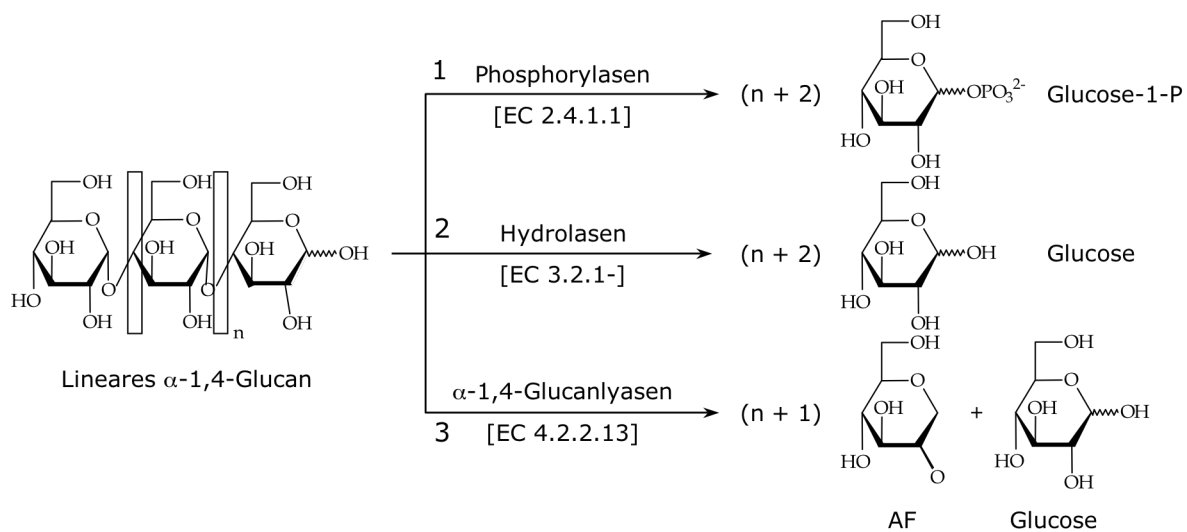
1996; Kametani et al., 1996) und die geringen Konzentrationen mangels geeigneter Nachweisverfahren schwierig festzustellen sind (Yu et al., 1999).

## 1.2 Biosynthese

Die Bildung der 1,5-AF erfolgt in biologischen Systemen durch den Abbau von Speicherpolysacchariden wie Glycogen oder Stärke durch  $\alpha$ -1,4-Glucanlyasen [EC 4.2.2.13], welche die Abspaltung der 1,5-AF vom nicht reduzierenden Ende des Polysaccharides katalysiert (Yu et al., 2004b; Yu et al., 1993; Yu und Pedersen, 1993). Zum ersten Mal konnte die enzymatische Synthese der 1,5-AF durch ein neuartiges Enzym aus *Morchella vulgaris* und *Morchella cosata* 1988 gezeigt werden (Baute et al., 1988).

Der Reaktionsmechanismus der  $\alpha$ -1,4-Glucanlyasen verläuft ähnlich wie bei  $\alpha$ -1,4-Glycosidasen, die zu der *family 31* gehören. Das Substrat wird sowohl bei  $\alpha$ -1,4-Glycosidasen als auch bei  $\alpha$ -1,4-Glucanlyasen zunächst durch eine glycosidische Verknüpfung an das Enzym gebunden. Bei den  $\alpha$ -1,4-Glycosidasen wird unter hydrolytischer Spaltung Glucose freigesetzt (Frandsen und Svensson, 1998), während die  $\alpha$ -1,4-Glucanlyasen im Gegensatz zu allen anderen stärkeabbauenden Enzymen ein ungesättigtes Kohlenhydrat freisetzen (Yu et al., 1999; Yu und Pedersen, 1993). Durch Spaltung der C-O-Bindungen entsteht eine Doppelbindung zwischen C1 und C2 des Glycosylrestes. Dabei wird 1,2-Enol-1,5-AF gebildet, die in einem tautomeren Gleichgewicht mit der Keto-Form der 1,5-AF vorliegt (Lee et al., 2003). Durch die Bildung von ungesättigten Kohlenhydraten zeigt der katalytische Reaktionsmechanismus der  $\alpha$ -1,4-Glucanlyasen deren Sonderstellung unter anderen stärkeabbauenden Enzymen (Yu et al., 1999). Mittlerweile konnte die Bildung der 1,5-AF durch ein weiteres Enzym, die mikrosomale Glycosidase II, gezeigt werden. In dieser Reaktion wird Maltose unter Entstehung von Glucose und 1,5-AF als Nebenprodukt verstoffwechselt (Andersen et al., 2002). Während die physiologische Bedeutung des Stärkeabbaus durch Hydrolasen und Phosphorylasen geklärt ist, bleiben bei dem Metabolismus durch  $\alpha$ -1,4-Glucanlyasen Fragen offen (Yu et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass die gebildete 1,5-AF nicht intermediär verstoffwechselt wird, um zur Energie- und Kohlenstoffversorgung der Organismen

beizutragen. Des weiteren wird die seltene Verbindung in den taxonomischen Gruppen zu unterschiedlichen Metaboliten umgesetzt. Diese weisen unterschiedliche Bedeutungen für die Organismen auf und ermöglichen deswegen keinen Rückschluß auf eine allgemeine Funktion (Yu et al., 1999). Somit stellt die durch  $\alpha$ -1,4-Glucanlyasen katalysierte Reaktion den ersten Schritt eines neuen Abbauweges, des sogenannten *Third Glycogenolytic Pathway* dar, der zur Bildung von 1,5-AG führt (Kametani et al., 1996).



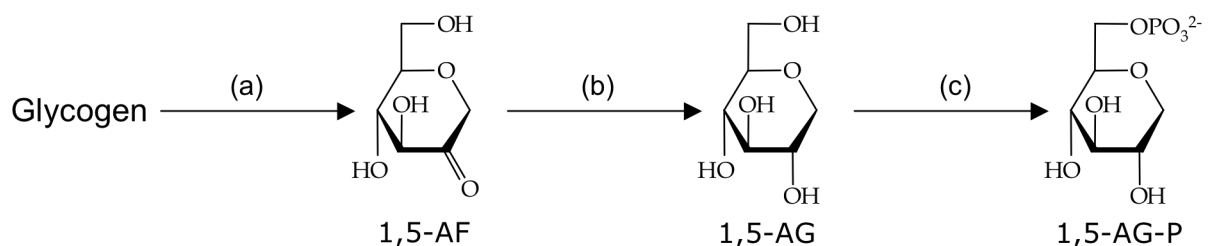
### Abbildung 1: Abbauwege von Stärke und Glycogen

Abbauwege von linearen  $\alpha$ -1,4-Glucanen durch (1) Phosphorylasen zu Glucose-1-phosphat, (2) Hydrolasen zu Glucose und (3)  $\alpha$ -1,4-Glucanlyasen zu 1,5-AF und Glucose.

## 1.3 Metabolismus

Die Bedeutung der 1,5-AF für die Organismen ist bis jetzt noch nicht geklärt. Die Funktion der verschiedenen biologisch aktiven Metabolite konnte dagegen schon bestimmt werden. Der Metabolismus von 1,5-AF in Säugern wurde Mitte der Neunziger Jahre beschrieben. Die 1,5-AF konnte in verschiedenen Organen der Ratten nachgewiesen werden, wie z.B. in Leber, Adrenaldrüse und in der Milz (Kametani et al., 1996). Die Synthese der 1,5-AF verläuft in diesem Fall, wie bei Pilzen und Algen, durch die Aktivität einer  $\alpha$ -1,4-Glucanlyase. Die Abbauwege dieses Zuckers unterscheiden sich jedoch grundlegend. Die 1,5-AF wird in Säugerzellen

durch eine AF-Reduktase [EC 1.1.1.263] stereoselektiv zu 1,5-Anhydro-D-glucitol (1,5-AG) reduziert (Sakuma et al., 1998). Diese Reaktion stellt den zweiten Schritt des sogenannten *Third Glycogenolytic Pathway* (Kametani et al., 1996) dar. Dieser neue Stoffwechselweg besteht aus drei enzymatischen aufeinanderfolgenden Reaktionen, ausgehend von Glycogen bis zur Entstehung des 1,5-AG-6-Phosphates (Abbildung 2). Bei dem Reaktionsprodukt 1,5-AG handelt es sich, chemisch betrachtet, um eine 1-Desoxy-D-Glucopyranose (Struktur analogon der D-Glucose), die das am häufigsten bei Säugern vorkommende Polyol des Blutplasmas und der Cerebrospinalflüssigkeit darstellt (Knowler 1994; Pitkanen 1973; Servo und Pitkanen, 1975; Pitkanen und Pitkanen, 1992). Es konnte nachgewiesen werden, dass der individuelle Blutspiegel von 1,5-AG durch Regulationsmechanismen konstant (ca. 12-40 µg/ml) gehalten wird (Buse et al., 2003). Dieses Polyol wird hauptsächlich durch die Nahrung aufgenommen (ca. 5 mg/Tag) und nur in geringen Mengen durch die Reduktion der 1,5-AF in der Leber gebildet (Yamanouchi und Akanuma, 1994). Die 1,5-AG-Konzentration im Urin ist viel niedriger als die Konzentration im Blutplasma, was darauf hindeutet, dass 1,5-AG sehr effektiv in den Nieren resorbiert wird (Pitkanen und Pitkanen, 1992). Die physiologische Wirkung von 1,5-AG besteht in einer Stimulierung der Insulin-Sekretion, die in einer erhöhten Glucosetoleranz resultiert (Yamanouchi et al., 2003).



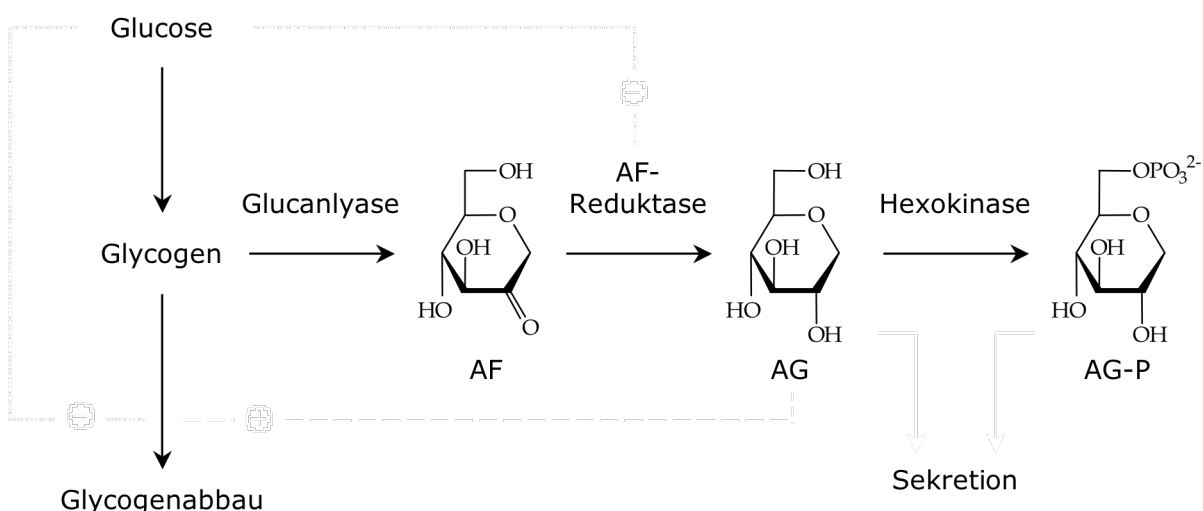
**Abbildung 2: Der *Third Glycogenolytic Pathway***

(a)  $\alpha$ -1,4-Glucanlyase [EC 4.2.2.13], (b) 1,5-AF-Reduktase [EC 1.1.1.263]; (c) Hexokinase [EC 2.7.1.1]



Der Abbau von 1,5-AF bei Pflanzen wurde auch als *Third Glycogenolytic Pathway* beschrieben. In Samen von Fuchsschwanzgewächsen und im Fruchtfleisch reifer Bananen konnte die Reduktion der 1,5-AF mittels strikt NADPH-abhängiger 1,5-AF-Reduktase [EC 1.1.1.263] unter Bildung von 1,5-AG festgestellt werden (Konishi et al., 2000). Dieses Enzym wurde anhand der NADPH-Abnahme bzw. durch 1,5-AG-Bildung identifiziert, konnte jedoch nicht isoliert und charakterisiert werden.

In Rotalgen und Pilzen wurde der sogenannte *1,5-Anhydro-D-fructose-Pathway* beschrieben, der unter Stressbedingungen induziert wird (Baute et al., 1991; Yu et al., 1995; Yu und Fiskesund, 2006). Die beteiligten Reaktionen werden durch Spezies-spezifische 1,5-AF-Dehydratasen katalysiert, dabei entstehen sekundäre Metabolite wie Microthecin (Baute et al., 1991; Baute et al., 1986b; Baute et al., 1988; Broberger et al., 1996; Yu, 2005), 5-Epipentomycin (Baute et al., 1991) und die tautomeren Ascopyrone (Baute et al., 1993; Thomas et al., 2002; Yu, 2005). Das Ascopyron wird für die Anwendung als potenzielles antimikrobielles Agens bereits vorgesehen (Andersen et al., 2002; Elsser et al., 2003). Das Wirkspektrum der Ascopyrone erstreckt sich sowohl auf Gram-positive als auch auf Gram-negative Bakterien, deswegen wird vermutet, dass es sich um einen Abwehrmechanismus der Pilze gegenüber bakteriellem Befall handelt (Thomas et al., 2002).



**Abbildung 3: Modell der Regulation des Glycogen-Abbaus in *E. coli* C600**

Der gleiche glycogenolytische Abbauweg konnte auch in Mikroorganismen gezeigt werden. In *E. coli* C600 wurde festgestellt, dass unter Glucose-Mangel 1,5-AF zu 1,5-AG reduziert wird. Das entstandene Polyol stimuliert den Glycogen-Abbau, womit es zur Versorgung der Zelle mit Glucose beiträgt (Abbildung 3). Dieser stimulierende Effekt wurde nicht in Anwesenheit von Glucose im Nährmedium oder auch durch die phosphorylierte Form des 1,5-AG beobachtet (Shiga et al., 1999). Diese Wachstumsuntersuchungen haben somit zu einer Modellvorstellung eines Regulationsmechanismus beigetragen (Shiga et al., 1999), der im Zusammenhang mit der Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus Typ II eine wichtige Beobachtung darstellt.

Im Gegensatz zu den bis jetzt beschriebenen 1,5-AF-Reduktasen, die 1,5-AF stereoselektiv zu 1,5-AG reduzieren, wurde vor kurzem eine neuartige 1,5-AF-Reduktase [EC 1.1.1.292] aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5 identifiziert (Kühn et al., 2006). Dieses bakterielle Enzym setzt die 1,5-AF stereoselektiv und quantitativ zu 1,5-Anhydro-D-mannitol (1,5-AM) um. Die Reduktase hat sich als ein induzierbares Protein erwiesen, dessen Aktivität durch Anwesenheit des seltenen Zuckers 1,5-AF im Medium stimuliert wird. Da die 1,5-AF-Reduktase aus *S. morelense* zum Wachstum auf 1,5-AF als einziger Kohlenstoffquelle benötigt wird, handelt es sich in diesem Fall um ein metabolisches Enzym. Die in *E. coli*, Pilzen, Rotalgen, Pflanzen und Säugern vorkommende 1,5-AF-Reduktase wurde dagegen als regulatorisches Protein beschrieben, das am Glycogen-Abbau beteiligt ist (Konishi et al., 2000; Sakuma et al., 1998; Shiga et al., 1999). Bis jetzt sind die in der Rattenleber und in *S. morelense* vorkommenden 1,5-AF-Reduktasen die einzigen isolierten und charakterisierten Dehydrogenasen, die die 1,5-AF stereoselektiv zu 1,5-AG bzw. 1,5-AM reduzieren.

**Tabelle 1: Enzymreaktionen mit 1,5-AF**

Enzym	Reaktionsprodukt	Quelle
1,5-AF-Dehydratase	Ascopyron	Thomas et al., 2002; Yu et al., 2004c
1,5-AF-Reduktase [EC 1.1.1.263]	1,5-AG	Konishi et al., 2000; Sakuma et al., 1998; Shiga et al., 1999
1,5-AF-Reduktase [EC 1.1.1.292]	1,5-AM	Kühn et al., 2006; Dambe et al., 2006
Pyranose-2-Oxidase [EC 1.1.3.10]	3-Keto-1,5-AF	Freimund et al., 1998

## 1.4 Anwendungsmöglichkeiten der 1,5-AF und ihrer Derivate

Die wachsende Zahl an Patenten und Patentanmeldungen im Zusammenhang mit der Nutzung von 1,5-AF zeigt, dass es ein erhebliches Anwendungspotenzial für diesen Zucker gibt (<http://ep.espacenet.com/> und <http://www.uspto.gov/index.html>). Zum einen ist 1,5-AF ein preiswerter Rohstoff, der aus Stärke biokatalytisch mit  $\alpha$ -1,4-Glucanlyase und Pullulanase [EC 3.2.1.41] einfach hergestellt werden kann (Yu, 2004). Zum anderen besitzt die 1,5-AF chemische Eigenschaften, so dass sie als Ausgangsverbindung für verschiedene biokatalytische und chemische Transformationen genutzt werden kann. Anders als Hexapyranosen ist die Ringstruktur der 1,5-AF stabil und besitzt mit der Carbonylgruppe an C-2 sowie der primären Alkoholgruppe an C-6 interessante Funktionen für Derivatisierungsreaktionen (Andersen et al., 2002). Was den Zucker selbst betrifft, ergeben sich wegen seiner toxikologischen Unbedenklichkeit (Yu et al., 2004a; Mei et al., 2005) zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten im Lebensmittel- und medizinischen Bereich, z.B. als kalorienarmer Süßstoff (Yu und Kragh, 1999), Antioxidans (Junichi und Hideto, 2003; Kenkou und Mami, 2003), oder Feuchthaltemittel (Masamitsu und Junichi, 2002). Da 1,5-AF die Glucosetoleranz in Nagern erhöht (Ahren et al., 2000; Ahren und Yu, 2004) ergäbe sich auch die Möglichkeit, mit diesem Zucker den Diabetes mellitus Typ II günstig zu beeinflussen.

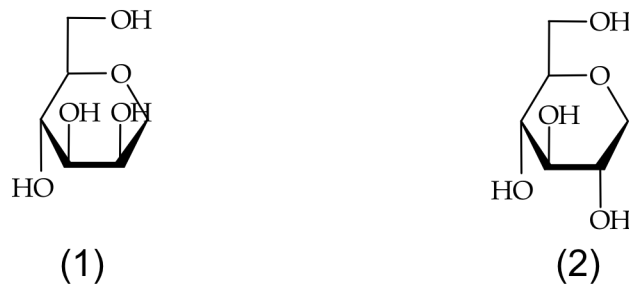
Die biokatalytische bzw. chemische Modifikation der 1,5-AF führte zu zahlreichen interessanten Folgeprodukten wie z.B. 1,5-Anhydrohexitole, 6-O-Acylderivate, Ascopyrone sowie weitere Derivate mit immunstimulierender (Hasegawa, 1991), antiviraler (Hossain et al., 1997; Van Aerschot, 2004) und antikarzinogener (Hasegawa, 1991) Wirkung.

## 2 1,5-Anhydro-D-hexitole in biologischen Systemen

Das Vorkommen von 1,5-Anhydro-D-hexitolen in biologischen Systemen ist schon seit längerem bekannt. Zu diesen Polyolen gehören 1,5-Anhydro-D-glucitol (1,5-AG, Polygalitol) und dessen C-2 Stereoisomer 1,5-Anhydro-D-mannitol (1,5-AM, Styrcitol) (Abbildung 4).

1,5-AM ist eine sehr wenig untersuchte Verbindung, und außer dem Vorkommen in verschiedenen *Styrax*-Spezies ist nicht viel über 1,5-AM in biologischen Systemen bekannt (Huang et al., 2003), auch nicht über seine Biosynthese. Demgegenüber sind in der Literatur mehrere chemische Synthesen (Bowie und Gray, 1984; Elvebak et al., 1995) beschrieben worden.

Im Gegensatz zu 1,5-AM ist 1,5-AG in der Natur relativ weit verbreitet. Diese Verbindung konnte in Pflanzengeweben (Boeyens et al., 1982; Konishi et al., 2000) und in Körperflüssigkeiten von Säugern (Freundenberg und Felton, 1932; Pitkanen, 1973; Yamanouchi et al., 1992b) nachgewiesen werden. Darüberhinaus wurde ihre Bildung und ihr Vorkommen im Menschen intensiv untersucht. Unklar ist bisher, in welchem Zusammenhang 1,5-AG mit dem Diabetes mellitus Typ II steht, obwohl diese Verbindung als klinischer Nachweis dieser Stoffwechselerkrankung verwendet wird (Yamanouchi et al., 1992).



**Abbildung 4: Struktur von 1,5-Anhydro-D-mannitol (1) und 1,5-Anhydro-D-glucitol (2)**

In Rattenleber konnte die Bildung von 1,5-AG aus 1,5-AF nachgewiesen werden, was auf das Vorkommen des glycogenolytischen Stärkeabbaus in diesem Organ hinweist.

Aus *Trichoderma longibrachiatum* 11-3 wurde eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Dehydrogenase isoliert, die ebenfalls 1,5-AG zu 1,5-AF oxidiert (Yoshida et al., 2003). Eine entsprechende Oxidation wird auch von einer membranständigen PQQ-abhängigen Dehydrogenase aus *Cytophaga marinoflava* katalysiert (Tsugawa et al., 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass Pyranose-2-Oxidase [EC 1.1.3.10] aus *Peniophora gigantea* 1,5-AG in einer ersten Teilreaktion zu 1,5-AF oxidiert, das anschließend in

einem zweiten Schritt weiter oxidiert wird zu 3-Keto-1,5-AF (Freimund et al., 1998). Eine regioselektive C-3 Oxidation von 1,5-AG zu 3-Keto-1,5-AG wird durch die 1,5-AG-Dehydrogenase katalysiert, die aus verschiedenen Pilzen wie *Coriolus versicolor* (Taguchi et al., 1993) oder *Trametes multicolor* (Leitner et al., 2001b) isoliert wurde. In Bakterien wurde ebenfalls gezeigt, dass 1,5-AG aus 1,5-AF gebildet wird, insbesondere legen die Untersuchungen an *E. coli* C600 (Shiga et al., 1993; Shiga et al., 1999) nahe, dass 1,5-AG regulatorisch wirkt und den Glycogenabbau beeinflusst (Yu und Fiskesund, 2006). Bei *Pseudomonas* sp. NK-85001 (Nakamura et al., 1986) konnte das Wachstum mit 1,5-AG als Substrat gezeigt und in Zusammenhang mit verschiedenen Enzymsystemen gebracht werden, die an der Verstoffwechslung beteiligt sind. Es wurde eine NAD(P)<sup>+</sup>-unabhängige Dehydrogenase identifiziert, die in Gegenwart von Sauerstoff 1,5-AG zu 1,5-AF oxidiert.

**Tabelle 2: Enzymreaktionen mit 1,5-AG**

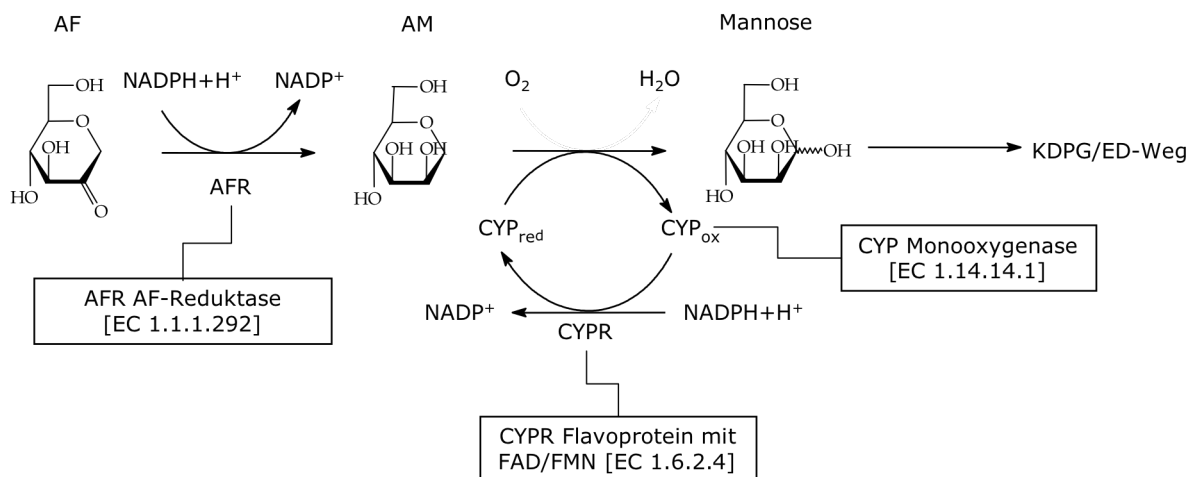
Enzym	Reaktionsprodukt	Quelle
Hexokinase [EC 2.7.1.1]	1,5-AG-P	Sakuma et al., 1998; Shiga et al., 1999
1,5-AG-Dehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i> sp. NK-85001	1,5-AF	Nakamura et al., 1986
Glucose-3-Dehydrogenase [EC 1.1.99.13]	3-Keto-1,5-AG	Sode et al., 2000; Tsugawa et al., 1996
1,5-AG-Dehydrogenase aus <i>Trichoderma longibrachiatum</i> 11-3	D-Glucose	Yoshida et al., 2003
Pyranose-2-Oxidase [EC 1.1.3.10]	1,5-AF	Freimund et al., 1998

### 3 1,5-Anhydro-D-fructose-Weg in Rhizobien

$\alpha$ -Glucane, wie Glycogen und Stärke, sind Speicherstoffe, die in den meisten lebenden Organismen vorkommen. Ihre Abbauprodukte Glucose und Glucose-1-Phosphat treten in die Glycolyse ein und führen zu Pyruvat. In der letzten Dekade wurde ein neuer, alternativer katabolischer Abbauweg der  $\alpha$ -Glucane in Bakterien, Algen und Pilzen aufgeklärt (Yu und Fiskesund, 2006). Dieser Abbauweg wird als AF-Weg bezeichnet (Yu et al. 1995). Die erste Reaktion dieses Abbauweges wird

durch die  $\alpha$ -1,4-Glucanlyase katalysiert, die 1,5-AF vom nicht-reduzierenden Ende der Stärke oder des Glycogens freisetzt (Yu et al., 1993; Yu und Pedersen, 1993; Yu et al., 1995). Zur Aktivierung des AF-Pathways kommt es, wenn der Organismus einem biotischen oder abiotischen Stressfaktor ausgesetzt wird (Yu und Fiskesund, 2006).

In Rhizobien wird 1,5-AF stereoselektiv zu 1,5-AM reduziert, das an dem Signalweg beteiligt sein könnte, wie 1,5-AG bei *E. coli* C600 (Shiga et al., 1999). Diese Reaktion wird durch eine NADPH-abhängige 1,5-AF-Reduktase [EC 1.1.1.292] katalysiert. Anschließend wird das Polyol durch eine C-1-Hydroxylierung zu D-Mannose umgesetzt. Dieses Produkt kann in den ED-Pathway eingeschleust werden und somit als leicht verwertbare Kohlenstoffquelle in den Metabolismus der Bakterien eintreten. Im Zellextrakt von *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5 wird die Hydroxylierung von 1,5-AM durch ein P450-Monooxygenase-System katalysiert (Abbildung 5) (Kühn et al., 2006).



**Abbildung 5: 1,5-AF-Weg in Rhizobien**

Die biologische Funktion dieses Abbauweges blieb bei Rhizobien bis jetzt ungeklärt. Es ist bekannt, dass in *S. morelense* S-30.7.5 1,5-AF alle Enzyme des 1,5-AF-Weges induziert (Kühn et al., 2006). Der Abbauweg wird nur unter Bedingungen aktiviert, bei denen keine andere Kohlenstoffquelle außer 1,5-AF zur Verfügung

steht. Wenn die Bakterien in Anwesenheit von Glucose oder Mannose kultiviert werden, ist die Aktivität der 1,5-AF-Reduktase nicht detektierbar (Kühn et al., 2006). Die Oxidation von 1,5-AM zu D-Mannose durch eine P450-Monooxygenase könnte als Auflösung der möglichen Signalfunktion des Polyols dienen und die dabei entstandene D-Mannose wird als bevorzugtes Wachstumssubstrat verwendet (Yu und Fiskesund, 2006).

#### **4 *Sinorhizobium meliloti* 1021**

*S. meliloti* 1021 gehört zu der Familie der *Rhizobiaceae*, zu der Gram-negative stäbchenförmige Bodenbakterien eingeordnet werden. Die Zellen bilden keine Sporen und können polar, subpolar oder peritrich begeißelt sein. Der für die DNA charakteristische G+C Gehalt wurde in der Familie auf 57-65 mol % bestimmt. Die genetischen und physiologischen Eigenschaften der Familie der *Rhizobiaceae* haben sie in die Nähe der *Pseudomonaceae* und *Azotobacteriaceae* gebracht (Werner, 1987), bei denen es sich um Bodenbakterien handelt, die entweder frei oder in Symbiose mit Pflanzen leben können (Schloter et al., 1997; Segovia et al., 1991). Die meisten Mitglieder der Familie der *Rhizobiaceae* sind in der Lage, eine symbiontische Verbindung mit Leguminosen zu bilden. Die Symbiose beruht auf einem beiderseitigen Nutzen der beteiligten Organismen in engem morphologischem Kontakt und im Fall der Rhizobium-Leguminosen-Symbiose auf der Nutzung des Makroelementes Stickstoff (Brill, 1975; Brown und Dilworth, 1975; Emerich et al., 1979). Die Bakterien, die sich bereits in den Pflanzenwurzeln befinden, differenzieren sich zu sogenannten Bakteroiden und sind für die Stickstoff-Fixierung zuständig. Die für die Symbiose notwendige genetische Information ist auf der Plasmid-DNA lokalisiert. Die sogenannten Sym-Plasmide tragen unter anderem Gene, die für die Bildung von Wurzelknöllchen, die Wirtsspezifität und die Stickstofffixierung notwendig sind (Burkardt et al., 1987; Hynes et al., 1986). Die stickstofffixierenden, in Symbiose mit Leguminosen lebenden Bakterien wurden in 12 Genera eingeteilt, die aus 44 Spezies bestehen (Sawada et al., 2003).

Die Mitglieder der Familie der *Rhizobiaceae* werden auf Grund ihrer Wachstumscharakteristik zu den schnell wachsenden Rhizobien, wie z.B.

*Sinorhizobium meliloti*, *S. trifolii* und *S. leguminosarum* (Jordan und Allen, 1974) oder zu den langsam wachsenden Rhizobien, wie z.B. das Genus *Bradyrhizobium* (Allen und Allen, 1950; Stowers, 1985) unterteilt. Die daraus folgenden Unterschiede in der enzymatischen Ausstattung sowie im Kohlenhydrat-Stoffwechsel beider Gruppen wurden bereits häufig beschrieben (Brown und Dilworth, 1975; Hadley et al., 1983; Martinez-de Drets et al., 1974; Martinez-de Drets und Arias, 1972; Parke und Ornston, 1986; Stanley et al., 1985). Die Gattung *Sinorhizobium* wurde zusammen mit 10 anderen Spezies in die Gruppe III eingeordnet.

Interessanterweise wurde das Wachstum auf 1,5-AF und die AF-Reduktase nicht nur in *S. morelense* S-30.7.5 sondern auch in anderen Rhizobien nachgewiesen. Dazu gehören Stämme wie *S. meliloti*, *Rhizobium leguminosarum* und *Mesorhizobium loti* (Kühn et al., 2006). Da das Genom von *S. meliloti* 1021 vollständig bekannt ist wurde dieser Organismus als Modell für die weiteren Untersuchungen an dem 1,5-AF-Weg in Rhizobien verwendet.

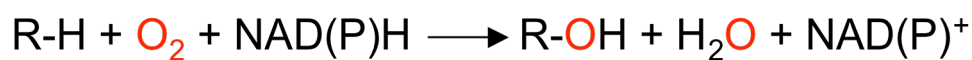
## 5 Cytochrome P450

Die Cytochrom P450-Systeme kommen praktisch in allen Organismen vor und stellen eine der größten Protein-Superfamilien dar (Degtyarenko und Archakov, 1993). Mit Cytochrom P450-Monooxygenasen (P450-Monooxygenasen oder CYPs) wird eine Enzymfamilie bezeichnet, die zur Klasse der Monooxygenasen (EC 1.14.x.y) gehört. Die Bezeichnung der P450-Enzyme beschreibt die spektralen Eigenschaften der Hämin-Gruppe (Typ-b), die in Verbindung mit Kohlenstoffmonoxid ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweist (Omura und Sato, 1964). Die P450-Proteine katalysieren eine Reihe von Reaktionen, bei denen molekularer Sauerstoff in die X-H Bindungen (X: -C, -N, S) des Substrates bei gleichzeitiger Reduktion des zweiten Sauerstoffatoms zu Wasser eingeführt wird (Mansuy, 1998).

Das Spektrum der durch CYP-Systeme katalisierten Reaktionen ist sehr breit und vielseitig. Zu ihnen gehören u. a. die Kohlenstoff-Hydroxylierung, Heteroatom-Oxidation, Dealkylierung, Epoxidierung, aromatische Hydroxylierung, Reduktion und Dehalogenierung (Sono et al., 1996; Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000; Bernhardt, 2004; Guengerich, 2004). Diese Enzyme sind in der Biotransformation

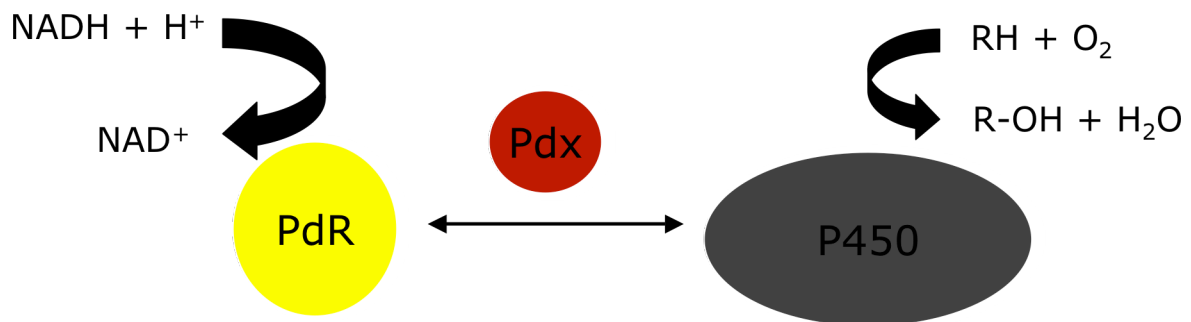


von pharmazeutischen Wirkstoffen, Xenobiotika-Biokonversion, Biosynthese von Steroiden, fettlöslichen Vitaminen und Fettsäuren, Konversion von Alkanen und aromatischen Komponenten und Degradation von Herbiziden und Insektiziden involviert (Bernhardt, 2006). Bisher wurden über 5000 verschiedene P450-Gene kloniert. Die Sequenz-Übereinstimmung innerhalb einer Familie beträgt über 40 %, die Proteine mit Homologie über 55 % gehören meist zur selben Unterfamilie (Bernhardt, 2006).



**Abbildung 6: Eine allgemeine, durch Cytochrome P450 im Gegenwart des Sauerstoffs katalysierte Hydroxylierungsreaktion**

Als Prototyp eines bakteriellen P450-Systems gilt das P450<sub>cam</sub>-System aus *Pseudomonas putida*, das auch als drei-Komponenten Kampher-Hydroxylase-System bezeichnet wird (Kuznetsov et al., 2005). Cytochrom P450<sub>cam</sub> katalysiert die erste Reaktion – die 5-*exo* Hydroxylierung – im Abbauweg vom D-Kampher. Das System besteht aus drei verschiedenen Proteinen: einem strikt NADH-abhängigen, FAD-enthaltenden Flavoprotein, der Putidaredoxin-Reduktase [EC 1.18.1.3] (PdR), einem Eisen-Schwefel Protein (Putidaredoxin, Pdx) und der Monooxygenase (P450<sub>cam</sub>). Putidaredoxin gehört zu der Gruppe von [2Fe-2S]-Ferredoxinen, die an dem gleichzeitigen Transfer von zwei Elektronen von der Putidaredoxin-Reduktase auf P450<sub>cam</sub> beteiligt ist (Gunsalus und Sligar, 1978; Sevrioukova et al., 2003; McLean et al., 2005). Zwei Moleküle Pdx liefern Elektronen für ein P450<sub>cam</sub>-Molekül (Kuznetsov et al., 2005), das die Oxidation von D-Kampher zu 5-*exo*-Hydroxykampher unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff katalysiert. Die Hydroxylierung ermöglicht dem Organismus D-Kampher abzubauen und als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle für das Wachstum zu nutzen (Trudgill et al., 1966). Die Kampher-abbauenden *P. putida*-Stämme tragen die genetische Information zur Kampher-Degradation auf dem CAM-Plasmid (Shaham et al., 1973).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Reaktion des CAM-Systems.**

Die Klonierung und Expression dieser Gene in *E. coli* wurde in der Literatur bereits beschrieben (Sevrioukova et al., 2001; Sibbesen et al., 1996; Peterson et al., 1990; Unger et al., 1986). Es konnten außerdem selbstständige aktive P450-Systeme durch Fusionierung des Redoxins, der Redoxin-Reduktase und der Monooxygenase erzielt und in *E. coli* exprimiert werden, z.B. die Fusionsproteine mit allen drei P450<sub>cam</sub>-Komponenten (Sibbesen et al., 1996) oder mit den Komponenten des P450<sub>11β</sub>-Systems (Cao et al., 2000).

In Rhizobien wurde bereits über P450-Enzyme berichtet (Keister et al., 1999; Tully et al., 1998; Appleby A. C., 1967), jedoch konnten bis jetzt keine derartigen Proteine bei *S. meliloti* beschrieben werden. Auf dem Hauptchromosom von *S. meliloti* konnten zwei Gene identifiziert werden, die für eine theoretische Cytochrom P450-Monooxygenase und eine Cytochrom P450-ähnliche Monooxygenase kodieren. Die Funktion dieser Proteine wurde bis jetzt nicht untersucht. Da für die Hydroxylierung von 1,5-AM zu D-Mannose in *S. morelense* S-30.7.5 eine CYP-Reaktion postuliert wurde (Kühn et al., 2006) und bekannt war, dass *S. meliloti* eine AF-Reduktase besitzt, war es nahe liegend die Untersuchungen zur 1,5-AM Hydroxylierung mit einem Modellorganismus weiterzuführen, dessen Genomsequenz bekannt ist und in dem die putativen CYP-Gene lokalisiert werden konnten. Außer den Monooxygenase-Sequenzen konnten bis jetzt keine für Elektronentransferproteine kodierenden Gene auf dem Chromosom identifiziert werden. Die einzigen Ferredoxin und Ferredoxin Reduktase kodierenden Sequenzen gehören zu dem sogenannten Ferredoxin-Oxidase-Komplex. Dieser wurde sowohl in *S. meliloti*, als auch in

*Rhizobium leguminosarum* beschrieben. Dieser Komplex ist am Katabolismus von *Rhizopine* (3-O-methyl-scylo-inosamine, 3-O-MSI) beteiligt und besteht aus mehreren Proteinen, für die miteinander benachbarte Gene kodieren (Bahar et al., 1998, Bahar et al., 2000). Es wurde festgestellt, dass die Gene dieses Systems in beiden Organismen auf einem Plasmid platziert sind, das als Sym-Plasmid bezeichnet wird und hauptsächlich für symbiontische Eigenschaften kodierende Gene trägt. Die Gene dieses Komplexes befinden sich in *S. meliloti* auf dem größeren pSymB-Plasmid, was auf eine eventuelle Rolle in der Symbiose hindeuten könnte. Außerdem wurde in Rhizobien über ein P450 Gen-Cluster berichtet, das in unterschiedlichen Stämmen identifiziert werden konnte (Keister et al., 1999). Es wird vermutet, dass dieses für einen biosynthetischen Abbauweg kodiert, der in die Synthese von Terpenoiden involviert ist (Tully et al., 1998). In *Bradyrhizobium japonicum* werden die Cytochrome P450 in den Bakteroiden synthetisiert, was darauf hindeutet, dass P450-Proteine an dem Sauerstoff-Metabolismus in Bakteroiden beteiligt sind (Appleby A. C., 1967). Die Deletionsmutante, bei der das P450 in *B. japonicum* ausgeschaltet wurde, zeigte, dass das Nichtvorhandensein des Cytochroms keinen Einfluss auf die symbiontischen Eigenschaften des Bakteriums aufweist. Es wird die Beteiligung des P450-Proteins an dem Überlebensprozess während der Inkubation des Bakteriums im Boden postuliert (Keister et al., 1999).

## 6 Zielsetzungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den neuartigen AF-Abbauweg in Rhizobien zu untersuchen und die daran beteiligten Enzyme zu identifizieren und biochemisch zu charakterisieren. Bis jetzt wurde eine 1,5-AF-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5 beschrieben (Kühn et al., 2006), die eine stereoselektive Reduktion von 1,5-AF zu 1,5-AM katalysiert und die Beteiligung eines CYP-Systems an der weiteren Metabolisierung von 1,5-AM wurde postuliert. Um den Abbau der 1,5-AF in Rhizobien verfolgen zu können, wurde *Sinorhizobium meliloti* als Modellorganismus für die weiteren Untersuchungen gewählt. Dieser hat sich aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *S. morelense* und des durchsequenzierten Genoms als ideal erwiesen. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die 1,5-AF-Reduktase

aus *S. meliloti* kloniert und heterolog exprimiert werden. Um eine hohe Ausbeute in der Proteinreinigung zu erreichen sollte die 1,5-AF-Reduktase als Fusionsprotein erstellt werden, indem ein C-terminaler His<sub>6</sub>tag eingefügt werden sollte. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die Reduktion der 1,5-AF zu 1,5-AM quantitativ verläuft. Außerdem sollten die biochemischen Eigenschaften dieser Reduktase charakterisiert werden. Der zweite Teil dieser Arbeit sollte klar stellen, ob eine der in *S. meliloti* vorkommenden hypothetischen Monooxygenasen an der Hydroxylierung von 1,5-AM zu D-Mannose beteiligt ist. Dazu sollten die Monooxygenase-Gene kloniert und heterolog exprimiert werden. Da die Monooxygenasen des P450-Systems Transferproteine für den Elektronentransport vom Cosubstrat benötigen, sollten die entsprechenden Enzyme (Redoxin und Reduktase) aus *Pseudomonas putida* (P450<sub>CAM</sub>-System) kloniert werden - Putidaredoxin-Reduktase und Putidaredoxin. Mit diesen Proteinen sollten verschiedene Fusionsproteine erstellt werden und somit zum Erhalt einer aktiven Monooxygenase führen. Die Beteiligung einer der beiden *S. meliloti*-Monooxygenasen an dem 1,5-AF-Metabolismus in *S. meliloti* sollte zusätzlich durch die Deletion der Monooxygenase-Gene bestätigt werden.

## II Material und Methoden

### 1 Organismen, Vektoren, Plasmide und Primer

#### 1.1 Organismen

Tabelle 3: In den Experimenten eingesetzte Stämme.

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Bezugsquelle
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	nicht definiert	DSMZ
<i>Sinorhizobium meliloti</i> - $\Delta$ 1812	SmcY01812 <sup>-</sup>	diese Arbeit
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	nicht definiert	Stammsammlung*
<i>Mesorhizobium loti</i>	nicht definiert	DSMZ
<i>Pseudomonas putida</i>	nicht definiert	Stammsammlung*
<i>Pseudomonas putida</i> (50198)	nicht definiert	DSMZ
<i>Pseudomonas putida</i> (7162)	nicht definiert	DSMZ
<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> 294 [RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7)] <i>pro res</i> $\Delta$ <i>recA</i> T <sub>p</sub> <sup>r</sup>	Prof. Pühler, Bielefeld
<i>E. coli</i> BL21(DE3)Gold	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	NOVAGEN
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , D ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), F80 <i>lacZD M15</i> , D <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , D( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (S <sup>T</sup> r <sup>R</sup> ) <i>endA</i> , <i>nupG</i>	INVITROGEN
<i>E. coli</i> TOP10 [pAFRsm]	mit 4,9 kb Plasmid pAFRsm	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 [pAFRsmHis]	mit 4,9 kb Plasmid pAFRsm His	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 [pAFRma]	mit 4,9 kb Plasmid pAFRma	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 [pAFRmaHis]	mit 4,9 kb Plasmid pAFRma	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 [pMO1812sm]	mit 5,4 kb Plasmid pMO1812sm	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 [pMO1812smHis]	mit 5,4 kb Plasmid pMO1812smHis	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 [pMO2579smHis]	mit 5,4 kb Plasmid pMO2579smHis	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 [pcamA]	mit 5,3 kb Plasmid <i>pcamA</i>	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 [pcamB]	mit 4,2 kb Plasmid <i>pcamB</i>	diese Arbeit
BL21(DE3)Gold [pAFRsmHis+]	mit 6,3 kb Plasmid pAFRsmHis+	diese Arbeit
BL21(DE3)Gold [pAFRmaHis+]	mit 6,3 kb Plasmid pAFRmaHis+	diese Arbeit
BL21(DE3)Gold [pMO1812smHis+]	mit 6,8 kb Plasmid pMO1812smHis+	diese Arbeit
BL21(DE3)Gold	mit 6,8 kb Plasmid	diese Arbeit

[pMO2579smHis]	pMO2579smHis+	
BL21(DE3)Gold [pMO2579-N-His]	mit 6,8 kb Plasmid pMO2579-N-His+	diese Arbeit
BL21(DE3)Gold [pMO2579-C-His]	mit 6,8 kb Plasmid pMO2579-C-His+	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 [pPICMO2579-C-His]	mit 9,5 kb Plasmid pMO2579-C-His	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 [pcamA]	mit 5,3 kb Plasmid pcamA	diese Arbeit
<i>E. coli</i> TOP10 [pcamB]	mit 4,2 kb Plasmid pcamB	diese Arbeit
BL21(DE3)Gold [pcamA+b]	mit 5,6 kb Plasmid pcamA+b	diese Arbeit
BL21(DE3)Gold [pcamB+b]	mit 4,5 kb Plasmid pcamB+b	diese Arbeit
BL21(DE3)Gold [pcamA/camB+b]	mit 4,8 kb Plasmid pcamA/camB+b	diese Arbeit
BL21(DE3)Gold [pcamA/camB-His+b]	mit 4,8 kb Plasmid pcamA/camB-His+b	diese Arbeit
BL21(DE3)Gold [pcamA/camB-His+]	mit 5,5 kb Plasmid pcamA/camB-His+	diese Arbeit
BL21(DE3)Gold[pcamA/camB-MO1812smHis+]	mit 7,7 kb Plasmid pcamA/camB-MO1812smHis+	diese Arbeit

\*Institut für Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes

**Tabelle 4: Referenzstämme**

DSM-No.	Organismus	Quelle
1021	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	DSMZ
1981	<i>Sinorhizobium meliloti</i> , SU 47	DSMZ
2626	<i>Mesorhizobium loti</i> , NZP 2213	DSMZ
30132	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , 3H0q18	DSMZ
30131	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> , 3l1b6	DSMZ

## 1.2 Plasmide und Vektoren

**Tabelle 5: In den Experimenten eingesetzte Plasmide und Vektoren.**

Vektor/ Plasmid	kb	Eigenschaften	Exprimiertes Enzym	Quelle
pCR II-TOPO	3,9	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor, <i>lacZ</i> $\alpha$ , SP6 Promotor, F1 origin, MCS, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	-	Invitrogen
pET24a(+)	5,3 1	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Kan <sup>r</sup>	-	NOVAGEN
pAFRsm	4,9	pCR II-TOPO mit 1 kb <i>afr</i> -Gen aus <i>S. meliloti</i>	-	diese Arbeit
pAFRsmHis	4,9	pCR II-TOPO mit 1 kb <i>afr</i> -Gen aus <i>S. meliloti</i> ; BamHI, HindIII/	-	diese Arbeit

		<i>Xho</i> I, <i>Eco</i> RI; C-terminaler (His) <sub>6</sub> tag		
pAFRsmHis+	6,3	pET24a(+) mit 1 kb <i>afr</i> -Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I, <i>Eco</i> RI; C-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	AFR-(His) <sub>6</sub>	diese Arbeit
pProtAFRsm	4,9	pCR II-TOPO mit 1 kb <i>afr</i> -Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, N-terminaler (His) <sub>6</sub> tag; Faktor Xa Schnittstelle	-	diese Arbeit
pProtAFRsm+	6,3	pET24a(+) mit 1 kb <i>afr</i> -Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, N-terminaler (His) <sub>6</sub> tag; Faktor Xa Schnittstelle	(His) <sub>6</sub> -Prot-AFR	diese Arbeit
pAFRma	4,9	pCR II-TOPO mit 1 kb <i>afr</i> -Gen aus <i>M. amorphae</i>	-	diese Arbeit
pAFRmaHis	4,9	pCR II-TOPO mit 1 kb <i>afr</i> -Gen aus <i>M. amorphae</i> ; <i>Bam</i> HI, <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III, <i>Sal</i> I; C-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	-	diese Arbeit
pAFRmaHis+	6,3	pET24a(+) mit 1 kb <i>afr</i> -Gen aus <i>M. amorphae</i> ; <i>Bam</i> HI, <i>Nde</i> I/ <i>Hind</i> III, <i>Sal</i> I; C-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	AFR2-(His) <sub>6</sub>	diese Arbeit
pMO1812sm	5,1	pCR II-TOPO mit 1,2 kb MO1812-Gen aus <i>S. meliloti</i>	-	diese Arbeit
pMO1812smHis	5,1	pCR II-TOPO mit 1,2 kb MO1812-Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, C-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	-	diese Arbeit
pMO1812smHis+	6,5	pET24a(+) mit 1,2 kb MO1812-Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I, <i>Eco</i> RI; C-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	MO1812-(His) <sub>6</sub>	diese Arbeit
pMO2579smHis	5,4	pCR II-TOPO mit 1,5 kb MO2579-Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, C-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	-	diese Arbeit
pMO2579-N-His	5,4	pCR II-TOPO mit 1,5 kb MO2579-Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>Eco</i> RI, <i>Not</i> I, N-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	-	diese Arbeit
pMO2579-N-His+	6,8	pET24a(+) mit 1,5 kb MO2579-Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>Eco</i> RI, <i>Not</i> I, N-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	MO2529-N-(His) <sub>6</sub>	diese Arbeit
pMO2579-C-His	5,4	pCR II-TOPO mit 1,5 kb MO2579-Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>Eco</i> RI, <i>Not</i> I, C-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	-	diese Arbeit
pMO2579-C-His+	6,8	pET24a(+) mit 1,5 kb	MO2529-C-	diese Arbeit

		MO2579-Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , C-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	(His) <sub>6</sub>	
pPICMO2579-C-His	9,5	pPIC9 mit 1,5 kb MO2579-Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>EcoRI</i> , <i>NotI</i> , C-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	MO2529-C-(His) <sub>6</sub>	diese Arbeit
pMO2579smHis+	6,8	pET24a(+) mit 1,5 kb MO2579-Gen aus <i>S. meliloti</i> ; <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> / <i>XhoI</i> , <i>EcoRI</i> ; C-terminaler (His) <sub>6</sub> tag	MO2529-(His) <sub>6</sub>	diese Arbeit
pcamA	5,3	pCR II-TOPO mit 1,2 kb camA-Gen aus <i>P. putida</i>	-	diese Arbeit
pcamB	4,2	pCR II-TOPO mit 0,3 kb camB-Gen aus <i>P. putida</i>	-	diese Arbeit
pcamA+	6,2	pET24a(+) mit 1,2 kb camA-Gen aus <i>P. putida</i> ; <i>NdeI</i> , <i>BamHI</i>	PdR	diese Arbeit
pcamA+b	4,5	pET17b mit 1,2 kb camA-Gen aus <i>P. putida</i> ; <i>NdeI</i> , <i>BamHI</i>	PdR	diese Arbeit
pcamB+	5,3	pET24a(+) mit 0,3 kb camB-Gen aus <i>P. putida</i> ; <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i>	Pdx	diese Arbeit
pcamB+b	3,6	pET24a(+) mit 0,3 kb camB-Gen aus <i>P. putida</i> ; <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i>	Pdx	diese Arbeit
pcamA/camB+b	4,8	pET17b mit 1,2 kb camA-Gen und 0,3 kb camB aus <i>P. putida</i> ; <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i>	PdR/Pdx	diese Arbeit
pcamA/camB+	5,5	pET24a(+) mit 1,2 kb camA-Gen und 0,3 kb camB-Gen aus <i>P. putida</i> ; <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i>	PdR/Pdx	diese Arbeit
pcamA/camB-His+b	4,8	pET17b mit 1,2 kb camA-Gen und 0,3 kb camB aus <i>P. putida</i> ; <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i>	PdR/Pdx-(His) <sub>6</sub>	diese Arbeit
pcamA/camB-His+	5,5	pET24a(+) mit 1,2 kb camA-Gen und 0,3 kb camB-Gen aus <i>P. putida</i> ; <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>NdeI</i>	PdR/Pdx-(His) <sub>6</sub>	diese Arbeit
pcamA/camB-MO1812smHis+	7,7	pET24a(+) mit 1,2 kb camA-Gen, 0,3 kb camB-Gen aus <i>P. putida</i> und 1,2 kb MO1812-Gen aus <i>S. meliloti</i>	PdR/Pdx/MO1812-(His) <sub>6</sub>	diese Arbeit
pK18mobsacB	6,4	Deletionsvektor für <i>S. meliloti</i> ; pUC18 Derivat, <i>sacB lacZ</i> $\alpha$ Km <sup>r</sup> , mobilisierbar	-	Prof. Pühler, Bielefeld
pK18mobsacB- $\Delta$ MO1812	6,8	pK18mobsacB mit 0,4 kb MO1812-Gen aus <i>S. meliloti</i>	-	diese Arbeit



### 1.3 Primer

**Tabelle 6: In den Experimenten eingesetzte Primer.**

Bezeichnung	Länge	Nucleotidsequenz (5'→3')	T <sub>m</sub> °C
mel_forw	22	TCAAAGTCCCGTTTCGATCTCG	69,2
mel_rev	20	ATGATTCGCTGGGGACTGAT	65,6
5'mel_Bam/Hind_for	33	GGATCCAAGCTTATGATTCGCTGGGGAC TGATC	78,8
3'mel_His/Xho/Eco_rev	52	GAATTCCTCGAGTCAGTGGTGGTGGTGG TGGTGAAGTCCCGTTTCGATCTC G	90,7
M13 universalCS (-43)	23	AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT	70,5
M13 reverseCS (-49)	24	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	67,3
pET_forward	30	TCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTC AC	66,8
pET_reverse	26	AAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGC	66,4
AFR EG1 forw	26	ATGAACCGCTGGGGACTGATCGGCCG	73
AFR EG1 rev	27	TCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCA	74,2
BamNde AFR EG1 forw	38	GGATCCCATATGATGAACCGCTGGGGAC TGATCGGCCG	88,3
HindSal Histag AFR EG1 rev	55	TTCGAACAGCTGCTAGTGGTGGTGGTGG TGGTGGATGCATGCTCGAGCGGCCGCC A	94,7
sm mono forw	36	GAATTCGGATCCATGTCCATCGCCCCG GTATCACC	78,8
sm mono/Hind rev His	56	AAGCTTTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGA AGTCCCGTTTCGATCTCGACGGC ACC GC	79,4
Sm 2579 BamHI forw	31	GGATCCATGGATACGCGACCGGAGCCG TTCG	70
Sm 2579 HindIII EcoRI His rev	60	AAGCTTGAATTCCTACACCACCACCACC ACCACCTTGACCCTTGCCGACACCTTCA CGG	69,8
DiHo-27-f	19	AAGGAGGTG(AT)TCCA(AG)CC	56,3
DiHo-1525-r	20	AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG	54
DiHo-seq-357-f	19	CTCCTACGGGAGGCAGCAG	63,1
DiHo-seq-1100-r	15	GGTTGCGCTCGTTG	49
Mel_BamHI/N-Protease His	64	GGATCCATGCACCACCACCACCACACA TTGAAGGCCGCATTTCGCTGGGA CTGATCGGCGCGA	94,3
Mel_HindIII rev	37	AAGCTTTCAAAGTCCCGTTTCGATCTCG ACGGCACC	78
2579 BamHI forw	31	GGATCCATGGATACGCGACCGGAGCCG TTCG	77,4
2579 HindIII EcoRI His rev	60	AAGCTTGAATTCCTACACCACCACCACC ACCACCTTGACCCTTGCCGACACCTTCA TCGG	88
camA Koga forw	30	GTGAACGCAAACGACAACGTGGTCATCG TC	70
camA Koga rev	29	TCAGGCACTACTCAGTTCAGCTTTGGCG	70

		G	
PdR NdeI forw	37	CATATGATGAACGCAAACGACAACGTGG TCATCGTCG	70
PdR BamHI rev	54	GGATCCGCTGCTGCTCGCGCCATCGGT GGCACTACTCAGTTCAGCTTTGGCGGC	70
camB forw	41	ATGTCTAAAGTAGTGTATGTGTACATGA TGGAACGCGTCG	70
camB rev	32	TTACCATTGCCTATCGGGAACATCGACC ACGA	70
Pdx BamHI forw	47	GGATCCATGTCTAAAGTAGTGTATGTGT CACATGATGGAACGCGTCG	70
Pdx EcoRI rev	48	GAATTCAGTTCAGCGGCCATTGCCTA TCGGGAACATCGACCACGAT	70
camB EcoRI rev His	50	GAATTCTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC CATTGCCTATCGGGAACATCGACCACGA	78
1 MO1812 del forw	30	ATGCCATCGCCCCCGGTATCACCATCG AC	74
1 MO1812 del rev	28	CGACGGTCGCGCAACAGGCTGTTCCACC T	74
2 MO1812 del forw	28	CGGACCGCAACGAAGGCGCCAATGTTT C	74
2 MO1812 del rev	32	TCACCAGACCAGATCGAGCCGCTCCAGA CCAT	74

## 2 Nährmedien

Die Bestandteile der Medien wurden in den vorgeschriebenen Volumina gelöst (falls nicht angegeben beziehen sich die Angaben auf 1000 ml) und der pH-Wert mittels pH-Meter (Typ CG820, Fa. Schott) eingestellt. Zur Herstellung von festen Medien wurde zu den flüssigen Nährlösungen 1,5 % (w/v) Agar (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) zugegeben. Alle Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Bei einem Volumen von 1,5 Liter und größer wurde die Sterilisierungszeit auf 40 min verlängert. Zusätze, die nicht autoklavierbar waren, wie z. B. Antibiotika, Vitamin- und SL4-Lösung wurden sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße, Minisart, Fa. Sartorius) und den Medien nach dem Autoklavieren zugefügt.

### Mineral-Vitamin-Medium (pH 6,8)

1,6 g\*1,5-AF

1,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,5 g NH<sub>4</sub>Cl

0,4 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
0,4 g NaCl  
0,05 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
1,0 ml SL4-Lösung (10-fach)  
1,0 ml Vitaminlösung (10-fach)

ad 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$

Bei der Herstellung von Agarplatten wurden 3 g 1,5-AF /L dem Medium zugefügt.

Spurenelementlösung SL4 (Pfennig und Lippert, 1966), 10-fach

5,0 g EDTA  
2,0 g  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
0,1 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
0,03 g  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$   
0,3 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
0,2 g  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
0,01 g  $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
0,02 g  $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
0,03 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

ad 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$

Vitaminlösung (Pfennig, 1965), 10-fach; pH 6,8

2,0 mg Biotin  
20,0 mg Nicotinsäure  
10,0 mg Thiamin  
10,0 mg 4-Aminobenzoessäure  
5,0 mg Pantothenat  
50,0 mg Pyridoxamin  
20,0 mg Cyanocobalamin

ad 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$

Nutrient Broth (NB)-Medium; pH 7

3,0 g Fleischextrakt

5,0 g Pepton aus Fleisch

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

R2A-Medium (DIFCO Laboratories, Detroit); pH 7,2

0,5 g Hefeextrakt

0,5 g Protease Pepton

0,5 g Casamino acids

0,5 g Glucose

0,5 g Stärke

0,3 g Natriumpyruvat

0,3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,5 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

TY-Medium

3,0 g Hefeextrakt

5,0 g Trypton

0,7 g CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O

0,5 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

LB-Medium (pH 7,0)

10 g Pepton aus Casein

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

1 g Glucose (optional)

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

Pepton/Tryptonmedium (pH 7,0)

2,5 g Glucose

17 g Trypton

3,0 g Soja-Pepton

5,0 g NaCl

2,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

SOC-Medium (pH 7,0)

2,0 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

10,0 mM NaCl

2,5 mM KCl

10,0 mM MgCl<sub>2</sub>

10,0 mM MgSO<sub>4</sub>

20,0 mM Glucose

### **3 Puffer und Lösungen**

#### **3.1 DNA-Isolierung**

L1-Lösung (Kieser, 1984)

1,5 g Tris

3,7 g EDTA (pH 8,0)

51,3 g Saccharose

ad 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

SDS-Lösung (5 %)

5,0 g SDS

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

L2-Lösung

2,0 g NaOH  
 12,5 ml SDS-Lösung (20 %)  
 ad 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

L3-Lösung (pH 5,5)

73,6 ml Kaliumacetat  
 ad 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

L1-Lösung für Plasmid Präparation (pH 8)

12,5 ml Tris (1 M)  
 5,0 ml EDTA (0,5 M)  
 5,0 ml RNase (1 mg/ml)  
 ad 250 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

**3.2 Agarose-Gelelektrophorese**

10 x TBE (pH 8,0)

0,9 M Tris  
 0,9 M Borsäure  
 25,0 mM EDTA  
 50,0 ml Glycin

Probenpuffer (farbig)

0,5 % Bromphenolblau  
 in 5x TBE-Puffer

**3.3 DNA-Sequenzanalyse**

1 X TBE-Puffer (pH 8,0)

SequaGel XR	Herstellerangaben Fa. Roth
SequaGel complete	Herstellerangaben Fa. Roth
Formamid	Herstellerangaben Fa. Roth
Acrylamidstammlösung	Herstellerangaben Fa. Roth

APS-Lösung

0,1 g Ammoniumpersulfat  
 ad 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

### 3.4 Zellaufschluss

#### E. coli

Ultraschall (Soniprep):

50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,0)

0,5 mg DNase I

#### Rhizobiaceae

20 mM BisTris (pH 7,0)

0,5 mg DNase I

### 3.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

#### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamidstammlösung Herstellerangaben

#### Sammelgelpuffer (pH 6,8)

3,0 g Tris

0,2 g SDS

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

#### Trenngelpuffer (pH 8,8)

18,5 g Tris

0,4 g SDS

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

#### APS-Lösung

0,1 g Ammoniumpersulfat

ad 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

#### Elektrodenpuffer (pH 8,3)

3,0 g Tris

14,4 g Glycin

1,0 g SDS

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

#### Solubilisierungspuffer

0,5 ml Glycerin

3 – 4 Kristalle Bromphenolblau

1,0 ml Solubilisierungsstammlösung

#### Solubilisierungsstammlösung

2,4 g Tris

0,15 g SDS

0,4 ml β-Mercaptoethanol

ad 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R-250  
(0,1 %) + Fixierer 75 ml

Fixierer

300 ml Methanol  
100 ml Essigsäure in H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

**Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Acrylamidstammlösung    Herstellerangaben

Trenngelpuffer (pH 8,7)

18,2 g Tris  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

Sammelgelpuffer (pH 8,7)

3,0 g Tris  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

APS-Lösung

0,1 g Ammoniumpersulfat  
ad 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

Solubilisierungsstammlösung

2,4 g Tris  
0,4 ml β-Mercaptoethanol  
ad 40 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

Solubilisierungspuffer

1,0 ml Solubilisierungsstammlösung  
0,5 ml Glycerin  
3-4 Kristalle Bromphenolblau

Elektrodenpuffer (pH 8,3)

3,0 g Tris  
14,4 g Glycin  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R-250  
(0,1 %) + Fixierer 75 ml

Fixierer

300 ml Methanol  
100 ml Essigsäure in H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

**3.6 Isoelektrische Fokussierung**

Petroleumbenzin	reinst
Anodenflüssigkeit 10	Herstellerangaben



Kathodenflüssigkeit	Herstellerangaben
Trichloressigsäure	20 % in H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>
Serva Blue W	400 mg/l in H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>

Entfärbelösung

- 50 % H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>
- 40 % Methanol
- 10 % Eisessig

**3.7 Western Blot**

Transferpuffer (pH 8,3)

- 3,03 g Tris
- 14,4 g Glycin
- 1,0 g SDS
- 20 % Methanol

TBS-Puffer (pH 7,5)

- 0,1 M Tris
- 0,9 % NaCl

Blocking-/Inkubationspuffer

- Waschpuffer
- 5,0 % Magermilchpulver

Waschpuffer (pH 7,5)

- TBS-Puffer
- 0,3 % Tween 20

NBT/BCIP-Stammlösung

Herstellerangaben (Roche)

Färbelösung (pH 9,5)

- 0,1 M Tris
- 0,05 M MgCl<sub>2</sub>
- 0,1 M NaCl

Anti-His<sub>6</sub> Antikörper (Roche)

Herstellerangaben

Anti-Maus IgG AP Sekundärantikörper

Herstellerangaben (Sigma)

### 3.8 Proteinanreicherung

#### Anionenaustauschchromatographie

##### Bindepuffer (pH 7)

50 mM BisTris

##### Elutionspuffer (pH 7)

50 mM BisTris

1 M NaCl

#### Umpufferung

20 mM BisTris (pH 7,0)

20 mM Tris-HCl (pH 7,5)

#### Gelfiltrationschromatographie

##### Äquilibrationpuffer (pH 6,5)

50 mM BisTris

##### Elutionspuffer (pH 6,5)

50 mM BisTris

100 mM NaCl

#### Affinitätsschromatographie (IMAC)

##### Bindepuffer (pH 7,4)

0,02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,5 M NaCl

##### Elutionspuffer (pH 7,2)

0,02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,5 M NaCl

0,5 M Imidazol

### 3.9 Proteinbestimmung nach Pierce

Bicinchoninsäure BCA

Herstellerangaben

Kupfersulfatlösung

Herstellerangaben

BSA-Stammlösung

2,0 mg/ml Rinderserumalbumin in H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

### 3.10 Aktivitätstests

#### AFR-Aktivitätstest (Reduktionsreaktion von Zuckern)

BisTris (200 mM, pH 7,0) 500 µl

NAD(P)H (14 mM in 1 % NaHCO<sub>3</sub>) 20 µl

Enzymlösung 100 µl

H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	280 µl
Zuckerlösung (0,3 M)	100 µl

Monooxygenase-Aktivitätstest (Hydroxylierung von 1,5-AM)

Fusionsprotein **PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub>**:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (20 mM, pH 7,4) + 20 mM KCl	500 µl
NADH (14 mM in 1 % NaHCO <sub>3</sub> )	72 µl
Enzymlösung (Fusionsprotein)	300 µl
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	28 µl
1,5-AM (0,05 M)	100 µl

**MO1812-(His)<sub>6</sub>**:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (20 mM, pH 7,4) + 20 mM KCl	500 µl
NADH (14 mM in 1 % NaHCO <sub>3</sub> )	72 µl
MO1812-(His) <sub>6</sub>	100 µl
PdR/Pdx-(His) <sub>6</sub>	200 µl
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	28 µl
1,5-AM (0,05 M)	100 µl

**3.11 MALDI-TOF MS**

Probenpuffer	25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
--------------	--

**3.12 Lösungen für Bestimmung des pH-Optimums**

Citrat Puffer	pH 4,0-6,0	200 mM
BisTris Puffer	pH 5,5-7,5	200 mM
TrisHCl Puffer	pH 6,5-9,0	200 mM

### 3.13 Antibiotika und andere Medienzusätze

Antibiotika und Lösungen wie IPTG und X-Gal wurden nicht autoklaviert, sondern sterilfiltriert und den autoklavierten Medien nach dem Abkühlen steril zugefügt bzw. auf die Agarplatten ausplattiert.

**Tabelle 7: Den Medien zugesetzte Antibiotika und andere Chemikalien.**

Substanz	Stammlösung	Lösungsmittel	Endkonzentration	Bezugsquelle
Kanamycin	25 mg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	25 µg/ml	Serva
Chloramphenicol	30 mg/ml	Ethanol	50 µg/ml	Boehringer Mannheim
Ampicillin	25 mg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	25 µg/ml	Boehringer Mannheim
Tetracyclin	25 mg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	25 µg/ml	Fluka
IPTG	100 mM	H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	0,1 bzw. 1 mM	Roth
X-Gal	2 %	DMF	80 µl / Agarplatte	Serva

## 4 Enzyme und Chemikalien

### 4.1 Enzyme

**Tabelle 8: In den Experimenten eingesetzte Enzyme.**

Enzym	Bezugsquelle
<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas
<i>Nde</i> I	MBI Fermentas
<i>Sal</i> I	MBI Fermentas
<i>Hind</i> III	MBI Fermentas
<i>Xho</i> I	MBI Fermentas

DNase I	Roche
RNase A	Roth
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Axon
FideliTaq Polymerase	GE Healthcare
Herculase <sup>®</sup> II Fusion DNA Polymerase	Stratagene

## 4.2 Kits

**Tabelle 9: In den Experimenten eingesetzte Kits.**

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit	Amersham
Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen
MiniElute <sup>™</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit	Qiagen
E.Z.N.A <sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit II	peqlab
TempliPhi <sup>®</sup> Kit	GE Healthcare

## 4.3 Längen- und Massenstandards für Nukleinsäuren und Proteine

**Tabelle 10: In den Experimenten eingesetzte Standards.**

<b>Längen- / Massenstandard</b>	<b>Bezugsquelle</b>
GeneRuler <sup>™</sup> DNA-Ladder 1 kb	MBI Fermentas
GeneRuler <sup>™</sup> DNA-Ladder 100 bp	MBI Fermentas
PageRuler <sup>™</sup> Protein-Ladder 10-200 kDa	MBI Fermentas
IEF-Proteinstandard P9 3-10	Serva

## 5 Kultivierung und Lagerung

### 5.1 Kultivierung

Zur Kultivierung von *S. meliloti* und anderen Rhizobien-Stämmen in kleinem Maßstab wurden die einzelnen Kolonien in 5 ml Mineral-Vitamin-Medium mit 1,5-AF (10 mM), bzw. in R2A Medium angeimpft und bei 28 °C, 220 Upm inkubiert (1 bis 3 Tage).

Zur Kultivierung der Stämme in größerem Maßstab wurde eine 25 ml Vorkultur (Mineral-Vitamin-Medium mit 10 mM 1,5-AF) mit 25 µl der entsprechenden Glycerinkultur beimpft und bei 28 °C, 220 Upm 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur (250 ml) mit dem ganzen Volumen der Vorkultur angeimpft.

Die Kultivierung von Fremdgen-tragenden *E. coli*-Zellen in kleinem Maßstab erfolgte in 5 ml kanamycinhaltigem Pepton/Trypton-Medium. Diese Kultur wurde mit einer einzelnen Kolonie mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers angeimpft und über Nacht bei 37 °C, 220 Upm bebrütet.

Zur Kultivierung von Fremdgen-tragenden *E. coli*-Zellen in größerem Maßstab wurde 25 ml kanamycinhaltiges Pepton/Trypton-Medium mit 10 µl einer Glycerinkultur angeimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Hauptkultur (250 ml) mit dem ganzen Volumen der Vorkultur angeimpft und anschließend über 24 h bei 37 °C, 28 °C bzw. 20 °C unter Schütteln (220 Upm) inkubiert.

### 5.2 Lagerung

Die Stammhaltung der Rhizobien-Stämme erfolgte bei 4 °C auf Agarplatten mit R2A- und NB-Medium. Zur Kontrolle der 1,5-AF-Reduktase-Aktivität wurden parallel dazu Agarplatten mit AF-haltigem Mineral-Vitamin-Medium angeimpft. Die Agarplatten wurden zum Verdunstungsschutz mit Parafilm verschlossen. Zur Stammhaltung wurden die beiden Stämme im Abstand von zwei bis drei Wochen auf neue Agarplatten überimpft.

Die Stammhaltung der Fremdgen-tragenden *E. coli*-Zellen erfolgte bei 4 °C auf LB<sub>Kan</sub>- bzw. LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten.

Um sowohl Fremdgen-tragende *E. coli*- als auch Rhizobien-Zellen dauerhaft bei -70 °C lagern zu können, wurde zu den in Medium aufgenommenen Zellen 87 % Glycerin zugegeben. Glycerin verhindert die Kristallbildung innerhalb der Zelle und somit das Zerreißen der Zelle und deren Zerstörung.

Stammhaltung *E. coli*:

- Kolonien mit Hilfe steriler Zahnstocher von LB<sub>Kan<sup>r</sup></sub>, bzw. LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten in 5 ml kanamycin- bzw. ampicillinhaltiges LB-Medium überimpfen
- Ü. N. bei 37 °C, 220 Upm auf dem Schüttler (Multitron-Schüttler, Infors) inkubieren
- Zellsuspension (1,5 ml) bei 4.000 Upm 5 min zentrifugieren (Biofuge Pico, Heraeus)
- Zellpellet in 500 µl des entsprechenden Mediums resuspendieren
- 500 µl 87 % Glycerin zugeben
- Mischen und bei -70 °C lagern

Stammhaltung Rhizobien:

- Kolonien mit Hilfe steriler Zahnstocher von MV-AF- oder R2A-Agarplatten in 5 ml MV-AF-Medium überimpfen
- Ü. N. bei 28 °C und 220 Upm auf dem Schüttler (Multitron-Schüttler, Infors) inkubieren
- Zellsuspension (1,5 ml) bei 4.000 Upm 5 min zentrifugieren (Biofuge Pico, Heraeus)
- Zellpellet in 500 µl frischem MV-AF-Medium resuspendieren
- 500 µl 87 % Glycerin zugeben
- Mischen und bei -70 °C lagern

## 6 Gentechnische Standardmethoden

### 6.1 Isolierung der genomischen DNA aus Rhizobien

- 200 ml NB-Medium mit 20 ml Vorkultur beimpfen; über Nacht bei 28 °C und 220 Upm inkubieren
- 100 ml entnehmen und 15 min bei 5.000 x g abzentrifugieren (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun)
- Pellet in 12,5 ml L1-Lösung resuspendieren
- 2,5 ml L1-Lösung mit 10 mg/ml Lysozym (sterilfiltriert) zum resuspendierten Pellet zugeben
- 1 h bei 37 °C unter Schütteln (200 Upm) inkubieren
- 1,5 ml 10 % SDS-Lösung zugeben und vorsichtig durch Invertieren mischen; anschließend 30 min bei 65 °C inkubieren
- 5 ml Kaliumacetat-Lösung hinzufügen und mindestens 1 h auf Eis stehen lassen
- 10 min bei 10.000 x g zentrifugieren (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun)
- klaren, DNA-haltigen Überstand mit dem halben Volumen PCI (25:24:1) versetzen
- 15 min bei 13.000 x g zentrifugieren (die beiden Schritte einmal wiederholen), (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun)
- klarer Überstand in 50 ml Falcon überführen und mit 1,5-fachen Volumen Isopropanol (-20 °C) versetzen; DNA mindestens 1 h bei -70 °C fällen
- gefällte DNA entnehmen und in 70 % Ethanol (-20 °C) aufnehmen; 10 min bei 5.000 x g abzentrifugieren (diesen Schritt zweimal wiederholen), (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun)
- DNA in sterilem Gefäß bei 60 °C 5 min trocknen lassen und anschließend in 50 µl TE-Puffer bzw. H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> versetzen und über Nacht bei 4 °C lösen



## 6.2 Isolierung der genomischen DNA aus *Pseudomonas putida*

Die genomische DNA aus *P. putida* wurde mittels Instant Bacteria DNA Kit (analytikjena bio solutions) isoliert.

## 6.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *P. putida*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde eine Kombination aus alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim, 1983) und Phenol/Chloroform-Extraktion angewandt.

- 1,5 ml der Übernachtskultur 5 min bei 4.000 Upm (Biofuge Pico, Heraeus) zentrifugieren
- Bakterienpellet in 0,3 ml Destabilisierungspuffer L1 resuspendieren
- 0,3 ml Denaturierungspuffer L2 zugeben und durch mehrmaliges Invertieren mischen; 5 min bei RT inkubieren
- 0,3 ml Präzipitationspuffer L3 zugeben, mehrmals invertieren
- Niederschlag 15 min bei 13.000 Upm zentrifugieren (Biofuge Pico, Heraeus)
- Überstand abnehmen und mit 0,45 ml Phenol/Chloroform extrahieren
- 10 min zur Phasentrennung bei 13.000 Upm zentrifugieren (Biofuge Pico, Heraeus)
- wässrige obere Phase abnehmen und mit 0,45 ml Chloroform extrahieren
- 10 min bei 13.000 Upm zentrifugieren
- wässrige obere Phase abnehmen und mit 0,75 ml Isopropanol (-20 °C ) mischen
- 30 min bei 13.000 Upm (4 °C) zentrifugieren (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun)
- Pellet mit 0,5 ml 70 % Ethanol (-20 °C) versetzen
- 10 min bei 13.000 Upm (4 °C) zentrifugieren
- Pellet 10 min bei 60 °C trocknen
- Sediment in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> aufnehmen, Lagerung bei -20 °C

Für die Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (peqlab) isoliert.

#### 6.4 Restriktionsspaltung der DNA

Die zur hydrolytischen Spaltung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten eingesetzten Restriktionsendonucleasen wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen (vgl. Tabelle 11) und entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die Pfeile zwischen den Basen geben die Schnittstelle an.

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 20 µl für den Kontrollverdau und in 100 µl für den präparativen Verdau. Die Menge an eingesetzten Enzymen und DNA variierte. Die Dauer betrug 1 h für den Kontrollverdau und 1,5 h für den präparativen Verdau.

**Tabelle 11: Verwendete Restriktionsendonucleasen.**

Enzym	Schnittstelle (5'→3')	Firma
<i>Bam</i> HI	G↓GATCC	MBI Fermentas
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	MBI Fermentas
<i>Eco</i> RI	G↓AATTC	MBI Fermentas
<i>Sal</i> I	G↓TCGAC	MBI Fermentas
<i>Nde</i> I	CA↓TATG	MBI Fermentas
<i>Xho</i> I	C↓TCGAG	MBI Fermentas
<i>Not</i> I	GC↓GGCCGC	MBI Fermentas

#### 6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Es wurden 35 ml Gele (7 x 10 cm) verwendet, die sich in BlueMarine 100-2-Elektrophoresekammern (SERVA) befanden. Die Auftrennung von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten basiert auf der Wanderung der negativ geladenen DNA im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode hin. Die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA ist antiproportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare (Meyers et al.,

1976). Die DNA kann durch Zugabe von Ethidiumbromid detektiert werden. Ethidiumbromid interkaliert in GC-Paare und so können die DNA-Fragmente unter UV-Licht nachgewiesen werden. Die gewünschten Inserts und die linearisierten Vektoren konnten nach einem präparativen Doppelverdau aus dem Gel reisoliert und dadurch von Restriktionsenzymen und Salzen befreit werden.

### **1 % TBE-Kontrollgele**

- DNA-Proben mit  $\frac{1}{6}$  Volumen Bromphenolblau-Probenpuffer versetzen
- Spannung von 100 V anlegen
- nach der Elektrophorese Gel in Ethidiumbromid 10 min färben
- gefärbte DNA im UV-Licht bei 312 nm detektieren (Chemi Doc XRS System, Universal Hood, Biorad) und fotografieren

### **1 % TBE-Gele zur DNA-Reisolierung**

- DNA mit farblosem Probenpuffer versetzen
- Spannung von 60 V anlegen
- Gel in Ethidiumbromid 10 min färben und anschließend 5 min in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  waschen
- gewünschtes DNA-Fragment auf dem UV-Tisch mit einem sterilem Skalpel ausschneiden
- DNA aus dem Gel mit entsprechendem Kit extrahieren

## **6.6 Reisolierung von DNA-Fragmenten aus den Agarosegelen**

Die Isolierung wurde mit dem MinElute™ Gel Extraction Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Bei der Reisolierung wurden die Angaben vom Hersteller befolgt.

## 6.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der isolierten Vektoren und der genomischen DNA wurde in einer wässrigen Verdünnung (1:60) mittels Gene Quant Photometer (Pharmacia Biotech) bestimmt. Die Absorption der DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Dabei entspricht eine  $Abs_{260}=1$  der Konzentration doppelsträngiger DNA von 50  $\mu\text{g/ml}$  (Sambrook et al., 1989). Zur Abschätzung der Reinheit und des Restproteingehaltes wurde die Absorption bei 260 nm mit der Absorption bei 280 nm verglichen. Das Verhältnis (Ratio) reiner DNA beträgt 1,8.

## 6.8 DNA-Fällung

Die DNA wurde sowohl nach dem Doppelverdau des Vektors und des Inserts als auch nach der Ligation gefällt. Dieses Verfahren wurde angewandt, um die DNA von Salzen zu reinigen und um die Proteine zu inaktivieren.

- Phenol/Chloroform mit Ansatz im Verhältnis 1:1 mischen und kräftig vortexen
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren (Biofuge Pico, Heraeus)
- Ethanol-Fällung der oberen Phase mit LiCl:  
Zugabe von  $\frac{1}{10}$  x Volumen 4 M LiCl  
Zugabe von 2,5 x Volumen 98 % Ethanol (-20 °C)
- 45 min bei -20 °C fällen
- 30 min bei 13.000 Upm (4 °C) zentrifugieren (Sigma 4K15, Rotor 12167, Braun)
- DNA-Pellet 2 x 5 min mit 70 % Ethanol waschen (Sigma 4K15, Braun)
- DNA-Pellet 10 min bei 60 °C trocknen
- DNA in 15  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  resuspendieren

## 6.9 Klonierung von PCR-Amplifikaten

### 6.9.1 TOPO-TA Cloning<sup>®</sup>

Um PCR-Amplifikate zur Sequenzierung oder weiteren Klonierung in den Vektoren anwenden zu können, wurde der TOPO TA cloning<sup>®</sup> Kit (Fa. Invitrogen, Paisley) verwendet.

#### Klonierungsansatz:

PCR-Produkt bzw. Reisolat	4	µl
Salt Solution	1	µl
TOPO <sup>®</sup> II-Vektor	1	µl

Die Transformation in chemisch kompetenten *E. coli* TOP10 [pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>] erfolgte durch Hitzeschock und abweichend von der Vorschrift wurden die Zellen nicht mit 2 µl, sondern mit dem kompletten Klonierungsansatz von 6 µl transformiert. Die Inkubationsschritte wurden mit der maximal angegebenen Dauer durchgeführt.

### 6.9.2 Ligation

Ligationen wurden mit der T4-DNA Ligase (Fermentas) durchgeführt. Die PCR-Amplifikat- bzw. Insert-tragenden Plasmide und Vektoren wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut, in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Reisolierungs-Kit reisoliert. Anschließend wurden das gereinigte Insert und der Vektor zusammen in den Ligationsansatz pipettiert und über Nacht bei 16 °C ligiert.

#### Ligationsansatz:

Ligationspuffer (10x)	2,6	µl
Insert	15,4	µl
Vektor	6,0	µl

T4-Ligase                          2,0 µl

Nach der Ligation erfolgte die Dialyse, die zur Inaktivierung der Ligase und zum Entsalzen des Ligationsansatzes führte. Dazu wurde der komplette Ligationsansatz auf eine sich auf der Oberfläche einer 10 %-igen Glycerinlösung befindenden Membran (Millipore MF-Membrane Filters 0,025 µm) pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der dialysierte Ansatz von der Membran abgenommen und zur Transformation eingesetzt.

### **6.10 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen**

Die *E. coli*-Zellen sind bei der Elektroporation hohen Feldstärken ausgesetzt, deswegen muß die Leitfähigkeit des Mediums sehr gering gehalten werden:

- 400 ml LB-Medium mit  $\frac{1}{100}$  Volumen einer frischen Übernachtskultur animpfen
- Kultur bei 37 °C und 220 Upm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub>= 0,4 - 0,5 wachsen lassen
- 15 min zentrifugieren (4 °C, 4.000 x g)
- Bakteriensediment in 400 ml eiskaltem, sterilem bidestiliertem H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> waschen und danach 15 min zentrifugieren (4 °C, 4.000 x g)
- Zellen in 200 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> resuspendieren
- 15 min zentrifugieren (4 °C, 4.000 x g)
- Zellen in 20 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendieren
- 15 min zentrifugieren (4 °C, 4.000 x g)
- Zellen in 2 ml eiskaltem 10 % Glycerin resuspendieren

Durch den letzten Zentrifugationsschritt wurden die *E. coli*-Zellen zu einem Titer von  $3 \times 10^{10}$  Zellen/ml konzentriert. Aliquots zu 50 µl wurden bei -70 °C gelagert (Hanahan, 1983).

## 6.11 Transformation

### 6.11.1 Transformation durch Elektroporation

Die chemisch kompetenten *E. coli*-Expressionsstämme (Hanahan et al., 1991) wurden in einem Gene Pulser™ (Bio Rad) und einem dazugehörigen Pulse Controller (Bio Rad) mit Plasmiden transformiert.

Elektroporationsprotokoll für *E. coli*:

- Zellen, dialysierter Ligationsansatz, Elektroporationsküvetten (peqlab) auf Eis vorkühlen
- Transformationsmix: 50 µl elektrokompetente Zellen + kompletter Ligationsansatz (ca. 20 µl)
- Transformationsmix in eisgekühlte, trockene Elektroporationsküvette pipettieren
- Geräteeinstellungen: 2,5 kV, 25 µF, 400 Ω
- nach der Elektroporation direkt 0,5 ml SOC-Medium zur Regeneration der Zellen zugeben
- Zellen aus der Elektroporationsküvette in ein Eppendorfgefäß überführen und 60 min bei 37 °C, 220 Upm regenerieren lassen
- Transformationsansätze auf LB<sub>Kan</sub><sup>-</sup> bzw. LB<sub>Amp</sub><sup>-</sup>-Platten ausplattieren

Die Selektion der Transformanden erfolgte durch die entsprechenden Antibiotikaresistenzen des jeweiligen Vektors.

### 6.11.2 Transformation durch Hitzeschock

Die Top10-Zellen (Invitrogen) wurden mit dem TOPO®-II-Plasmid durch Hitzeschock bei 42 °C transformiert. Die Selektion erfolgte durch Kanamycinresistenz des Vektors und Blau-Weiß-Screening (Brown, 1999).

- TOPO-Klonierungsansatz 30 min bei RT inkubieren
- One Shot<sup>®</sup> Chemically Competent *E. coli*-Zellen auf Eis auftauen
- Klonierungsansatz zu den kompetenten *E. coli*-Zellen geben und sanft invertieren
- 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock des Transformationsansatzes für 30 sec bei 42 °C
- Transformationsansatz direkt auf Eis platzieren und 250 µl SOC-Medium zugeben
- Zellen 1 h horizontal bei 37 °C und 220 Upm regenerieren lassen
- Transformationsansatz auf drei LB<sub>Kan</sub>-Platten, die zuvor mit 80 µl einer 2 % X-Gal Lösung versetzt wurden, ausplattieren und über Nacht bei 37 °C inkubieren

### 6.11.3 *Colony-PCR*

Um die Ergebnisse der Ligation (und Transformation) schnell und effizient überprüfen zu können, wurde eine *Colony-PCR* durchgeführt. Diese Methode basiert auf einer PCR, bei der die einzelnen bakteriellen Kolonien als Template verwendet werden. Sie ersetzt die übliche Prozedur von Anzucht, Plasmid-Präparation und Restriktionsverdau. Nebenbei wird direkt die richtige Orientierung des gewünschten Inserts überprüft, da es in seltenen Fällen zu einer Fehlligation kommen kann (Gussow und Clackson, 1989). Die *Colony-PCR* beruht auf dem Vorhandensein genspezifischer Primer, die im Plasmid eine Sequenz bekannter Länge amplifizieren. Die Kolonien, die im Kontrollgel ein Amplifikat der erwarteten Größe aufweisen, enthalten mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit das gewünschte Insert. Bei dieser Methode werden die ganzen Zellen in Form einer gepickten Kolonie eingesetzt. Die Zellen werden auf Grund der Hitze während der PCR soweit destabilisiert, dass Plasmid-DNA austreten kann. Sofern das Plasmid das gewünschte Insert enthält, wird es mit Hilfe der genspezifischen Primer amplifiziert und anschließend in einem Agarosegel detektiert. Parallel zum PCR-Ansatz wird eine Replikaplatte aus LB<sub>Kan</sub>- bzw. LB<sub>Amp</sub>-Medium erstellt, so dass die positiven Klone erhalten bleiben und weiter verwendet werden können.



PCR-Ansatz:

AxonTaq Buffer (10x)	0,50 µl
Axon MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,30 µl
dNTP's (10 mM)	0,10 µl
DMSO	0,40 µl
forward Primer	0,10 µl
reverse Primer	0,10 µl
AxonTaq Polymerase	0,04 µl
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	ad 5 µl

- Mastermix in 0,2 ml PCR-Gefäße vorlegen
- Klon mit einer sterilen Pipettenspitze von der LB<sub>Kan</sub>- bzw. LB<sub>Amp</sub>-Platte in den Mastermix überimpfen
- Mit der gleichen Spitze auf der Replikplatte ausstreichen und über Nacht bei 37 °C inkubieren
- PCR nach Tabelle 12 durchführen
- PCR-Produkte mit 1 µl Probenpuffer versetzen und in einem 1 %-igen Agarosegel auftrennen (vgl. Kapitel II-6.4)

**Tabelle 12: Colony-PCR-Programm.** Es wurden 25 Zyklen (Schritt 2 – 4) im TGradient-Cycler (Whatman Biometra®) durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	95	5
2. Denaturierung	95	1
3. Annealing	XX	0,5
4. Elongation	72	1
5. Finale Elongation	72	7
7. Abkühlung	4	-

XX = Annealingtemperatur 5 °C niedriger als Schmelztemperatur des Primers

## 6.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Didesoxynucleotid-Verfahren mit Hilfe des automatischen Sequenzierers LiCor 4200 (MWG-Biotech). Die Sequenzierreaktion wurde mit dem CycloReader™ Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas) nach den Herstellerangaben durchgeführt. Das Verfahren der Didesoxy-Sequenzierung (Sanger et al., 1977) basiert auf der partiellen Neusynthese eines DNA-Stranges anhand einer vorgegebenen Matrize mit gezieltem Kettenabbruch. Dieser wird durch ein Didesoxynucleotid erreicht. Die Wirkung der 2',3'-Didesoxynucleotide auf die DNA-Polymerase beruht auf dem Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe, die an der Bildung der Phosphodiesterbindung zwischen Desoxyribose und Nucleosidmonophosphat beteiligt ist. Fehlt sie, so kann diese Bindung nicht gebildet werden und die Polymerisationsreaktion bricht ab.

Alternativ wurde der Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) genutzt, um die Sequenz der Proben zu bestimmen.

### 6.12.1 Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungs-PCR wurde mittels CycloReader™ Auto DNA Sequencing Kit (Fermentas) durchgeführt. Für jede analysierte Sequenz, bzw. jeden verwendeten Primer wurden vier PCR-Ansätze hergestellt, die sich jeweils durch ein Didesoxynucleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) als Terminator im Nucleotidgemisch unterscheiden haben.

Nach der Sequenzierungs-PCR wurden die Proben mit 3 µl Stop Lösung versetzt. Die Reaktionsansätze mussten vor der Sequenzierung zusätzlich 3 min bei 70 °C denaturiert werden.

**Tabelle 13: Sequenzierungs-PCR-Programm.** Es wurden 25 Zyklen (Schritt 2-4) im TGradient-Cycler (Whatman Biometra®) durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	94	3
2. Denaturierung	94	0,5
3. Annealing	XX	0,5
4. Elongation	72	1
7. Abkühlung	4	-

XX = Annealingtemperatur 5 °C niedriger als Schmelztemperatur des Primers

### 6.12.2 TempliPhi®-Reaktion

Der TempliPhi® DNA Amplification Kit (Amersham Biosciences) fand dann Anwendung, wenn eine Verbesserung der Sequenzierung und der Leselänge bei Sequenzierungen von Inserts im pET24a(+)-Vektor erforderlich war. In diesem Verfahren lagern sich die Hexamer-Primer an die zirkuläre Template-DNA an multiplen Orten an. Die Phi29 DNA-Polymerase verlängert jeden dieser Primer. Wenn die DNA-Polymerase einen downstream verlängerten Primer erreicht, kommt es zu einer Strang-Ablösungs-Synthese. Der abgelöste Strang wird zu einem Einzelstrang und steht für weitere Hexamer-Primer zur Verfügung. Der Prozess setzt sich fort und resultiert in einer exponentiellen, isothermalen Amplifikation.

- Probenvorbereitung: entweder 0,2 - 0,5 µl Übernacht-Kultur oder ein Teil einer Kolonie oder 1 pg-10 ng DNA (Vol. < 0,5 µl) zu 5 µl Probenpuffer geben
- Denaturierung der Probe: auf 95 °C für 3 min erhitzen, Abkühlen auf 4 °C
- TempliPhi-Premix: Für jede Probe: 5 µl Reaktionspuffer + 0,2 µl Enzym-Mix
- 5 µl Premix zu der gekühlten, denaturierten Probe zugeben
- Bei 30 °C für 4 – 18 h inkubieren
- Inaktivierung der Enzyme (nur bei Proben, die länger aufbewahrt werden): bei 65 °C für 10 min inkubieren und danach auf 4 °C abkühlen
- Sequenzierungs-PCR: entweder 1 - 2 µl (150 – 500 ng) der amplifizierten Probe oder falls Probe viskos ist, mit 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> verdünnen, gut mischen

- 2 - 10 µl der verdünnten Probe zu den 21 µl Sequenzierungs-PCR-Mix geben

Amplifizierte Proben konnten bei -20 °C bis zu einem Monat aufbewahrt werden.

### **6.12.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Oligonucleotide erfolgte in einem 6 % Polyacrylamidgel (Dicke 0,5 mm). Formamid und Harnstoff im Gel sorgten für denaturierende Bedingungen. Das Gel wurde mit einer Heizplatte auf 50 °C erhitzt, was eine Renaturierung der DNA verhindert hat. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 1500 V und einer Stromstärke von 37 mA durchgeführt. Vor der eigentlichen Elektrophorese fand eine fünfzehnminütige Vorelektrophorese statt, um nicht polymerisiertes Acrylamid zu entfernen.

#### Sequenziergel-Mix:

Sequagel XR	30 ml
Sequagel Complete	7,5 ml
Formamid	4,0 ml
Rotiphorese Gel 40	1,0 ml
APS (10 %)	1,0 ml

### **6.12.4 Auswertung der Sequenzdaten**

Die Ermittlung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des Softwareprogrammes „DNASTAR“ (Lasergene). Die enthaltenen Daten wurden anhand des NCBI Service ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast)) mit den in der Datenbank hinterlegten Sequenzen verglichen. Dieses Computerprogramm verwendet den BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997). Schematische Darstellungen von Restriktionsschnittstellen, Primer-Positionen und paarweise Alignments wurden mit dem Programm Vektor NTI (Informax) erstellt.

## 7 Klonierung und heterologe Expression der 1,5-AF Reduktase-AFR-(His)<sub>6</sub> aus *S. meliloti* 1021

### 7.1 *afr*-Gen Amplifikation aus der genomischen DNA

Das *afr*-Gen wurde aus der genomischen DNA aus *S. meliloti* mittels FidelityTaq™ Polymerase amplifiziert:

#### PCR-Ansatz:

FidelityTaq™ Buffer (10x)	5,0 µl
dNTP's (10 mM)	1,5 µl
mel_forw	1,0 µl
mel_rev	1,0 µl
Template	1,0 µl
FidelityTaq™ Polymerase	0,3 µl
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	ad 50 µl

Die PCR-Produkte wurden in *E. coli* TOP10 [pCR®II-TOPO] kloniert (vgl. II-6.9.1) und sequenziert (vgl. II-6.12). Die Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut (vgl. II-6.4) und im 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. II-6.5). Anschließend erfolgte eine Reisolation des Fragmentes mittels MinElute™ Gel Extraction Kit der Firma Qiagen. Das aufgereinigte Amplifikat wurde in einer nächsten PCR als Template eingesetzt, allerdings wurden hier die Primer 5'mel\_Bam/Hind\_for und 3'mel\_His/Xho/Eco\_rev verwendet. So wurde das *afr*-Gen mit zusätzlichen Klonierungsschnittstellen und einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>tag versehen. Für diese Amplifikation wurde das gleiche PCR-Programm verwendet (Tabelle 14). Die Produkte wurden im 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. II-6.5), mittels MinElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) reisoliert und über *Bam*HI–*Hind*III Schnittstellen mit dem Expressionsvektor pET24a(+) ligiert (vgl. II-6.9.2). Anschließend erfolgte die Transformation in die *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen (vgl. II-6.11.1). Der Erfolg der Ligation wurde mittels *Colony*-PCR (vgl. II-6.11.3) überprüft. Das erhaltene Konstrukt wurde sequenziert (vgl. II-6.12).

**Tabelle 14: PCR-Programm Fideli.** Es wurden 35 Zyklen (Schritt 2-4) im TGradient-Cycler (Whatman Biometra®) durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	94	2
2. Denaturierung	94	0,5
3. Annealing	64	0,5
4. Elongation	68	1,5
5. Finale Elongation	68	5
6. Abkühlung	4	-

## 7.2 Expression von AFR-(His)<sub>6</sub> in *E. coli* BL21(DE3)Gold

*E. coli* BL21(DE3)Gold enthält im Chromosom integriert eine Kopie des Gens für die T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promoters. Der Promotor kann durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) induziert werden. Die Expression wird induziert, sobald die T7 RNA-Polymerase von der Wirtszelle zur Verfügung gestellt wird. Diese Polymerase ist so selektiv und aktiv, dass fast alle Zellreserven zur Expression des rekombinanten Gens herangezogen werden.

### 7.2.1 Expression in Schüttelkultur

Die Anzucht von *E. coli* BL21(DE3)Gold mit *afr*-tragendem Plasmid pET24a(+) erfolgte bei 37 °C in 250 ml Pepton/Trypton-Medium mit Zusatz von Kanamycin (25 µg/ml). Die Hauptkultur wurde mit 25 ml Vorkultur beimpft. Die Überexpression von AFR-(His)<sub>6</sub> wurde bei OD<sub>600</sub> von ca. 2,6 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration im Medium 100 µM) induziert.

### 7.2.2 Expression in 2 Liter-Bioreaktor

Um größere Zellmassen zu erhalten, wurden die *E. coli*-Zellen in einem 2 Liter Bioreaktor kultiviert. Im Bioreaktor befand sich 1,5 L Pepton/Trypton-Medium mit

Kanamycin. Zur Anzucht im Fermenter wurde eine 50 ml Vorkultur vorbereitet. Diese wurde mit 10 µl Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C, 220 Upm kultiviert. Der Bioreaktor wurde mit 50 ml Vorkultur beimpft und bei  $OD_{600}=2,6$  wurde die Expression von AFR-(His)<sub>6</sub> durch Zugabe von IPTG induziert. Die Kultivierung erfolgte unter definierten Bedingungen: Temperatur 37 °C, Rührgeschwindigkeit 500 Upm, Belüftung 4 L Luft/min. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 M NaOH und 0,5 M HCl konstant auf pH 6,8 gehalten. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte  $OD_{600}$  stündlich verfolgt. Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung der AFR-(His)<sub>6</sub>-Aktivität.

## 8 Klonierung und heterologe Expression der Monooxygenasen aus *S. meliloti* 1021

### 8.1 Amplifikation des *Y01812*-Genes aus der genomischen DNA

Das *Y01812*-Gen wurde aus der genomischen DNA von *S. meliloti* mittels Fidelity™ Polymerase amplifiziert:

#### PCR-Ansatz:

Fidelity™ Buffer (10x)	5,0 µl
dNTP's (10 mM)	1,5 µl
sm mono forw bzw.	1,0 µl
sm mono/Hind rev His bzw.	1,0 µl
Template	1,0 µl
Fidelity™ Polymerase	0,3 µl
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	ad 50 µl

**Tabelle 15: PCR-Programm Fideli.** Es wurden 35 Zyklen (Schritt 2-4) im TGradient-Cycler (Whatman Biometra®) durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	94	2
2. Denaturierung	94	0,5
3. Annealing	64	0,5
4. Elongation	68	2,0
5. Finale Elongation	68	5
6. Abkühlung	4	-

Das PCR-Produkt wurde in *E. coli* TOP10 [pCR®II-TOPO] kloniert (vgl. II-6.9.1) und sequenziert (vgl. II-6.12). Die Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut (vgl. II-6.4) und im 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. II-6.5). Anschließend erfolgte eine Reisolation des Fragmentes mittels MinElute™ Gel Extraction Kit der Firma Qiagen. Das gereinigte Amplifikat wurde in der nächsten PCR als Template eingesetzt, allerdings wurden hier die Primer 5'mel\_Bam/Hind\_for und 3'mel\_His/Xho/Eco\_rev verwendet. So wurde das Monooxygenase-Gen mit zusätzlichen Klonierungsschnittstellen und einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>tag versehen. Für diese Amplifikation wurde das gleiche PCR-Programm verwendet (Tabelle 15). Die Produkte wurden im 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. II-6.5), mittels MinElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) reisoliert und über *BamHI*–*HindIII* Schnittstellen in den Expressionsvektor pET24a(+) ligiert (vgl. II-6.9.2). Anschließend erfolgte die Transformation in die *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen (vgl. II-6.11.1). Der Erfolg der Ligation wurde mittels *Colony*-PCR (vgl. II-6.11.3) überprüft. Das erhaltene Konstrukt wurde sequenziert (vgl. II-6.12).

## 8.2 Amplifikation des Y02579-Genes aus der genomischen DNA

Das Y02579-Gen wurde aus der genomischen DNA von *S. meliloti* mittels FideliTaq™ Polymerase amplifiziert:



PCR-Ansatz:

FideliTaq™ Buffer (10x)	5,0 µl
dNTP's (10 mM)	1,5 µl
sm 2579 BamHI forw	1,0 µl
sm 2579 HindIII EcoRI His rev	1,0 µl
Template	1,0 µl
FideliTaq™ Polymerase	1,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	ad 50 µl

Für die Amplifikation des *Y02579*-Genes wurde das gleiche PCR-Programm wie unter 8.1 beschrieben (Tabelle 15) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde in *E. coli* TOP10 [pCR®II-TOPO] kloniert (vgl. II-6.9.1) und sequenziert (vgl. II-6.12). Das Monooxygenase-Gen wurde direkt mit zusätzlichen Klonierungsschnittstellen und C-terminalem (His)<sub>6</sub>tag versehen. Das *Y02579*-Insert wurde mit *Bam*HI und *Hind*III präparativ verdaut (vgl. II-6.4) und in den linearisierten pET24a(+) Vektor ligiert (vgl. II-6.9.2). Anschließend erfolgte die Transformation in die *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen (vgl. II-6.11.1). Der Erfolg der Ligation wurde mittels *Colony*-PCR (vgl. II-6.11.3) überprüft.

### 8.3 Expression in *E. coli* BL21(DE3)Gold

#### 8.3.1 Anzucht von MO1812-(His)<sub>6</sub>

Die Anzucht von *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen mit *Y01812*-tragendem Plasmid pET24a(+) erfolgte in 250 ml Pepton/Trypton-Medium mit Zusatz von Kanamycin (25 µg/ml). Die Hauptkultur wurde mit 25 ml Vorkultur beimpft. Die Kultivierung bis zur Induktion wurde bei 37 °C durchgeführt. Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 2 wurde die Expression der MO1812-(His)<sub>6</sub> durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration im Medium 100 µM) induziert. Nach der Induktion wurde die Kultivierung bei 20 °C über 24 h weitergeführt. Durch die niedrigere Temperatur wurde die Bildung von *inclusion bodies* reduziert (Schein und Noteborn, 1988).

### 8.3.2 Anzucht von MO2579-(His)<sub>6</sub>

Die Anzucht der Y02579-enthaltenden *E. coli*-Zellen wurden bis zur Induktion wie unter 8.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Induktion erfolgte bei OD<sub>600</sub>=1 mittels IPTG (Endkonzentration im Medium 100 µM). Nach der Zugabe von IPTG wurden die Zellen weiter bei 37 °C über 24 h kultiviert.

## 9 Bestimmung der P450-Konzentration

Die Konzentration des Cytochroms P450 kann photometrisch mit Hilfe des CO-Differenzspektrums bestimmt werden. Dabei wird die charakteristische Absorption der Häm-Gruppe in reduziertem, Kohlenmonoxid-gebundenen Zustand genutzt (Omura und Sato, 1964). Für diese Messung wird 1 ml Enzymlösung benötigt, die zur Reduktion des Häm-Eisens (von Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup>) mit einer Spatelspitze Natriumdithionit versetzt und anschließend auf zwei Küvetten aufgeteilt wird. Eine dieser Küvetten wird eine Minute lang mit CO begast. Direkt nach der Begasung erfolgt die Aufnahme des Absorptionsspektrums der mit CO-behandelten Probe im Bereich von 400 nm bis 500 nm, das Spektrum der unbegasten Probe wird von dieser Messung abgezogen. Die P450-Konzentration wird aus der Absorptionsdifferenz zwischen 450 und 490 nm nach der Formel des Lambert-Beerschen Gesetz unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten  $E = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  errechnet.

## 10 Klonierung der Putidaredoxin-Reduktase (PdR) und Putidaredoxin (Pdx) aus *Pseudomonas putida*

### 10.1 Amplifikation des *camA*-Genes aus der Plasmid-DNA

Das *camA*-Gen kodiert für die Putidaredoxin-Reduktase (PdR). Es wurde mittels Herculase<sup>®</sup> II Phusion DNA Polymerase aus der Plasmid-DNA von *P. putida* amplifiziert:

PCR-Ansatz:

Herculase <sup>®</sup> Buffer (5x)	10,0 µl
dNTP's (10 mM)	1,50 µl
camA Koga forw	1,25 µl
camA Koga rev	1,25 µl
Template	1,00 µl
Herculase <sup>®</sup> -Polymerase	1,00 µl
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	ad 50 µl

**Tabelle 16: PCR-Programm Herculase<sup>®</sup>.** Es wurden 30 Zyklen (Schritt 2-4) im TGradient-Cycler (Whatman Biometra<sup>®</sup>) durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	95	2
2. Denaturierung	95	0,3
3. Annealing	64	0,3
4. Elongation	72	1,5
5. Finale Elongation	72	3
6. Abkühlung	4	-

Das PCR-Produkt wurde im 1 %-igen Agarosegel zur Kontrolle aufgetrennt (vgl. II-6.5), anschließend in *E. coli* TOP10 [pCR<sup>®</sup>II-TOPO] kloniert (vgl. II-6.9.1) und sequenziert (GATC Biotech AG). Die Plasmid-DNA [pcamA] wurde als Template in die zweite PCR eingesetzt, mit der zusätzliche Restriktionsschnittstellen und eine Linker-Sequenz in das Gen eingefügt wurden. Dazu wurden folgende Primer verwendet: PdR NdeI forw und PdR BamHI rev. Es wurde der gleiche PCR-Ansatz und das gleiche PCR-Programm wie in der Tabelle 16 verwendet. Die Amplifikation erfolgte auch mit Hilfe der Herculase<sup>®</sup> II Phusion DNA Polymerase. Das Plasmid [pcamA-Linker] wurde anschließend mit *Bam*HI-*Nde*I präparativ verdaut (vgl. II-6.4), das Insert aus dem Gel mittels MinElute<sup>™</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen) reisoliert und in die Ligation mit anderen Komponenten (Pdx, MO1812-(His)<sub>6</sub>) eingesetzt (vgl. II-6.9.2).

## 10.2 Amplifikation des *camB*-Genes aus der Plasmid-DNA

Das *camB*-Gen kodiert für Putidaredoxin (Pdx). Es wurde mittels Herculanse® II Phusion DNA Polymerase aus der Plasmid-DNA den *P. putida* amplifiziert:

### PCR-Ansatz:

Herculase® Buffer (5x)	10,0 µl
dNTP's (10 mM)	1,50 µl
camB forw	1,25 µl
camB rev	1,25 µl
Template	1,00 µl
Herculase®-Polymerase	1,00 µl
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	ad 50 µl

**Tabelle 17: PCR-Programm Herculanse®.** Es wurden 30 Zyklen (Schritt 2-4) im TGradient-Cycler (Whatman Biometra®) durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	95	2
2. Denaturierung	95	0,3
3. Annealing	64	0,3
4. Elongation	72	0,5
5. Finale Elongation	72	3
6. Abkühlung	4	-

Das PCR-Produkt wurde im 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. II-6.5) und in *E. coli* TOP10 [pCR®II-TOPO] kloniert (vgl. II-6.9.1). Anschließend wurde die Sequenz bestimmt (GATC Biotech AG). Die Plasmid-DNA [pcamB] wurde als Template in die zweite PCR eingesetzt, in der zusätzliche Restriktionsschnittstellen und eine Linker-Sequenz in das Gen eingefügt wurden. Dazu wurden folgende Primer verwendet: Pdx BamHI forw und Pdx EcoRI rev. Es wurde der gleiche PCR-Ansatz und das gleiche PCR-Programm verwendet (Tabelle 17). Die Amplifikation erfolgte auch mit

Hilfe der Herculase<sup>®</sup> II Phusion DNA Polymerase. Das Plasmid [pcamB-Linker] wurde anschließend mit *Bam*HI-*Eco*RI präparativ verdaut (vgl. II-6.4), das Insert aus dem Gel mittels MinElute<sup>™</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen) reisoliert und in die Ligation mit anderen Komponenten (PdR, MO1812-(His)<sub>6</sub>) eingesetzt (vgl. II-6.9.2). Das erhaltene Konstrukt wurde sequenziert (GATC Biotech AG).

## 11 Die Fusionsproteine PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> und PdR/Pdx

### 11.1 Herstellung des Konstruktes PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>

Das Protein PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> wurde in zwei Ligationsschritten erzeugt. Zuerst wurde das Insert in dem Plasmid [pcamA-Linker] mit *Bam*HI-*Nde*I präparativ verdaut (vgl. II-6.4), aus dem Gel mittels MinElute<sup>™</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen) reisoliert und in die Ligation mit dem mittels *Bam*HI-*Nde*I verdauten pET24a(+) Vektor eingesetzt (vgl. II-6.9.2). Der Ligationsansatz wurde dialysiert und in die Transformation von *E. coli* TOP10-Zellen eingesetzt (vgl. II-6.11.1). Der Erfolg dieser Ligation wurde mittels *Colony*-PCR überprüft (vgl. II-6.11.3), anschließend wurde ein positiver Klon ausgewählt, der als Zielvektor für die zweite Ligation diente. Dieser wurde mit *Bam*HI-*Eco*RI präparativ verdaut (vgl. II-6.4) und mit dem Insert [pcamB], das mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut wurde, ligiert (vgl. II-6.9.2). Nach der anschließenden Dialyse wurde das Konstrukt pcamA/camB+b in die *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (vgl. II-6.11.1). Nachträglich wurde ein C-terminaler (His)<sub>6</sub>tag in das Konstrukt eingefügt, dabei wurden folgende Primer verwendet: PdR *Nde*I forw und camB *Eco*RI rev His.

#### PCR-Ansatz:

FideliTaq Buffer (10x)	5,0 µl
dNTP's (10 mM)	1,5 µl
PdR <i>Nde</i> I forw	1,0 µl
camB <i>Eco</i> RI rev His	1,0 µl
Template	1,0 µl
FideliTaq Polymerase	1,0 µl

H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub>

ad 50 µl

**Tabelle 18: PCR-Programm Fideli.** Es wurden 35 Zyklen (Schritt 2-4) im TGradient-Cycler (Whatman Biometra®) durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	94	2
2. Denaturierung	94	0,5
3. Annealing	58	0,5
4. Elongation	68	1,15
5. Finale Elongation	68	5
6. Abkühlung	4	-

Das PCR-Produkt wurde nach der Kontrolle mittels 1 %-igem Agarosegel in *E. coli* TOP10 [pCR®II-TOPO] kloniert (vgl. II-6.9.1) und sequenziert (GATC Biotech AG). Nach der Sequenzierung wurde das Konstrukt in zwei Expressionsvektoren, pET24a(+) und pET17b, umkloniert. Hierfür wurde ein präparativer Verdau (vgl. II-6.4) des leeren pET24a(+)-, des leeren pET17b- und des pcamA/camb-His-Plasmids mittels *NdeI-EcoRI* durchgeführt. Anschließend wurden die Verdauansätze im 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. II-6.5). Nach dem die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel reisoliert wurden (MinElute™ Gel Extraction Kit, Qiagen), erfolgte die Ligation (vgl. II-6.9.2). Anschließend wurden die erhaltenen Konstrukte pcamA/camb-His+ und pcamA/camb-His+b in die *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen transformiert (vgl. II-6.11.1). Die Ligation wurde mittels *Colony-PCR* überprüft (vgl. II-6.11.3).

## 11.2 Expression des Fusionproteins PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> in *E. coli* BL21(DE3)Gold

Die Anzucht von PdR/Pdx-tragenden *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen erfolgte in 250 ml Pepton/Trypton-Medium mit Zusatz von Kanamycin (25 µg/ml). Die Hauptkultur wurde mit 25 ml Vorkultur beimpft. Die Kultivierung wurde bis zur Induktion bei 37 °C durchgeführt. Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 2 wurde die Expression der PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>

durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration im Medium 100  $\mu$ M) induziert. Nach der Induktion wurde die Kultivierung bei 20 °C über 24 h weitergeführt, da die niedrigere Temperatur die Bildung von *inclusion bodies* reduziert (Schein und Noteborn, 1988).

### 11.3 Herstellung des Konstruktes PdR/Pdx

Das Konstrukt PdR/Pdx wurde für die Herstellung des Fusionsproteins PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> erzeugt. Zuerst wurden beide *cam*-Gene mit folgenden Primer erneut amplifiziert: PdR NdeI forw mit PdR BamHI rev und Pdx BamHI forw mit Pdx EcoRI rev. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um die Stopkodons der beiden Gene zu entfernen, was für die Expression als einzelnes Protein zusammen mit der Monooxygenase notwendig war, und um in das *camA*-Gen eine Linkersequenz einzufügen. Beide Amplifikate wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. II-6.4), aus dem Gel mittels MinElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) reisoliert und in die Ligation mit dem linearisierten pET24a(+)-Vektor eingesetzt (vgl. II-6.9.2). Beide Ligationsansätze wurde dialysiert und in die Transformation von *E. coli* TOP10-Zellen eingesetzt (vgl. II-6.11.1). Der Erfolg dieser Ligation wurde mittels *Colony*-PCR überprüft (vgl. II-6.11.3), anschließend wurde ein positiver Klon von jedem Ligationsansatz ausgewählt und nach der Plasmidreinigung sequenziert (GATC Biotech AG). Anschließend wurden beide Plasmide pcamA+ und pcamB+ mit *Bam*HI und *Nde*I Restriktionsenzymen verdaut (vgl. II-6.4), dabei wurde das *camA*-Gen aus dem Vektor ausgeschnitten und das Plasmid pcamB wurde linealisiert. Nach der Auftrennung beider Verdauansätze im 1 %-igen Agarosegel wurden die gewünschten DNA-Fragmente reisoliert (MinElute™ Gel Extraction Kit, Qiagen) und in ein Ligationsansatz zusammenpipettiert (vgl. II-6.9.2). Nach der anschließenden Dialyse wurde das Konstrukt pcamA/camB+ in die *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (vgl. II-6.11.1). Die Ligation wurde unter Anwendung einer *Colony*-PCR überprüft (vgl. II-6.11.3).

## 12 Das Fusionsprotein PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub>

### 12.1 Herstellung des Konstruktes PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub>

Dieses Konstrukt wurde erstellt, um eine selbstständige Monooxygenase aus *S. meliloti* zu kreieren. Als Zielvektor wurde pMO1812smHis<sup>+</sup> verwendet. Das Konstrukt camA/camB wurde mittels *NdeI-EcoRI* aus dem Plasmid pcamA/camB<sup>+</sup> ausgeschnitten (vgl. II-6.4) und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen verdauten pMO1812smHis<sup>+</sup> ligiert (vgl. II-6.9.2). Nachdem der Ansatz durch Dialyse entsalzt wurde, erfolgte die Transformation der *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen mit dem Konstrukt pcamA/camB-MO1812smHis<sup>+</sup> (vgl. II-6.11.1). Die Ligation wurde wie üblich mit einer *Colony-PCR* (vgl. II-6.11.3) überprüft. Zusätzlich wurde auch ein Kontrollverdau durchgeführt (vgl. II-6.4).

### 12.2 Expression des Fusionproteins PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> in *E. coli* BL21(DE3)Gold

Die Expression wurde in Kanamycin-haltigem Pepton/Trypton-Medium durchgeführt. 250 ml Medium wurden mit 25 ml Übernachtskultur beimpft und bis zur OD<sub>600</sub> von ca. 1,5 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,5 wurde die Expression des Fusionproteins PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> durch Zugabe von 250 µl IPTG (Endkonzentration im Medium 100 µM) induziert. Das weitere Wachstum erfolgte bei 28 °C.

## 13 Spektromaufnahme des PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> Proteins

Die Putidaredoxin-Reduktase ist ein Flavoprotein. Um die kovalente Bindung des FADs in dem Fusionprotein PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> zu bestätigen, wurde ein Spektrum aufgenommen. Das gereinigte Protein wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml für die Messung eingesetzt. Die Aufnahme erfolgte im Bereich von 250 nm bis 700 nm im Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) in



Quarzküvetten bei Raumtemperatur gegen 100 mM Tris, pH 7,5. Der Absorptionsverlauf wurde automatisch registriert, der Wellenlängenvorschub betrug 16,6 nm/sec.

#### **14 Coexpression der MO1812-(His)<sub>6</sub> mit dem Fusionprotein PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>**

Für die Coexpression der MO1812-(His)<sub>6</sub> mit dem PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>-Protein wurden zwei Expressionsplasmide verwendet: pET17b und pET24a(+). Diese wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen ausgewählt, was die gleichzeitige Expression ermöglichte. Das Plasmid pET17b verfügt über Resistenz gegenüber Ampicillin, pET24a(+) gegenüber Kanamycin. In diesem Experiment wurden elektrokompetente MO1812-(His)<sub>6</sub>-tragende *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen hergestellt (vgl. II-6.10) und mit dem PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>-tragenden pET17b-Vektor (pcamA/camB-His+b) transformiert (vgl. II-6.11.1). Die Anzucht in kleinem Maßstab erfolgte auf dem LB<sub>Kan+Amp</sub> Medium, um beide Plasmide in den Zellen zu erhalten. Die Anzucht von *E. coli* BL21(DE3)Gold mit MO1812-tragendem Plasmid pET24a(+) und mit PdR/Pdx-tragendem Plasmid pET17b in größerem Maßstab erfolgte auf 250 ml Pepton/Trypton-Medium mit Zusatz von Kanamycin (25 µg/ml) und Ampicillin (25 µg/ml). Die Hauptkultur wurde mit 25 ml Vorkultur beimpft. Die Kultivierung wurde bis zur Induktion bei 37 °C durchgeführt. Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 2 wurde die Expression der MO1812-(His)<sub>6</sub> und des Fusionsproteins PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration im Medium 200 µM) induziert. Nach der Induktion wurde die Kultivierung bei 28 °C über 24 h weitergeführt. Durch die niedrigere Temperatur wurde die Bildung von *inclusion bodies* reduziert (Schein und Noteborn, 1988).

Als Kontrolle für die anschließenden Aktivitätsmessungen im Rohextrakt der *E. coli*-Zellen wurde eine Kultur von *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen mit PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>-tragendem Plasmid pET17b angezogen. Die Bedingungen für die Kultivierung waren identisch wie die oben beschriebenen.

## **15 Bestimmung des Wachstums**

### **15.1 Optische Dichte**

Das Wachstum der Mikroorganismen wurde durch Messung der optischen Dichte in der Zellsuspension bei der Wellenlänge von 600 nm gegen sterile Nährlösung verfolgt. Diese Messungen wurden in 1 ml-Kunststoffküvetten der Schichtdicke 1 cm und in einem Spektralphotometer (UV-120-02, Shimadzu, Kyoto) durchgeführt.

### **15.2 Wachstumsrate und Verdopplungszeit**

Die optische Dichte wurde halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Aus der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Verdopplungszeit und die Wachstumsrate  $\mu$  berechnet, die ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums in der exponentiellen Wachstumsphase ist.

## **16 Herstellung zellfreier Extrakte**

### **16.1 Zellaufschluss von Rhizobien**

Nach dem Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen pelletiert (10 min, 2700 x g, 4 °C; Evolution RC, Sorvall) und in 3 ml BisTris Puffer (pH 6,5, 20 mM) pro 1 g Feuchtgewicht aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Soniprep). Die Beschallung wurde in 4 Intervallen durchgeführt, jeweils 30 sec bei 20 microns. Zwischen jeder Beschallungsphase wurden die Zellen im Eisbad abgekühlt. Anschließend wurden die Zelltrümmer vom Rohextrakt in einem Zentrifugationsschritt abgetrennt (10 min, 23000 x g, 4 °C; Evolution RC, Sorvall).

## 16.2 Zellaufschluss von *E. coli*

24 h nach der Induktion wurden die *E. coli*-Zellen geerntet. In einem Zentrifugationsschritt von 15 min bei 2700 x g, 4 °C wurden die Zellen pelletiert und von Medium abgetrennt (Evolution RC, Sorvall). Das Zellpellet wurde in 3 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Puffer (pH 7,0, 50 mM), bzw. BisTris Puffer (pH 7,0, 20 mM) pro 1 g Feuchtgewicht resuspendiert und mittels Ultraschall (Soniprep) aufgeschlossen. Die Beschallung erfolgte in 5 Intervallen von 15 sec bei 20 microns. Zwischen jeder Beschallungsphase fand eine Abkühlpause statt, bei der die Zellsuspension für 30 sec auf Eis gekühlt wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension 10 min bei 23000 x g, 4 °C abzentrifugiert (Evolution RC, Sorvall). Der Überstand stellte den zellfreien Extrakt dar und wurde zur weiteren Proteinanreicherung verwendet.

## 17 Anreicherung der rekombinanten Proteine

Alle Anreicherungsmethoden wurden mit Hilfe des FPLC-Systems Äkta Purifier (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Die Detektion der Proteine erfolgte bei 280 nm, für die Monooxygenase und für PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> wurde die Absorption zusätzlich bei 450 nm verfolgt (UV900, Amersham Pharmacia). Die Fraktionen wurden im Fraktionssammler Frac950 (Amersham Pharmacia) aufgenommen.

### 17.1 Affinitätschromatographie

Dieser Anreicherungsschritt erfolgte unter Anwendung einer 1 ml Ni-Sepharose Crude Fast Flow-Säule (Amersham Biosciences). Dieses Material besteht aus stark verknüpften Agarose-Perlen, an die eine Chelatgruppe immobilisiert ist. Das Metallion Nickel (Ni<sup>2+</sup>) ist an die Chelatmatrix gebunden.

Einige Aminosäuren, z.B. Histidinreste, bilden Komplexe mit vielen Metallionen. Ni-Sepharose Crude Fast Flow hält selektiv Proteine zurück, sofern geeignete komplexbildende Aminosäurereste an der Oberfläche des Proteins exponiert vorliegen. Durch eine Modifikation des Proteins mit einem zusätzlichen (His)<sub>6</sub>tag wird die Affinität für Ni<sup>2+</sup> erhöht. Im Allgemeinen binden diese Fusionsproteine am

stärksten im Vergleich zu anderen Proteinen, beispielsweise aus einem *E. coli* - Extrakt.

Die 1 ml Ni-Sepharose Crude Fast Flow-Säule wurde mit Bindingbuffer equilibriert. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit Bindingbuffer gespült. (His)<sub>6</sub>-Fusionsproteine wurden mit Elutionspuffer, der 0,5 M Imidazol enthielt, eluiert. Die Flußrate betrug 1 ml/min bei einer Fraktionsgröße von 2 ml.

## 17.2 Umpufferung

Um die Proben, die nach der Affinitätschromatographie erhalten wurden, weiter anreichern zu können, mussten diese zuerst umgepuffert werden. Dieser Schritt hatte zwei Aufgaben zu erfüllen: er ermöglichte das Entfernen des Imidazols aus der Probe und erlaubte eine schnelle und effiziente Umpufferung der Proteine in einen gewünschten Puffer (zum Beispiel in 50 mM BisTris, pH 7,0 für die Anionenaustauschchromatographie). Die Umpufferung wurde mittels XK26/20 Phenyl Sepharose G25 Säule bei einer Flussrate von 9 ml/min und Fraktionsgröße von 8 ml durchgeführt.

## 17.3 Anionenaustauschchromatographie

Die AFR-(His)<sub>6</sub> bzw. die (His)<sub>6</sub>-Prot-AFR wurde nach der Umpufferung zusätzlich mittels 5 ml Q-Sepharose HP-Säule angereichert. Die Säule wurde mit 50 mM BisTris, pH 7,0 equilibriert. Nach dem Probeauftrag (8 ml AFR-(His)<sub>6</sub>- bzw. die (His)<sub>6</sub>-Prot-AFR-Fraktion aus der Umpufferung) wurde die Säule noch einmal mit dem Equilibrierungspuffer gespült, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der AFR-(His)<sub>6</sub> bzw. (His)<sub>6</sub>-Prot-AFR erfolgte mit einem linearen Gradient, mit dem Elutionspuffer 50 mM BisTris, pH 7,0 und 1 M NaCl. Die Flussrate betrug 5 ml/min, die Fraktionsgröße 1 ml.

## 18 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

### 18.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine entsprechend ihrer Molmasse aufgetrennt. Durch Inkubation mit SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) und Substanzen, die die Disulfid-Brücken reduzieren ( $\beta$ -2-Mercaptoethanol), werden diese vollständig reduziert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine. Die Ladungen der Proteine werden durch das stark negativ geladene SDS verdeckt, so dass sich in der Regel alle Proteine im gleichen Ladungszustand befinden.

Die Reinheit der angereicherten Proteine wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Es wurde die Gelelektrophoreseapparatur der Firma Biorad (Mini Proteon III) verwendet.

Die Gele wurden folgendermaßen zusammengestellt:

#### Trenngel 9 %

Acrylamidstammlösung (40 %)	2,25 ml
Trenngelpuffer	2,50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	5,25 ml
APS-Lösung	50,0 $\mu$ l
TEMED	5,00 $\mu$ l

#### Sammelgel 4 %

Acrylamidstammlösung (40 %)	1,00 ml
Sammelgelpuffer	2,50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	6,50 ml
APS-Lösung	50,0 $\mu$ l
TEMED	10,0 $\mu$ l

Die APS-Lösung wurde frisch angesetzt, alle anderen Lösungen wurden im Kühlschrank bei 4 °C bewahrt. Die Trenngellösung wurde bis zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol durch die Sammelgellösung ersetzt.

Die Proteinproben wurden mit  $\frac{1}{6}$  ihres Volumens an Solubilisierungspuffer versetzt und 10 min im Heizblock bei 100 °C erhitzt. In die Probenaschen wurden 20 µl Probe und 7 µl Protein Marker (Protein Ladder, 11-170 kDa, Fermentas) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung wurde bei 150 Volt durchgeführt.

## **18.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird unter Bedingungen durchgeführt, bei welchen das Protein seine natürliche Konformation behält. Bei pH-Werten von 8 bis 9 sind die meisten Proteine leicht negativ geladen und bewegen sich zur Anode hin, während stark negative Proteine unter diesen Bedingungen in den Kathodenpuffer migrieren und nicht im Gel aufgetrennt werden. Im Gegensatz zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der Proteine nur anhand ihrer Größe aufgetrennt werden, erfolgt bei der nativen Gelelektrophorese eine Trennung nach Ladung und Größe des Proteins.

## **18.3 Coomassie-Färbung**

Die nativen bzw. SDS-PAGE Gele wurden 3 x 30 sec bei 360 Watt in der Mikrowelle (FM411, Moulinex) inkubiert und anschließend mit dem Fixierer solange entfärbt, bis das Gel im Hintergrund farblos war. Die Fixierlösung wurde dabei mehrfach gewechselt (Zehr et al., 1989; Weber und Osborn, 1969).

## **19 Protease-Verdau der 1,5-AF-Reduktase**

Das rekombinante Protein wurde über den (His)<sub>6</sub>tag angereichert. Für die Kristallisation musste der (His)<sub>6</sub>tag abgespalten werden, da die sechs C-terminalen Histidine bei dem Kristallisationsverfahren stören würden. Die Spaltung erfolgte

mittels einer Protease. Für die 1,5-AF-Reduktase hat sich Factor Xa als geeignet erwiesen. Factor Xa ist eine Serin-Endopeptidase. Sie besteht aus zwei Untereinheiten, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Diese Protease ist an der Blut-Koagulationskaskade beteiligt und wandelt Prothrombin zu Thrombin um. Factor Xa spaltet nach dem Arginin-Rest in der bevorzugten Spaltungsseite Ile-(Glu oder Asp)-Gly-Arg.

Die entsprechende Sequenz wurde mit Hilfe der Primer Mel\_BamHI/N-Protease His und Mel\_HindIII in das *afr*-Gen eingefügt. Der (His)<sub>6</sub>tag wurde hier N-terminal direkt nach dem Startkodon generiert, um das native Enzym zu erhalten. Die Factor Xa-Schnittstelle wurde anschließend nach dem (His)<sub>6</sub>tag erstellt. PCR und Klonierung, sowohl in *E. coli* TOP10 [pCR<sup>®</sup>II-TOPO] als auch in den Expressionsvektor pET24a(+), wurden gemäß Kapitel II-7.1, durchgeführt.

Das modifizierte Protein wurde mittels Affinitätschromatographie (vgl. Kapitel II-17.1) angereichert und in 50 mM BisTris, pH 7 umgepuffert (vgl. Kapitel II-17.2). Anschließend erfolgte eine 24 h lange Inkubation bei 25 °C (Wasserbad) mit 100 µg Factor Xa pro 1 mg Fusionsprotein. Nach dem Verdau wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (vgl. Kapitel II-17.3), um den abgespaltenen (His)<sub>6</sub>tag und die Protease aus der Proteinlösung zu entfernen. Anschließend wurde das angereicherte Protein bis zu einer Konzentration von 1,5 ml eingengt (Amicon 8050, 10 kDa Millipore Membran), um das Volumen der Probe zu verringern. Die eingengte Probe wurde zur Kristallisation verwendet.

## 20 Western Blot

Der Western Blot dient der Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Dabei können einzelne Proteine aus Virus-Präparationen, Gesamt-Zell-Protein oder Gewebe-Lysaten nachgewiesen werden. Nach der Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld (SDS-PAGE) werden sie auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene primäre Antikörper wird durch einen sekundären Antikörper, der entweder radioaktiv

markiert oder mit einem Enzym (Peroxidase, Phosphatase etc.) gekoppelt ist, detektiert.

- die Proteinproben zusammen mit dem Protein Marker (Prestained Protein Ruler, Fermentas) in SDS-PAGE auftrennen
- das zurechtgeschnittene Blotting Papier 10 min im Transferpuffer äquilibrieren
- die PVDV Membran mit reinem Methanol benetzen und anschließend im Transferpuffer äquilibrieren
- SDS-Gel im Transferpuffer äquilibrieren
- 1 h bei einer Stromstärke von 60 mA (auf 15 Volt begrenzt) im Perfect Blue™ Semi-Dry Elektrobloetter (peqLab) blotten
- Membran über Nacht, bzw. über 1 h bei Raumtemperatur im Blockingpuffer inkubieren
- Membran 1 h im Inkubationspuffer (Antikörper 1:3000 mit Blockingpuffer verdünnt) bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 mal kurz und anschließend 2 x 5 min mit Waschpuffer waschen
- 1 h mit Sekundärantikörper (1:3000 mit Blockingpuffer verdünnt) bei Raumtemperatur inkubieren
- 1 mal kurz und anschließend 2 x 5 min mit Waschpuffer waschen
- mit 10 ml Färbelösung färben
- sobald farbige Signale sichtbar werden, Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  stoppen

## 21 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA Protein Assay Kit (Pierce) eingesetzt. Es handelt sich um eine Modifikation der Lowry-Methode (Hartree, 1972), die auf dem kolorimetrischen Nachweis eines violetten Bicinchoninsäure/ $\text{Cu}^+$ -Farbkomplexes beruht. Der Komplex entsteht durch die reduzierende Wirkung von Proteinen auf  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen und anschließender Inkubation mit Bicinchoninsäure (Redinbaugh und Turley, 1986; Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988). Diese Reaktion ist zehnfach empfindlicher als die herkömmliche Lowry-Methode und



gleichzeitig unempfindlich gegen höhere Salzkonzentrationen (Kessler und Fanestil, 1986).

Als Referenz wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin im Konzentrationsbereich von 25 µg/ml bis 2000 µg/ml verwendet. Die Proben wurden in drei unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt und behandelt wie die Standards.

- 25 µl Eichgerade und 25 µl Probe pro Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorlegen
- 200 µl Arbeitslösung (BCA und Kupfersulfat im Verhältnis 50:1) pro Well zugeben
- Mikrotiterplatte für 30 min bei 37 °C im Reader „iEMS Reader MF“ (Labsystems) inkubieren und die Reduktionsreaktion bei 562 nm im Reader verfolgen

Die Ergebnisse wurden mittels Microsoft Excel Programm ausgewertet.

## 22 Bestimmung der AFR-(His)<sub>6</sub>-Aktivität

Die AFR-(His)<sub>6</sub> katalysiert die Reduktion von 1,5-Anhydro-D-fructose zu 1,5-Anhydro-D-mannitol unter der Verwendung von NADPH als Cofaktor. Diese Reaktion kann photometrisch verfolgt werden. Die photometrischen Messungen wurden in 1 ml Kunststoffküvetten der Schichtdicke 1 cm im Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) durchgeführt. Sowohl der Küvettenblock als auch die verwendeten Lösungen wurden auf 30 °C temperiert. Für die Berechnungen wurden die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  von NADPH zugrunde gelegt.

$\lambda$	Extinktionskoeffizient $\epsilon$
340 nm	6,3 ml x $\mu\text{mol}^{-1}$ x cm
365 nm	3,5 ml x $\mu\text{mol}^{-1}$ x cm

Die Küvettenansätze wurden zusammenpipettiert (vgl. Kapitel II-3.10) und gemischt. Die Ansätze wurden 1 min bei 30 °C im Photometer vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates induziert und mit dem Spektralphotometer verfolgt. Die Bildung von NADP bzw. die Abnahme von NADPH wurde als Extinktionszunahme bzw. – Abnahme (365 nm) erfasst. Aus der Extinktionsänderung wurde automatisch  $\Delta E/\text{min}$  bestimmt. Die enzymatische Volumenaktivität wurde wie folgt berechnet (Bergmeyer und Gawehn, 1977):

$$V_A = \frac{\Delta E * V}{\text{min} * v * d * \epsilon} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml} * \text{min}} \right]$$

$\Delta E/\text{min}$	Extinktionsänderung pro min [ $\text{min}^{-1}$ ]
V	Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes [ml]
v	Volumen der Enzymlösung im Reaktionsansatz [ml]
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient bei 365 nm [ $\text{ml} \times \mu\text{mol}^{-1} \times \text{cm}$ ]
d	Schichtdicke der Küvette [cm]

## 23 Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität

Die Monooxygenase katalysiert die Hydroxylierung von 1,5-AM zu D-Mannose. Da dieses Protein die Anwesenheit von Elektronentransferproteinen für die Aktivität benötigt, wurden verschiedene Ansätze überprüft. Es wurden zwei Systeme getestet: AdR/Adx (Adrenodoxin-Reduktase/Adrenodoxin) vom Rind und PdR/Pdx (Putidaredoxin-Reduktase/Putidaredoxin) aus *Pseudomonas putida*. Die Cofaktoren wurden abhängig von der Reduktase eingesetzt – die AdR verwendet NADPH, die PdR ist strikt NADH-abhängig. Die photometrischen Messungen wurden in 1 ml Kunststoffküvetten der Schichtdicke 1 cm im Spektralphotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences) durchgeführt. Sowohl der Küvettenblock als auch die verwendeten Lösungen wurden auf 30 °C temperiert. Die Küvettenansätze wurden zusammenpipettiert (vgl. Kapitel II-3.10) und gemischt. Die Ansätze wurden 1 min bei

30 °C im Photometer vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,5-AM induziert und mit dem Spektralphotometer verfolgt. Die Abnahme von NAD(P)H wurde als Extinktionsabnahme (340 nm) erfasst. Aus der Extinktionsänderung wurde automatisch  $\Delta E/\text{min}$  bestimmt. Die enzymatische Volumenaktivität wurde wie oben beschrieben berechnet.

## 24 Analytik

Die Bestimmung der Kohlenhydrate wurde an einer Protonen-beladenen Ligandenaustauschmatrix aus Polystyrolharz (Aminex HPX-87H, 300 x 7,8 mm, Biorad, München) mit 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Millipore-H<sub>2</sub>O (Milli-Q-Anlage, Millipore, Eschborn) durchgeführt. Die Säule wurde auf 60 °C (HPLC oven, Knauer, Berlin) temperiert. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,5 ml/min (HPLC Pump, Bischoff, Leonberg). Nachdem die HPLC mit Probenstandards kalibriert wurde, konnte durch den Vergleich der Retentionszeiten (Beckman 156, Refractive Index Detector, Fullerton, California), sowie durch die Integration der Peakflächen (Chromatopac C-R6, Shimadzu, Kyoto, Japan) eine qualitative und quantitative Bestimmung erfolgen. Quantitative Messungen wurden in einer Konzentration bis 50 mM durchgeführt. Jede Probe wurde zweifach bestimmt.

## 25 Biokonversionen

### 25.1 Rohextrakt

Zur Untersuchung des Metabolismus von 1,5-AF bzw. 1,5-AM in *S. meliloti* wurden die Zellen bis zum Erreichen der stationären Phase in 250 ml MV-AF Medium kultiviert. Anschließend wurden sie abzentrifugiert (10 min, 2700 x g, 4 °C; Evolution RC, Sorvall) und mit 20 mM BisTris-, pH 6,5 (1,5-AF Metabolismusuntersuchungen) bzw. 20 mM Tris Puffer, pH 7,5 (1,5-AM Metabolismusuntersuchungen) gewaschen (10 min, 2700 x g, 4 °C; Evolution RC, Sorvall). Schließlich wurden die Zellen in 20 mM BisTris- bzw. Tris-Puffer bis zu einer Konzentration von 100 mg/ml bzw.

300 mg/ml aufgenommen und aufgeschlossen. Bei den Untersuchungen mit 1,5-AM wurden die Zelltrümmer nach dem Zellaufschluss nicht abzentrifugiert, sondern direkt in den Inkubationsansatz eingesetzt.

Inkubationsansatz für 1,5-AF Umsatz (Gerhardt et al., 1994):

BisTris (100 mM, pH 7,5)	500 µl
Zellaufschluss (100 mg/ml)	300 µl
1,5-AF (200 mM)	100 µl
NADPH (14 mM)	300 µl
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	200 µl

Inkubationsansatz für 1,5-AM Umsatz (Gerhardt et al., 1994):

Tris (100 mM, pH 7,5)	500 µl
Zellaufschluss (300 mg/ml)	300 µl
1,5-AM (200 mM)	100 µl
NADPH (14 mM)	300 µl
FMN (5 mM)	200 µl

Die Inkubation erfolgte bei 28 °C unter Schütteln (142 Upm). Die Proben wurden zwischen 5 und 90 min entnommen und mittels HPLC analysiert (vgl. II-24).

## **25.2 AFR-(His)<sub>6</sub>**

Die Biokonversionen einer 50 mM 1,5-AF- bzw. D-Glucoson- und 35 mM D-Xyloson-Lösung wurden in 1 ml mit verschiedenen Konzentrationen von AFR-(His)<sub>6</sub>, 50 mM NADPH und 50 mM BisTris-Puffer durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C unter Schütteln bei 142 Upm. Die Proben wurden zwischen 5 und 230 min entnommen und mittels HPLC analysiert (vgl. Kapitel II-24).

## 26 Biochemische Charakterisierung der AFR-(His)<sub>6</sub>

### 26.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden Proteine aufgrund ihres relativen Gehalts an sauren und basischen Resten elektrophoretisch aufgetrennt. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins entspricht dem pH-Wert, bei dem die Nettoladung und die elektrophoretische Beweglichkeit des Proteins gleich null ist. In einem pH-Gradienten in einem Gel ohne SDS-Zusatz wandert jedes aufgetragene Protein so weit, bis es eine Position im Gel erreicht hat, die seinem pI entspricht. Es wurden Gele von Servalyt Precotes pH 3 - 10 (150 µm, 125 mm x 125 mm, Serva) verwendet und als Marker diente der Proteinstandard P9 (IEF-Marker 3 - 10, Serva). Die Fokussierung wurde bei einer Temperatur von ca. 8 °C durchgeführt.

- Proben mit Nanosep<sup>®</sup> Centrifugal Devices in H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> umpuffern
- Vorfokussierungsbedingungen: low range, U<sub>Grenze</sub>=2000 V, P<sub>Grenze</sub>= 6 W (IEF Multiphor II, LKB Bromma)
- Sobald U = 500 V erreicht ist, ist die Vorfokussierung beendet
- Proben auftragen (10 µl pro Tasche)
- Gel nach Erreichen der Spannungskonstanz 20 min in 200 ml TCA inkubieren
- Gel 1 min mit 200 ml Entfärbelösung waschen
- Gel 5-7 min in Färbelösung inkubieren
- Gel 10 min in Entfärbelösung entfärben, dann 10 min mit frischer Entfärbelösung waschen

### 26.2 Bestimmung der molekularen Masse

#### 26.2.1 MALDI-TOF MS

Die molekulare Masse (MW) der AFR-(His)<sub>6</sub> wurde durch MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmt. MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*) beruht

auf der Bestimmung der Molekülmasse von Ionen im Hochvakuum. Die Ionen können mit Hilfe eines Flugzeitanalysators (*time of flight*, TOF) erfasst und analysiert werden. Die Probe wird in ein Kristallgitter eingebettet, das den größten Teil der Laserenergie absorbiert und einen geringeren Teil davon auf den Analyt überträgt. So werden Ionen erzeugt und in einem elektrischen Feld beschleunigt, wobei alle gleich geladenen Ionen dieselbe Energie erhalten. Nach Verlassen der Beschleunigungsstrecke (Flugröhre) besitzen die Ionen verschiedene Geschwindigkeiten in Abhängigkeit von ihrer Masse. Im Vergleich mit Referenzsubstanzen bekannter Masse lässt sich die Masse der Probe anhand ihrer Flugzeit bestimmen. Die Analysen wurden mit einem 4800 MALDI-TOF Massenspektrometer (Applied Bioscience) durchgeführt. Zur Datenerfassung wurde ein Lecroy 9384C 4Ghz digital storage oscilloscope (Lecroy Corp.) verwendet. Die in zwei Stufen verstärkten Detektorsignale wurden digitalisiert und zum XACQ Programm der SUN Workstation (Sun Microsystems Inc.) bzw. zur Windows NT Workstation überführt. Für die Messungen wurden die Proben in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  umgepuffert. Danach wurden sie in einer SA-Matrix eingebettet, auf eine Messplatte eingetragen und getrocknet. Anschließend wurde die Messplatte in der Vorvakuum-Kammer des MALDI-TOF Gerätes platziert und das Programm zur Messung wurde gestartet. Die Daten wurden mit den Programmen XMASS 5.1 und FlexAnalysis 2.0 (Bruker Daltoniks) bearbeitet.

### **26.2.2 Gelfiltration**

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes bzw. der Proteinuntereinheiten wurde eine Superdex 200 HR10 30-Säule eingesetzt. Der Trennbereich dieses Materials liegt zwischen einer molekularen Masse von 10 – 600 kDa. Als Eichproteine wurden Gamma-Globulin (Monomer - 150 kDa; Dimer - 300 kDa), BSA (Monomer - 67 kDa; Dimer - 134) und Ovalbumin (45 kDa) verwendet. Die Säule wurde mit 50 mM BisTris, pH 7,0 equilibriert und von jedem Protein wurden einzeln 0,5 ml einer 2,5 mg/ml Lösung mit einer Flußrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 50 mM BisTris, pH 7,0 und Zugabe von 100 mM NaCl. Die Flussrate betrug

0,5 ml, die Fraktionsgröße 0,5 ml. Es wurde eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe das Molekulargewicht von AFR-(His)<sub>6</sub> berechnet wurde.

### **26.3 $K_m$ -Wert-Bestimmung**

Für die  $K_m$ -Wert-Bestimmung wurden zwei verschiedene Enzymkonzentrationen auf ihre Aktivität gegenüber dem Hauptsubstrat (1,5-AF), 5-KF und dem Cosubstrat (NADPH) getestet. Dafür wurden Dreifachbestimmungen jeder Substrat- bzw. Cosubstratkonzentration mit dem AFR-(His)<sub>6</sub>-Enzymtest gemessen. Der Mittelwert wurde bestimmt und nach der Reaktionsgeschwindigkeit aufgelöst. Die graphische Darstellung erfolgte im Lineweaver-Burk-Diagramm. Anhand der Geradengleichung konnte der  $K_m$ -Wert berechnet werden.

### **26.4 Temperaturstabilität**

Zur Untersuchung der Temperaturstabilität der AFR-(His)<sub>6</sub> wurde die Enzymlösung bei drei verschiedenen Temperaturen (30 °C, 40 °C und 50 °C) für 70 min inkubiert. Im Abstand von 10 min wurden Aktivitätstests durchgeführt und die Geschwindigkeit der Reaktion berechnet. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmungen verifiziert.

### **26.5 pH-Optimum**

Für die Bestimmung des pH-Optimums der AFR-(His)<sub>6</sub> wurde der Aktivitätstest in verschiedenen Puffer-Systemen (Citrat, Acetat, BisTris, TrisHCl) und bei verschiedenen pH-Werten (pH 3,5 - pH 9,0) durchgeführt. Daraus wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten ermittelt. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmungen verifiziert.

## 27 Deletion des CYP-Systems *SmcY01812* in *S. meliloti* 1021

### 27.1 Eigenschaften des verwendeten Vektors pK18*mobsacB*

Das Plasmid pK18*mobsacB* ist ein Derivat des Plasmids pUC18 (Schäfer et al. 1994) und wird auf Grund des *sacB*-Genes als „suicide vector“ bezeichnet. Das *sacB*-Gen kodiert für die Levansucrase [EC 2.4.1.10] aus *Bacillus subtilis* und ist ein effizienter Genselektionsmarker, der sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien Anwendung findet (Jäger et al. 1995; Gay et al. 1983). Die Levansucrase ist an der Saccharose-Hydrolyse und der Levan-Synthese beteiligt. Die Expression des *sacB*-Gens auf einem Saccharose-enthaltenden Medium ist für die *S. meliloti*-Zellen letal. Auf diese Weise kann detektiert werden, ob die enthaltenen Klone das Plasmid pK18*mobsacB* ins Genom integriert haben.

### 27.2 Konstrukterstellung mittels SOE-PCR

Um die Integration des Vektors in die genomische DNA zu ermöglichen, muss der Vektor zum Genom homologe Sequenzen tragen. Die für die Deletion benötigten Inserts wurden mittels SOE-PCR (Splicing by Overlap Extension) erstellt. Dadurch werden zwei Sequenzen miteinander verknüpft und in den Vektor ligiert. Dabei werden zuerst zwei die Deletionsregion flankierende DNA-Fragmente jeweils von ca. 200 bp amplifiziert und in der Assembly-PCR miteinander verknüpft. Das erhaltene PCR-Produkt wird anschließend in den Zielvektor pK18*mobsacB* ligiert.

Als Template für die erste SOE-PCR wurde das Plasmid pMO1812smHis+ verwendet. Folgende Primer-Paare wurden eingesetzt: 1 MO1812 del forw-1 MO1812 del rev und 2 MO1218 del forw-2 MO1812 del rev. Damit wurden 200 bp lange, Deletionsregion flankierende DNA-Fragmente amplifiziert.

#### PCR-Ansatz:

FideliTaq™ Buffer (10x)	5,0 µl
dNTP's (10 mM)	1,5 µl
Primer I	1,0 µl



Primer II	1,0 µl
DMSO	1,5 µl
Template	1,0 µl
FideliTaq™ Polymerase	1,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	ad 50 µl

Die in der ersten SOE-PCR erhaltenen Amplifikate wurden in einem 1,5 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. II-6.5) und anschließend mittels MinElute™ Gel Extraction Kit reisoliert. Die beiden Reisolat wurden zusammen in die sogenannte Assembly-PCR als Template eingesetzt. Dabei wurden folgende Primer verwendet, die gleichzeitig das PCR-Produkt mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen versehen haben: sm mono forw und sm mono/Hind rev His. In diesem Fall wurde die Elongationszeit auf 1 min festgelegt (Tabelle 20).

**Tabelle 19: SOE-PCR-Programm Fideli.** Es wurden 30 Zyklen (Schritt 2-4) im TGradient-Cycler (Whatman Biometra®) durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	94	2
2. Denaturierung	94	0,5
3. Annealing	60	0,5
4. Elongation	68	0,5
5. Finale Elongation	68	5
6. Abkühlung	4	-

Das erhaltene Amplifikat (400 bp) wurde in *E. coli* TOP10 [pCR®II-TOPO] kloniert (vgl. II-6.9.1). Die Klonierung wurde mittels *Colony*-PCR überprüft (vgl. II-6.11.3). Nach der Plasmidreinigung (vgl. II-6.3) wurde das Insert mittels *Bam*HI-*Hind*III Restriktionsenzymen aus dem TOPO-Vektor ausgeschnitten (vgl. II-6.4), im 1,5 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. II-6.5) und mittels MinElute™ Gel Extraction Kit reisoliert. Das pK18*mobsacB*-Plasmid wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert und mit dem Insert ligiert (vgl. II-6.9.2). Der Ligationsansatz wurde nach

der Inkubation durch Dialyse entsalzt und komplett in die Transformation der *E. coli* S17-1-Zellen eingesetzt (vgl. II-6.11.1). Die transformierten Zellen wurden auf LB<sub>Kan</sub> Platten ausplattiert. Die Ligation wurde mittels *Colony-PCR* überprüft (vgl. II-6.11.3).

**Tabelle 20: Assembly-PCR-Programm Fideli.** Es wurden 35 Zyklen (Schritt 2-4) im TGradient-Cycler (Whatman Biometra®) durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	94	2
2. Denaturierung	94	0,5
3. Annealing	60	0,5
4. Elongation	68	1
5. Finale Elongation	68	5
6. Abkühlung	4	-

### 27.3 DNA-Übertragung durch Konjugation

Da für Rhizobien keine effizienten Transformationsysteme zu Verfügung stehen, basiert die Mutantenerstellung auf Konjugation. In diesem Verfahren wurde der Stamm *E. coli* S17-1 verwendet. Dieser verfügt über eine chromosomale Integration des RP4-Plasmides, was die Übertragung der zu mobilisierenden Plasmide in die Akzeptor-Zellen ermöglicht. Es wurde hier das Prinzip der Filterkreuzung angewandt.

- der mit dem zu mobilisierenden Plasmid versehene Donor *E. coli* S17-1 (pMO1812del) in LB<sub>Kan</sub> bis zu einer OD<sub>580</sub> von 0,6 - 0,8 anziehen
- den Rezipienten (*Sinorhizobium meliloti* 1021) über Nacht in TY-Medium kultivieren
- 0,5 ml der logarithmisch wachsenden Donorkultur mit 0,8 ml stationärer Rezipientenkultur im Eppendorfgefäß mischen und abzentrifugieren (10 min, 4000 Upm), (Biofuge Pico, Hereaus)
- Zellen vorsichtig in 100 µl TY-Medium resuspendieren

- die Suspension auf einen vorgewärmten Nitrocellulosefilter pipettieren und mindestens 4 h bei 30 °C auf TY-Platten inkubieren
- die Filter in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> aufnehmen und eine Verdünnungsreihe auf TY<sub>Kan</sub>-Platten ausplattieren
- Platten ÜN bei 30 °C inkubieren

Die Kontrolle der positiven Konjuganten erfolgte auf LB-Platten mit 10 % Saccharose.

#### **27.4 Anzucht von Deletionsmutanten**

Die positiven Klone wurden zuerst in 10 ml MV-Glucose-Medium (Endkonzentration 10 mM) kultiviert. Nachdem die Anzuchtzeit auf Glucose beendet war, wurden die Zellen auf MV-AF-Medium (Endkonzentration 10 mM) überimpft. Um ein Wachstum auf der restlichen Glucose des MV-Glucose-Mediums auszuschließen, wurden die Zellen zuvor mit C-Quelle-freiem MV-Medium gewaschen (Biofuge Pico, Heraeus). Parallel zu diesem Versuch wurde auch die Fähigkeit der Mutanten zum Wachstum auf D-Mannose getestet, die als gutes Substrat für die Rhizobien gilt. Es wurde MV-Medium mit Zusatz von 10 mM D-Mannose verwendet. Alle Anzucht-Versuche wurden bei 28 °C über 40 h durchgeführt.

#### **27.5 Genetische Kontrolle der Deletion**

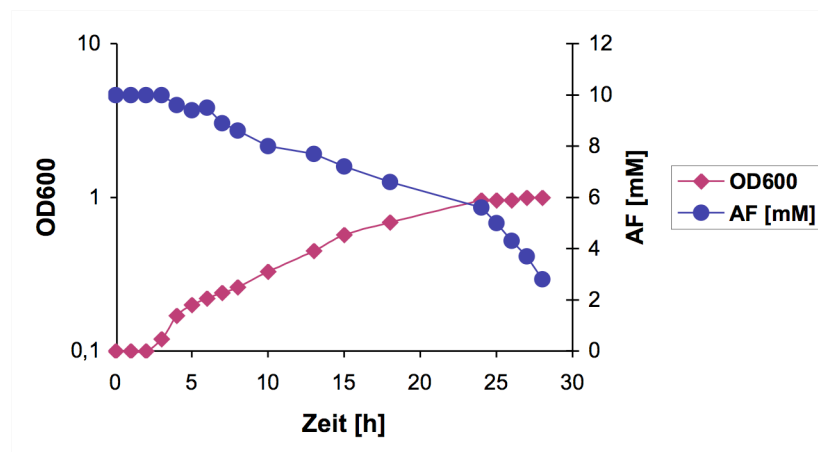
Der Erfolg von Konjugation und Deletion wurde ebenfalls unter Anwendung von genetischen Methoden überprüft. Die erhaltenen Mutanten wurden auf MV-Glucose-Medium (Endkonzentration 10 mM) kultiviert und nach 24 h geerntet (Biofuge Pico, Heraeus). Um die Integration des Vektors in das Genom von *S. meliloti* und somit die Disruption des *Y01812*-Gens zu bestätigen, wurde die genomische DNA aus den pelletierten Zellen isoliert (vgl. 6.1). Diese wurde als Template in eine Kontroll-PCR eingesetzt, in der *Y01812*-Gen-spezifische Primer verwendet wurden (sm mono forw und sm mono/Hind rev His). Die Zusammensetzung des PCR Ansatzes und das verwendete PCR-Programm gestalteten sich gemäß Kapitel II-8.1.

### III Ergebnisse

#### 1 AF-Reduktase aus *Sinorhizobium meliloti* 1021

##### 1.1 Wachstumsuntersuchungen von *S. meliloti* 1021

Bereits Kühn et al. (2006) haben gezeigt, dass *S. morelense* S-30.7.5 sehr gut mit 1,5-AF als einziger Kohlenstoffquelle wächst und es konnte in den Zellextrakten eine hohe AF-Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten mit den durchgeführten Wachstumsversuchen bestätigt werden. *S. meliloti* ist in einem Mineral-Vitamin-Medium mit 10 mM 1,5-AF mit einer Wachstumsrate von  $\mu=0,14 \text{ h}^{-1}$  und einer Verdopplungszeit von  $t_d=4,9$  gewachsen (Abbildung 8). In den Extrakten aus Zellen der späten log-Phase konnte die AF-Reduktase mit einer spezifischen Aktivität  $A_{sp}=0,4 \text{ U/mg Protein}$  nachgewiesen werden.



##### Abbildung 8: Wachstumskurve von *S. meliloti* 1021

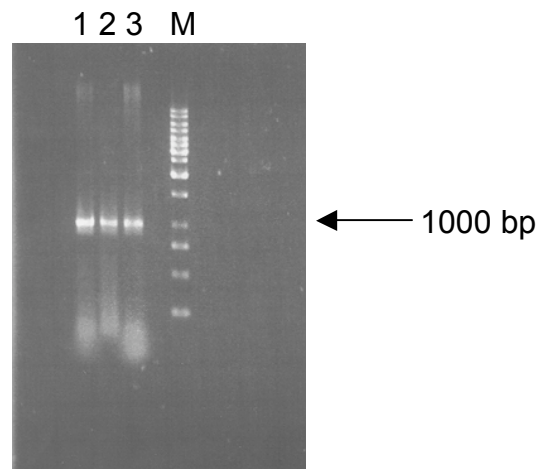
Es wurden 250 ml MV-AF-Medium mit 25 ml Vorkultur desselben Mediums angeimpft. Der Wachstumsverlauf wurde bei 28 °C durchgeführt und durch Messung der OD<sub>600</sub> (vgl. Kapitel II- 15.1) und der Abnahme von 1,5-AF (Ausgangskonzentration im Medium 10 mM) mittels HPLC-Messung (vgl. Kapitel II- 24) verfolgt.

Auf 1,5-AG-Medium wies *S. meliloti* ein vergleichbar gutes Wachstum auf, bildete aber weniger AF-Reduktase, deren spezifische Aktivität mit  $A_{sp}=0,1$  U/mg bestimmt wurde. Andere Substrate wie Mannitol, Sorbitol und Inositol konnten zwar als Kohlenstoffquelle verwendet werden, eine 1,5-AF-Reduktase-Expression konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden.

## 1.2 Klonierung des *afr*-Genes aus *S. meliloti* 1021 und Expression in *E. coli* BL21(DE3)Gold

Das Genom von *S. meliloti* 1021 wurde im Rahmen eines Genom-Projektes vollständig sequenziert (Finan et al., 2001; Capela et al., 2001; Barnett et al., 2001). Dadurch konnte der ORF der AF-Reduktase identifiziert werden. Ein Sequenzvergleich zwischen der 1,5-AF-Reduktase aus *S. morelense* (A. Kühn et al. 2006) und der Sequenz des 3,7 Mb großen Hauptchromosoms von *S. meliloti* 1021 wies auf den ORF *smc04400* hin, der für eine theoretische Oxidoreduktase kodiert. Da viele Gene hinsichtlich ihrer Funktion noch nicht untersucht wurden, werden sie als theoretisch bezeichnet. Es wurde angenommen, dass dieser ORF die erwartete Sequenz des *afr*-Gens aus *S. meliloti* ist. Für die Genisolierung aus der genomischen DNA wurden folgende Primer von dieser 1002 bp langen Sequenz abgeleitet: *mel\_forw* und *mel\_rev* und in die PCR eingesetzt (vgl. Kapitel II-7.1). Die Ergebnisse der PCR wurden anschließend in einem 1 %-igen Agarosegel überprüft (Abbildung 9).

Das 1002 bp große Amplifikat wurde mittels TOPO TA cloning Kit in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert und in die *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.9.1). Die erhaltenen Klone wurden mittels *Colony*-PCR (vgl. Kapitel II-6.11.3) auf die Anwesenheit des Inserts kontrolliert. Ein positiver Klon wurde anschließend ausgewählt und dessen Plasmid (pAFRsm) nach der Plasmid-Reinigung (vgl. Kapitel II-6.3) sequenziert (vgl. Kapitel II-6.12). Die Sequenzanalyse bestätigte, dass das Gen *smc04400* vollständig und fehlerfrei amplifiziert worden ist.



**Abbildung 9: *afr*-Gen-Amplifikation aus der genomischen DNA von *S. meliloti* 1021.**

Im 1 %-igen Agarosegel wurde in den Spuren 1, 2 und 3 ca. 0,5 µg PCR-Produkt nach der Amplifikation mit den Primer *mel\_forw* und *mel\_rev* aufgetragen. In der Spur 4 wurde 2,5 µg GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder dargestellt.

Um zu überprüfen, ob es sich im Fall der erhaltenen Sequenz tatsächlich um das *afr*-Gen handelt, wurde das Insert des Plasmids pAFRsm in den Expressionsvektor pET24a(+) ligiert (vgl. Kapitel II-6.9.2). Zuvor wurde das Insert mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen und einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>tag versehen. Dies erfolgte mittels PCR, dabei wurden folgende Primer verwendet: 5'*mel\_Bam/Hind\_for* und 3'*mel\_His/Xho/Eco\_rev* (vgl. Kapitel II-7.1). Auf diese Weise wurden eine *Bam*HI- und eine *Hind*III-Schnittstelle direkt vor dem Startcodon, sowie eine *Xho*I- und eine *Eco*RI-Schnittstelle direkt nach dem Stopcodon eingefügt. Vor dem Stopcodon wurde ein C-terminaler (His)<sub>6</sub>tag eingefügt, was die Anreicherung des Enzyms effizienter und einfacher gestalten sollte. Nach der Amplifikation wurde das Ergebnis in einem 1 %-igen Agarosegel überprüft. Um die modifizierte AFR-Sequenz nach dem Einfügen des (His)<sub>6</sub>tags und der Schnittstellen mit Hilfe der PCR zu bestätigen, wurde das PCR-Produkt ebenfalls in den pCR®II-TOPO®-Vektor zwischenkloniert und sequenziert. Für die heterologe Expression wurde das Insert aus dem pCR®II-TOPO®-Vektor (pAFRsmHis) mit *Bam*HI und *Eco*RI ausgeschnitten (vgl. Kapitel II-6.4). Der Expressionsvektor pET24a(+) wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert und beide Verdauansätze wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Insert- und Vektor-spezifischen Banden wurden mittels MiniElute™

Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel reisoliert und in die Ligation (vgl. Kapitel II-6.9.2) eingesetzt. Nach der Ligation wurde die Plasmid-DNA pAFRsmHis<sup>+</sup> durch Dialyse entsalzt und anschließend in die elektrokompetenten *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.11.1). Durch die heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3)Gold [pAFRsmHis<sup>+</sup>] konnte die Bildung der aktiven AFR-(His)<sub>6</sub> gezeigt werden, daher wurde das Insert als *afr*-Gen bezeichnet. Die Nukleotidsequenz des *afr*-Gens sowie die abgeleitete Proteinsequenz des Enzyms sind in Abbildung 10 dargestellt. Das Gen weist eine Größe von 1002 bp auf und wird charakterisiert durch einen G+C-Gehalt von 67 %. Der Sequenzvergleich der 1,5-AF-Reduktase aus *S. meliloti* und der 1,5-AF-Reduktase aus *S. morelense* [EC 1.1.1.292] zeigt eine Homologie auf Nukleotidebene von 80,9 %. Die Proteinsequenzen weisen 85,9 % Identität auf.

+1	Met Ile Arg Trp Gly Leu Ile Gly Ala Ser Thr Ile Ala Arg Glu Trp Val Ile Gly Ala Ile Arg Ala Ala Gly Gly Glu Val Val Ser Val Met Ser Ser
1	ATGATTCCGCT GGGGACTGAT CGGGCCGAGC ACGATCGCGC GCGAATGGGT GATCGGGGCC ATCCGGCCCG CAGGGGGCGA AGTCGTCTCG GTGATGAGCT
+1	Sei Ser Ala Glu Arg Gly Glu Ala Tyr Ala Ala Glu Asn Gly Ile Ala Lys Ala Val Thr Ser Val Asp Asp Gly Asp Pro Asp Val Asp Ala Val
101	CGAGCCCGGA ACGAGGAGAG GCGTATGCCG CGAGAAACGG GATCGCAAG GGTGTGACAA GGTTCGACGA TCTCGTCGGC GATCCCGACG TGGACGCCGT
+1	Val Tyr Ile Ser Thr Thr Asn Glu Leu His His Gly Glu Ala Leu Ala Ala Ile Arg Ala Gly Lys His Val Leu Cys Glu Lys Pro Leu Ala Met Asn Leu
201	CTACATCTCG ACGACCAACG AGCTTCACCA CGGCAGGGC CTGGCAGCGA TCCGGCCCGG CAAGCACGTT CTCTGCGAGA AGCCGCTGGC GATGAACCTC
+1	Asn Asp Gly Cys Glu Met Val Leu Lys Ala Cys Glu Ala Gly Val Val Leu Gly Thr Asn His His Leu Arg Asn Ala Ala Thr His Arg Ala Met Arg Glu
301	AATGACGGCT GTGAAATGGT GCTCAAGGCC TGTGAGGGCC GCGTCGTGCT CGGCACCAAT CATCACTTGC GCAATGCCGC CACGCATCGG GCCATGCGGG
+1	Glu Ala Ile Ala Ala Gly Arg Ile Gly Arg Pro Ile Ala Ala Arg Val Phe His Ala Val Tyr Leu Pro Pro His Leu Gln Gly Trp Arg Leu Asp Lys Pro
401	AAGCATCGC CGCGGCCCGG ATCGGCCCGG CGATCGCGGC GCGGTCTTC CATGCCGTCT ATCTGCCGCC GCACCTCCAG GGCTGGCGGC TCGACAAGCC
+1	Pro Glu Ala Gly Gly Val Ile Leu Asp Ile Thr Val His Asp Ala Asp Thr Leu Arg Phe Val Leu Asn Asp Asp Pro Ile Glu Ala Val Ala Ile Ser
501	GGAGGGGGC GCGGGGTCA TTCTCGATAT CACCGTGCAC GACGCCGACA CGGTGGCTT CGTTTGAAC GACGACCCGA TCGAGGCGCT CGCGATCAGC
+1	His Ser Ala Gly Met Gly Lys Glu Gly Leu Glu Asp Gly Val Met Gly Val Leu Arg Phe Arg Ser Gly Val Ile Ala Gln Phe His Asp Ala Phe Thr Thr
601	CACAGCGCCG GCATGGGCAA GGAAGGACTC GAGGACGGGG TCATGGGCGT GCTCCGCTTC CGTCCGGCG TCATCGCCCA GTTCCATGAT GCCTTCACCA
+1	Thr Lys Phe Ala Glu Thr Gly Leu Glu Val His Gly Thr Ala Gly Ser Leu Ile Gly Arg Asn Val Met Thr Gln Arg Pro Val Gly Thr Val Leu Arg
701	CGAAATTTC CGAGACGGGT CTCGAAGTGC ACGGAACCGC GGGATCGTG ATCGGCCGCA ACGTGATGAC GCAGCGGCT GTCGGCACGG TCGTGCTGGC
+1	Arg Asn Glu Gly Glu Ser Glu Leu Pro Leu Asp His Arg Asn Leu Tyr Glu Thr Ala Ile Ala Ala Phe His Ser Ala Ile Gly Gly Asn Gly Arg Pro
801	CAATGAAGAG GCGAGAGCG AGTTGCCGCT CGACCACCGC AATCTCTACG AGACGGCGAT CGCGGCTTTC CATTCGGCGA TCGGGGGCAA TGGCCGTCCG
+1	Ser Ala Ser Gly Glu Asp Gly Val Trp Ser Leu Ala Thr Gly Leu Ala Val Val Lys Ala Ala Thr Gly Gly Ala Val Glu Ile Glu Thr Gly Leu ***
901	TCGGCGAGC GTGAGGATGG CGTCTGGTGC CTGCCACCG GCGTGGCGT GGTCAAGGGC GCGGCCACCG GCGGTGCCGT CGAGATCGAA ACGGGACTTT
+1	***
1001	GA

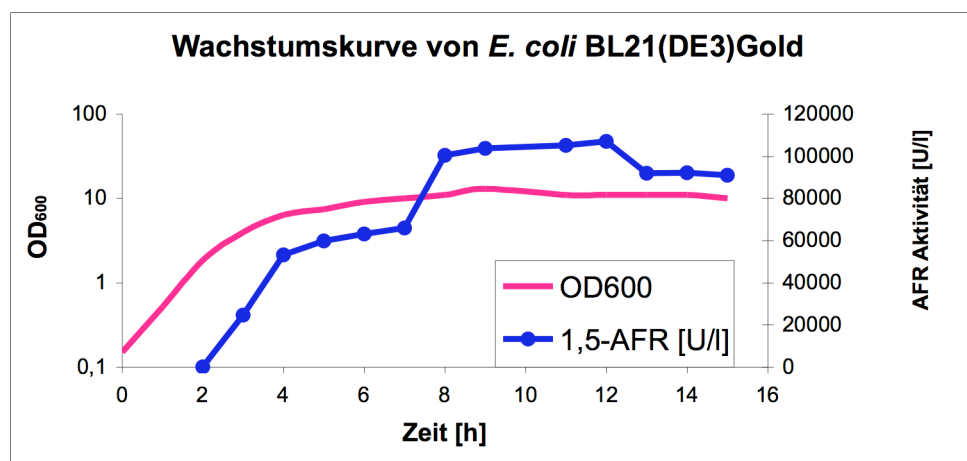
Abbildung 10: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der 1,5-AF-Reduktase aus *S. meliloti* 1021.



## 2 Charakterisierung der AFR-(His)<sub>6</sub> aus *S. meliloti* 1021

### 2.1 Fermenteranzucht

Die pAFRsmHis<sup>+</sup>-tragenden *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen wurden in 1,5 L Pepton/Trypton-Medium im 2 L-Bioreaktor angezogen (vgl. Kapitel II-7.2.2). Dabei wurden stündlich 5 ml Aliquots entnommen und sowohl die optische Dichte (vgl. Kapitel II-15.1) als auch die AFR-(His)<sub>6</sub>-Aktivität (vgl. Kapitel II-3.10) überprüft. Um die Enzymaktivität verfolgen zu können wurden 4 ml des Aliquots geerntet (10 min bei 4 °C, 2700 x g, Evolution RC, Sorvall), das Zellpellet in 1 ml 20 mM BisTris-Puffer (pH 6,5) aufgenommen und anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. Kapitel II-16.2). Nach 4 h wurde eine OD<sub>600</sub> von 2,6 erreicht und die Produktion der AF-Reduktase durch Zugabe von 0,1 M IPTG induziert (Endkonzentration im Medium 100 µM). Während der Fermentation konnte nach 8 h eine maximale optische Dichte von 13 und eine maximale AFR-(His)<sub>6</sub>-Aktivität von 107 kU/L erreicht werden.



**Abbildung 11: Wachstumskurve von *E. coli* BL21(DE3)Gold [pAFRsmHis<sup>+</sup>].**

Es wurden 1,5 L kanamycinhaltiges Pepton/Trypton-Medium im 2 L-Fermenter mit 50 ml Vorkultur desselben Mediums angeimpft. Der Wachstumsverlauf wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm verfolgt und die AFR-(His)<sub>6</sub>-Aktivität mittels entsprechendem Enzymassays gemessen. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C.

Die höchste AFR-(His)<sub>6</sub>-Aktivität konnte nach ca. 7 h bei einer Zelldichte von ca. 10 gemessen werden. Die Verdopplungszeit  $t_d$  wurde mit 0,99 h bei einer Wachstumskonstanten  $\mu$  von 0,7 h<sup>-1</sup> errechnet.

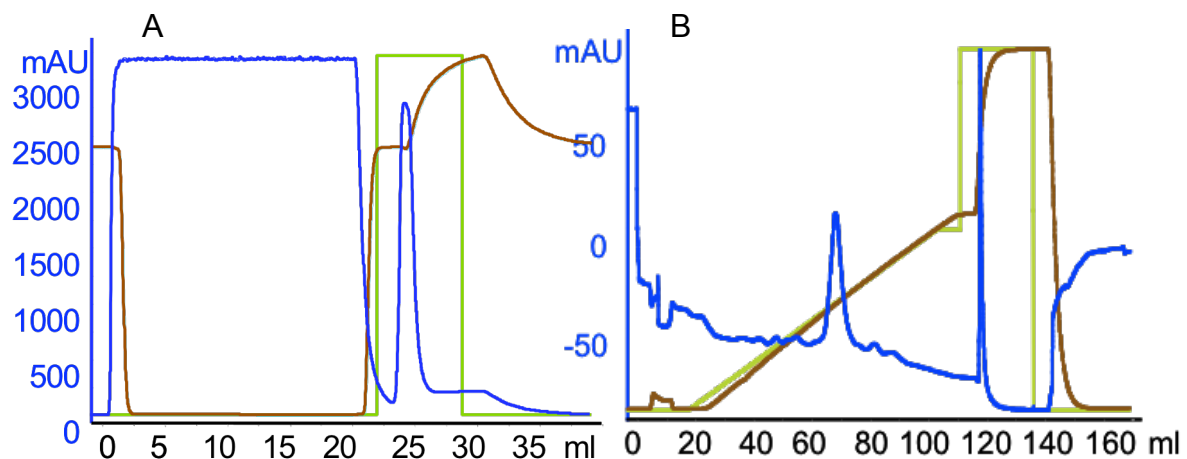
Der Verlauf der Wachstumskurve mit der Entwicklung der AF-Reduktase-Aktivität ist in Abbildung 11 dargestellt. Zur Reinigung der AF-Reduktase wurden die Zellen geerntet und in Aliquots von 6 g bei -70 °C gelagert. 6 g feuchte Zellen wurden in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer, pH 7,0 im Verhältnis 3 ml Puffer pro 1 g Zellen aufgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. Kapitel II-16.2). So wurde der Rohextrakt hergestellt, dessen Gesamtaktivität 2336 U AFR betrug (Tabelle 22).

## 2.2 Reinigung der AFR-(His)<sub>6</sub>

Die Reinigung der rekombinanten AF-Reduktase gelang durch eine Kombination von Affinitäts- (IMAC – Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) (vgl. Kapitel II-17.1) und Anionenaustauschchromatographie (vgl. Kapitel II-17.3). Zwischen den beiden Chromatographien wurden die AFR-(His)<sub>6</sub>-Fraktionen mittels Phenyl-Sepharose-Säule umgepuffert (vgl. Kapitel II-17.2), um das Imidazol aus der Probe zu entfernen und den Elutionspuffer durch 50 mM BisTris Puffer, pH 7,0 zu ersetzen. Zu jeder Enzymanreicherung wurden jeweils Aliquots von 6 g Feuchtgewicht verwendet. Die Zellen wurden in 20 ml 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0) aufgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. Kapitel II-16.2), anschließend abzentrifugiert und auf die Chelating Crude 1 ml FF-Säule aufgetragen.

**Tabelle 22: Anreicherungstabelle der rekombinanten 1,5-AF-Reduktase-AFR-(His)<sub>6</sub>**

Anreicherungsschritt	Volumen [ml]	Gesamtunits [U]	Gesamtprotein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Faktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	16	2336	184	13	1	100
IMAC	4	1986	3,5	567	43	85
Phenyl Sepharose	8	1962	2,2	892	68	84
Q Sepharose	23	1705	1,8	947	72	73



**Abbildung 12: Elutionsdiagramm der Affinitäts- (A) und Anionenaustauschchromatographie (B) der rekombinanten 1,5-AF-Reduktase-Anreicherung aus *S. meliloti* 1021**

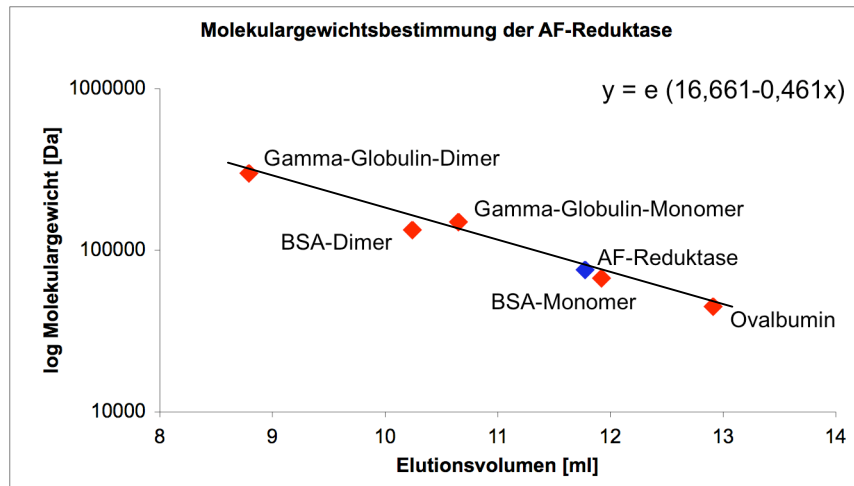
blau – Absorption bei 280 nm; braun – Konduktivität; grün – Konzentration des Gradienten (A – bis 0,5 M; B – bis 1 M)

Die Elutionsdiagramme sind in Abbildung 12 dargestellt. Die Elution der AFR-(His)<sub>6</sub> erfolgte mit 0,5 M Imidazol. Das aktive Protein wurde in einer Fraktion von 4 ml aufgefangen und auf die Umpufferungssäule aufgetragen. Nachdem sich das Protein in 50 mM BisTris-Puffer (pH 7,0) befand, erfolgte die Anionenaustauschchromatographie. Bei diesem Anreicherungs-schritt wurde eine 5 ml Q-Sepharose HP-Säule verwendet, für die als Puffersubstanz 50 mM BisTris (pH 7,0) eingesetzt wurde. Die Elution erfolgte hier mit 1 M NaCl, wobei das Protein bei einer Konzentration von 22 % NaCl in einem Volumen von 23 ml von der Säule eluiert werden konnte. Die aktiven Fraktionen wurden, wie zuvor, mittels Phenyl-Sepharose-Säule in 50 mM BisTris (pH 7,0) umgepuffert, um NaCl aus der Proteinlösung zu entfernen. Durch eine 72-fache Anreicherung konnte die rekombinante 1,5-AF-Reduktase zu einer spezifischen Aktivität von 947 U/mg angereichert werden (Tabelle 22).

### 2.3 Bestimmung des Molekulargewichtes

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde mit Hilfe zweier Methoden durchgeführt, einerseits chromatographisch unter Anwendung einer Gelfiltration (vgl. Kapitel II-

26.2.2), andererseits massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF-Messungen (vgl. Kapitel II-26.2.1).



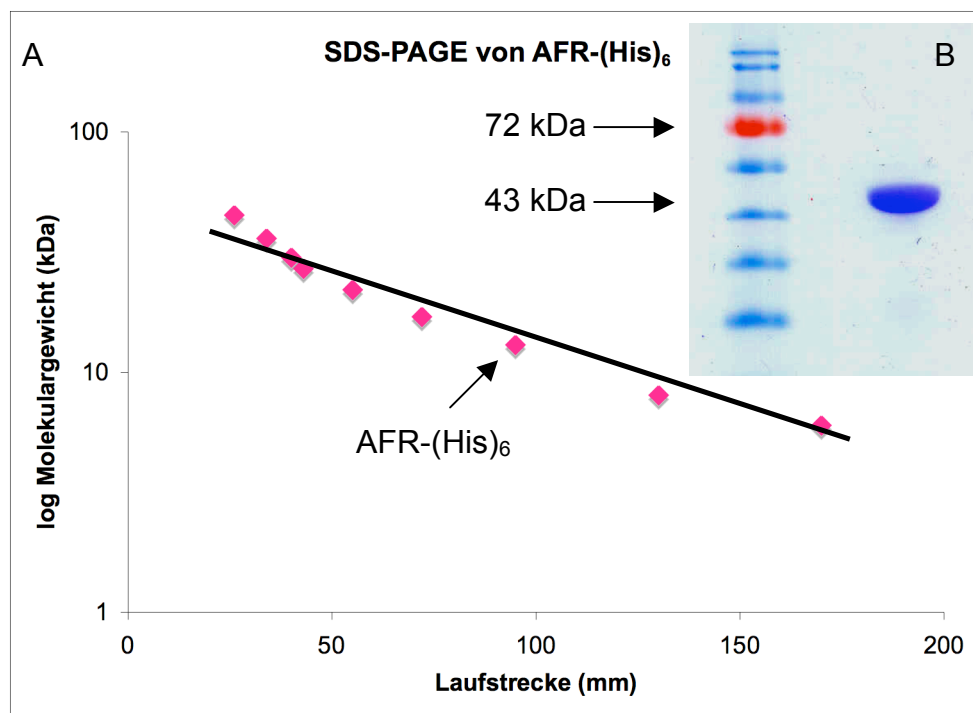
### Abbildung 13: Ermittlung des Molekulargewichtes durch Gelfiltration

Von jedem Eichprotein sowie der angereicherten AF-Reduktase wurden 0,5 ml einer 2,5 mg/ml-Lösung auf die Superdex 200 HR10 30 Säule (vgl. Kapitel II-26.2.2) aufgetragen. Die Elutionsvolumina wurden durch die UV-Absorption bei einer Flussrate von 0,5 ml/min ermittelt.

Für die Gelfiltration wurde eine Superdex 200 HR10 30 Säule verwendet, die gegen 50 mM BisTris-Puffer mit Zusatz von 100 mM NaCl äquilibriert worden war. Die Eichung wurde mit Gamma-Globulin, BSA und Ovalbumin durchgeführt. Nachdem die Elutionsvolumina dieser Proteine bestimmt wurden, konnte eine Eichgerade erstellt werden, indem der Logarithmus der Molekulargewichte gegen die Elutionsvolumina graphisch aufgetragen wurde (Abbildung 13). Aus der Lage der AFR-(His)<sub>6</sub> konnte ein relatives Molekulargewicht  $M_r = 74,1$  extrapoliert werden. Um die mit der Gelfiltration erhaltenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde eine Messung mittels MALDI-TOF durchgeführt. Zu dieser Analyse wurde die angereicherte AFR-(His)<sub>6</sub> in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung umgepuffert und in einer Konzentration von 1 mg/ml zur Messung bereitgestellt. Das MALDI-Spektrum hat deutlich zwei Peaks ergeben: einen bei 37 kDa und einen bei 74,1 kDa (vgl. Kapitel VIII-3). Das erste Signal bei 37 kDa stellt eine Untereinheit der 1,5-AF-Reduktase dar. Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass dieses Enzym, im Gegensatz zu der 1,5-AF-Reduktase aus *S. morelense* (Kühn et al., 2006), als Dimer vorliegt.

## 2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Reinheit der Proben nach der Anreicherung zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (vgl. Kapitel II-18.1). Dazu wurde ein 9 %-iges Trenn- und ein 4 %-iges Sammelgel verwendet. In Abbildung 14 ist das Ergebnis der Elektrophorese dargestellt. Es ist eine einzelne Bande bei ca. 40 kDa zu erkennen, die die Reinheit der angereicherten Probe beweist. Da mittels Gelfiltration und MALDI-TOF-Analyse festgestellt werden konnte, dass es sich im Fall dieses Enzyms um ein dimeres Protein von 74,1 kDa handelt, stellt die Bande in der SDS-PAGE eine Untereinheit der rekombinanten 1,5-AF-Reduktase dar.

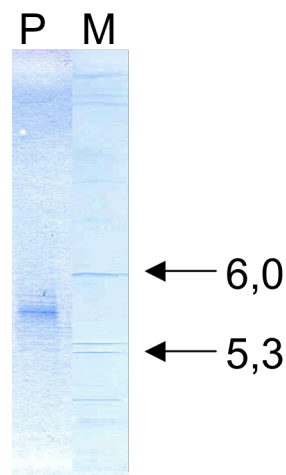


**Abbildung 14: SDS-PAGE nach Anreicherung der rekombinanten 1,5-AF-Reduktase aus *S. meliloti* 1021.**

(A) Auswertung der elektrophoretischen Trennung. (B) Links 10 µg Protein Ladder 11-170 kDa (Fermentas). Rechts 20 µg aufgereinigte AF-Reduktase nach der Anionenaustauschchromatographie.

## 2.5 Isoelektrischer Punkt

Die isoelektrische Fokussierung der AFR-(His)<sub>6</sub> (vgl. Kapitel II-26.1) wurde in einem Polyacrylamidgel mit einem pH-Gradient von 3 bis 10 durchgeführt (Abbildung 15). Der isoelektrische Punkt wurde mittels der Eichproteine des Standards P9 auf pH 5,6 bestimmt.



### Abbildung 15: Isoelektrische Fokussierung der AFR-(His)<sub>6</sub> im pH-Bereich von 3 bis 10.

Im Polyacrylamidgel (pH 3-10) wurden 10 µl Proteinstandard P9 (M) und 10 µg angereicherte 1,5-AF-Reduktase (P) bis zur Spannungskonstanz von 2000 V, 3,7 mA und 6,0 W fokussiert.

## 2.6 Substratspektrum

Um die AFR-(His)<sub>6</sub> hinsichtlich ihrer Substratspezifität zu charakterisieren, wurden verschiedene Verbindungen sowohl in der Reduktions- als auch in der Oxidationsreaktion als Substrate eingesetzt. Zum einen wurde die Reduktion verschiedener Hexosen, Pentosen, Aldehyde und Ketone durch die AFR-(His)<sub>6</sub> untersucht. Zum anderen wurde getestet, ob auch Dicarbonsäurezucker reduziert werden, die als Substrate der AF-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5 beschrieben wurden (Kühn et al., 2006). Es wurden auch die Verbindungen untersucht, die von der eukaryontischen 1,5-AF-Reduktase [EC 1.1.1.263] verwendet werden können

(Sakuma et al., 1998). Die Ergebnisse der Substratbestimmung der Reduktionsreaktion der AFR-(His)<sub>6</sub> sind in der Tabelle 23 zusammengefasst.

Die Ergebnisse zeigten, dass die 1,5-AF das Hauptsubstrat der AFR-(His)<sub>6</sub> aus *S. meliloti* ist und nur die Dicarbonsäure 5-KF, D-Xyloson und D-Glucoson reduziert wurden, allerdings mit geringerer Rate. Die getesteten Kohlenhydrate, Aldehyde und Ketone sowie die Substrate der eukaryontischen AFR wurden von AFR-(His)<sub>6</sub> nicht reduziert.

Somit hat die AF-Reduktase aus *S. meliloti* ein Substratspektrum gleich der AF-Reduktase aus *S. morelense* und unterscheidet sich damit ebenso von der eukaryontischen AF-Reduktase.

**Tabelle 23: Substratspektrum der Reduktionsreaktion.** Die untersuchten Substrate wurden in einer Konzentration von 300 mM in 100 mM BisTris (pH 6,5) mit 0,28 mM NADPH und 70 mU 1,5-AF-Reduktase zugegeben und die Reaktion wurde bei 30 °C durch Extinktionsabnahme bei 365 nm verfolgt.

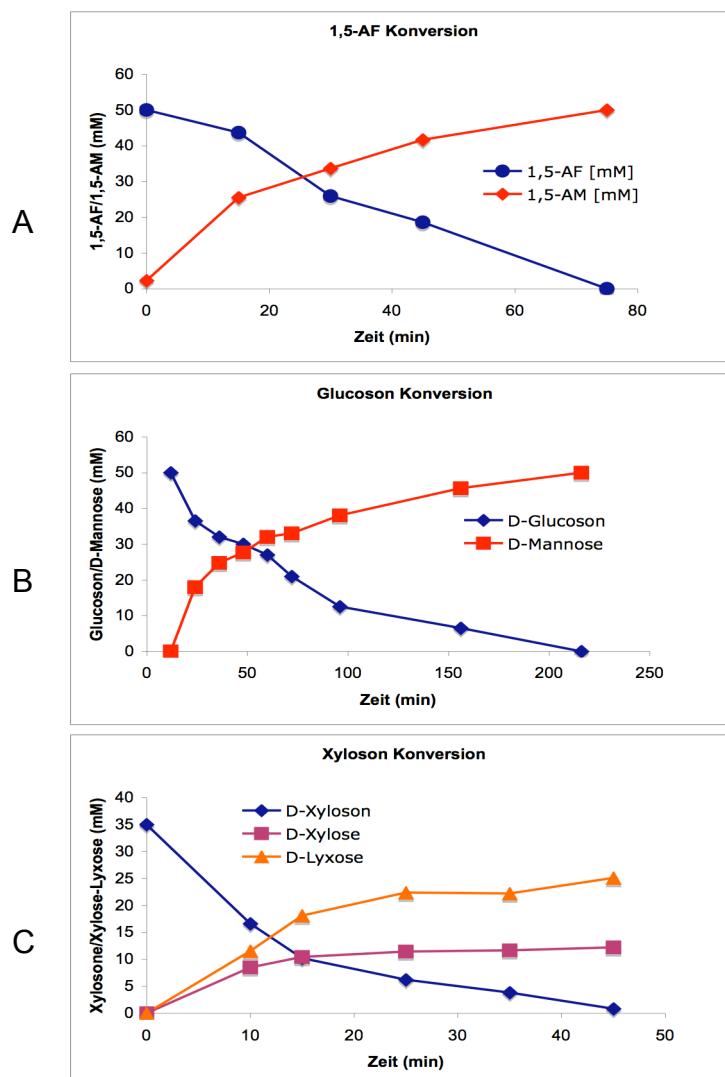
Substrat	spezifische Aktivität [U/mg]	Relative Aktivität [%]
1,5-AF	947	100
5-KF	340	36
D-Xyloson	322	34
D-Glucoson	236	25

Die Oxidationsreaktion wurde ebenfalls an mehreren Verbindungen untersucht. Dabei wurden 1,5-AM, 1,5-AG, Mannitol, Glucitol, Inositol und Xylitol in einer Konzentration von 300 mM als Substrate getestet. Diese wurden dem Ansatz aus 100 mM Tris-Puffer (pH 7,5), 1,8 mM NADP<sup>+</sup> und 1 U AF-Reduktase zugegeben. Die Extinktionsänderung wurde bei 30 °C verfolgt. Die Ergebnisse zeigten, dass keine Oxidationsreaktion durch die AFR-(His)<sub>6</sub> katalysiert werden kann.

## 2.7 Biokonversionen

Die Identifizierung der Reaktionsprodukte, sowie die Quantifizierung sämtlicher Biokonversionen wurde mittels HPLC (vgl. Kapitel II-24) durchgeführt. Um ausreichende Mengen an Produkt zu erhalten, wurden die untersuchten Substrate

dem Umsatz in einer Konzentration von 50 mM bzw. 35 mM Konzentration zugefügt (vgl. Kapitel II-25.2). Aufgrund der unterschiedlichen relativen Aktivitäten (Tabelle 23) variierten die Inkubationszeiten zwischen 75 min bis über 3 h. Bevor die Proben auf die HPLC-Säule aufgetragen wurden, sind sie von dem Reaktionsgemisch gereinigt worden. Um die Produkte eindeutig identifizieren zu können, wurden zuvor die authentischen Standards getestet und so die entsprechenden Retentionszeiten festgestellt (Tabelle 24).



### Abbildung 16: Biokonversionen von Dicarbonsylzuckern mit AFR-(His)<sub>6</sub>

Die Umsätze wurden bei 28 °C durchgeführt. Die Inkubationslösung enthielt 50 mM BisTris-Puffer (pH 6,5), 50 mM NADPH und 50 mM 1,5-AF (A) bzw. D-Glucoson (B). Bei der Umsetzung des D-Xylosens (C) wurden alle Bestandteile in der Konzentration von 35 mM eingesetzt. Folgende Enzymmengen wurden verwendet: (A) - 370 mU, (B) - 1 U, (C) - 2,8 U.



Die Reduktion von 1,5-AF, D-Glucoson und D-Xyloson verlief vollständig, wobei 1,5-AF und D-Glucoson von der AFR-(His)<sub>6</sub> stereoselektiv umgesetzt wurden (Abbildung 16). Die Reduktion von D-Xyloson ergab ein Gemisch der isomeren Verbindungen D-Xylose und D-Lyxose.

**Tabelle 24: Retentionszeiten der Referenzsubstanzen bei HPLC-Messungen.** Von den Standards wurden je 50 µl einer 50 mM Lösung mittels Aminex HPX-87H bei 60 °C, 0,5 ml/min und 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als Fließmittel analysiert.

Referenzsubstanz	R <sub>t</sub> [min]	Referenzsubstanz	R <sub>t</sub> [min]
1,5-AF	11,7	D-Xylose	11,8
1,5-AM	14	D-Lyxose	12,3
1,5-AG	12,4	D-Galaktoson	11
D-Glucoson	10,7	D-Glucose	10,6
D-Mannose	11,79	D-Xyloson	11,2

## 2.8 K<sub>m</sub>-Wert Bestimmung

Für die 1,5-AF, das Hauptsubstrat der AFR-(His)<sub>6</sub>, und deren Cosubstrat sowie für 5-Keto-D-fructose wurden die Michaeliskonstanten der Reduktionsreaktion bestimmt (vgl. Kapitel II-20.3). Dazu wurden Kinetiken bei zwei Enzymkonzentrationen mit verschiedenen Substratkonzentrationen aufgenommen und in der Form eines Lineweaver-Burk-Diagramms dargestellt (Kapitel VIII-4). Die daraus resultierenden K<sub>m</sub>-Werte wurden in der Tabelle 25 zusammengefasst.

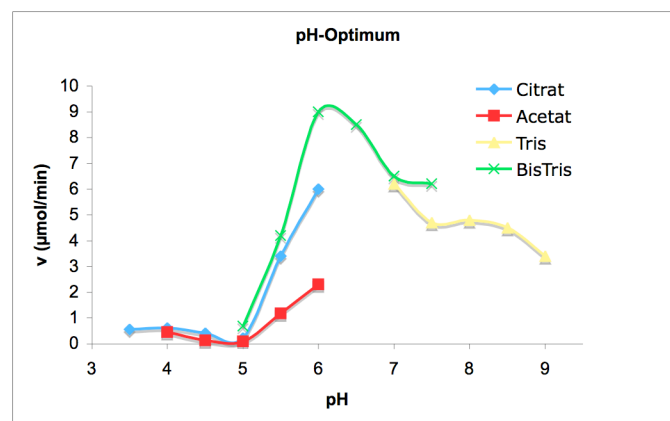
**Tabelle 25: K<sub>m</sub>-Werte der AFR-(His)<sub>6</sub>**

Substrat	K <sub>m</sub> [mM]
1,5-AF	1,0 (± 0,08)
5-KF	6,1 (± 0,3)
NADPH	0,06 (± 0,001)

Die Standardabweichung wurde aus der vierfachen Bestimmung der Extinktionsänderung abgeleitet, die für jede Substratkonzentration bei zwei Enzymkonzentrationen ermittelt wurde.

## 2.9 pH-Optimum und Stabilität

Das pH-Optimum wurde durch die Reaktionsgeschwindigkeit im Bereich von pH 3,5 bis pH 9,0 ermittelt. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit und somit das pH-Optimum des Enzyms wurde im BisTris-Puffer bei pH 6,0 festgestellt. Die Reaktionsgeschwindigkeit bei pH 6,0 in dem optimalen BisTris-Puffer lag um über das 3-fache höher als im Acetat-Puffer und um ein Drittel über der Aktivität im Citrat-Puffer (Abbildung 17).



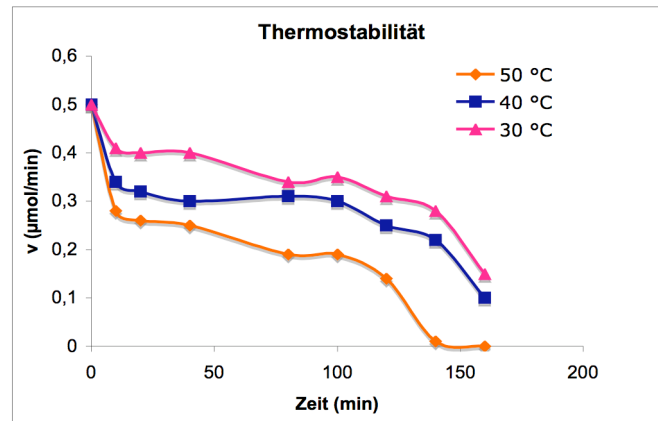
### Abbildung 17: Ermittlung des pH-Optimums der AFR-(His)<sub>6</sub>

Es wurden folgende Puffersysteme für die Messungen verwendet: Citrat von pH 3,5 bis 6,0; Acetat von pH 4,0 bis 6,0; BisTris von pH 5,0 bis 7,5; Tris von pH 7,0 bis 9,0.

In 1 ml 100 mM Puffer wurden 30 mM 1,5-AF und 0,28 mM NADPH mit 340 mU AFR bei 30 °C umgesetzt. Die Extinktionsänderung wurde bei 365 nm verfolgt.

Zur Untersuchung der Thermostabilität wurde das Enzym bei verschiedenen Temperaturen in 20 mM BisTris (pH 6,0) inkubiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit der AFR-(His)<sub>6</sub> wurde in regelmäßigen Abständen photometrisch erfasst (Abbildung 18). Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym bei 50 °C einen direkten Aktivitätsverlust um fast 50 % aufwies, wobei die Halbwertszeit erst nach 40 min erreicht wurde. Nach

140 min bei 50 °C war keine Aktivität der AFR-(His)<sub>6</sub> messbar, das Enzym wurde inaktiviert. Bei 40 °C betrug die Halbwertszeit 120 min, bei 30 °C war das Protein nach 140 min noch zu 50 % aktiv (Abbildung 18).



### Abbildung 18: Thermostabilität der AFR-(His)<sub>6</sub>

0,4 U AFR in 20 mM BisTris (pH 6,0) wurden in Stufen zu 10 °C bei 30-50 °C inkubiert. Die Aktivität des Enzyms wurde in regelmäßigen Zeitabständen im Standardtest ermittelt.

## 3 Kristallisation der 1,5-AF-Reduktase

Die Kristallstruktur der AF-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5 wurde bereits aufgeklärt (Dambe et al., 2006), lies jedoch einige Fragen offen. Zum einen wurde aufgrund der erhaltenen Struktur für diese AF-Reduktase ein Dimer postuliert, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Zum anderen konnte die Kristallisation dieses Enzyms zusammen mit dem Cosubstrat NADPH durchgeführt werden, nicht aber mit dem Substrat 1,5-AF. Die Untersuchungen der Struktur der AF-Reduktase aus *S. meliloti* sollten der Klärung der noch offenen Fragen dienen. Da die rekombinante AFR-(His)<sub>6</sub> aus *S. meliloti* mit einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>tag versehen wurde, der aber bei der Kristallbildung stört, musste eine neue Variante hergestellt werden, bei der die zusätzlichen Histidine abgespalten werden können. Hierzu wurde ein N-terminaler (His)<sub>6</sub>tag mit einer danach folgenden Proteaseschnittstelle vor der Sequenz der AF-Reduktase generiert.

### 3.1 Herstellung der (His)<sub>6</sub>-Prot-AFR

Da die Enzymanreicherung ohne (His)<sub>6</sub>tag sehr aufwendig und dabei ineffizient ist, musste eine Variante der rekombinanten 1,5-AF-Reduktase hergestellt werden, bei der der (His)<sub>6</sub>tag nach der Anreicherung einfach abgespalten werden kann (vgl. Kapitel II-19). Hierfür hat sich die Protease Factor Xa als geeignet erwiesen, weil die für dieses Enzym spezifische Schnittstelle in Form von mehreren Aminosäuren nicht in der Sequenz des *afr*-Gens vorkommt. Die entsprechende Aminosäuresequenz wurde am N-Terminus der AF-Reduktase mittels einer PCR eingefügt (vgl. Kapitel II-19). Als Template für diese Amplifikation wurde das pAFRsm-Plasmid eingesetzt und es wurden folgende Primer verwendet: Mel\_BamHI/N-Protease\_His und Mel\_HindIII\_rev. Der (His)<sub>6</sub>tag wurde N-terminal vor das Startkodon eingefügt, um die native Sequenz des Enzyms zu erhalten. Die Factor Xa-Schnittstelle wurde direkt nach dem (His)<sub>6</sub>tag generiert.

Das modifizierte Gen wurde zuerst in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert (vgl. Kapitel II-6.9.1) und sequenziert (GATC Biotech AG). Nachdem die erhaltene Sequenz als korrekt und vollständig identifiziert werden konnte, folgte die Umklonierung des Gens in den Expressionsvektor pET24a(+). Dazu wurde das Insert mit *Bam*HI und *Hind*III aus dem Plasmid pProtAFRsm geschnitten (vgl. Kapitel II-6.4). Nachdem pET24a(+) mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert wurde, erfolgte die Auftrennung der Verdauansätze im 1 %-igen Agarosegel. Anschließend wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Gel mittels MiniElute<sup>™</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen) reisoliert (vgl. Kapitel II-6.6). Die erhaltenen Reisolat wurden zum Ligationsansatz gegeben und über Nacht bei 16 °C inkubiert (vgl. Kapitel II-6.9.2). Nach der Ligation wurde die Plasmid-DNA p+ProtAFRsm durch Dialyse entsalzt und in elektrokompetente *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.11.1). Um den Erfolg der Ligation bestätigen zu können, wurde sowohl eine *Colony*-PCR (vgl. Kapitel II-6.11.3) als auch eine Plasmid-Präparation (vgl. Kapitel II-6.3) mit anschließendem Kontrollverdau (vgl. Kapitel II-6.4) durchgeführt. Ein positiver Klon wurde ausgewählt und diente als Ausgangsmaterial für die weiteren Experimente.

### 3.2 Kultivierung und Anreicherung der (His)<sub>6</sub>-Prot-AFR

Das modifizierte Enzym konnte erfolgreich in den *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen exprimiert werden. Für die Anreicherung wurden 2 x 250 ml Kultur aus Pepton/Trypton-Medium bei 37 °C inkubiert (vgl. Kapitel II-7.2.1). Bei einer OD<sub>600</sub> von 1 wurde die Produktion des Enzyms durch Zugabe von 0,1 M IPTG induziert (Endkonzentration im Medium 100 µM). Nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen abzentrifugiert, in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0) aufgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. Kapitel II-16.2). Als erster Anreicherungsschritt wurde eine Affinitäts-chromatographie durchgeführt (vgl. Kapitel II-17.1). Die erhaltenen AF-Reduktase-Fractionen wurden in 50 mM BisTris-Puffer (pH 7) umgepuffert (vgl. Kapitel II-17.2), um das Imidazol aus der Proteinlösung zu entfernen, das sowohl bei der Bestimmung der Proteinkonzentration als auch bei dem Proteaseverdau stören würde. Das umgepufferte Enzym wurde dem Verdaugemisch zugefügt und bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (vgl. Kapitel II-17.3), die den letzten Anreicherungsschritt darstellte (Tabelle 27). Hiermit konnte die AF-Reduktase von der sich in der Lösung befindenden Protease und den restlichen Proteinen befreit werden. Da die (His)<sub>6</sub>-Prot-AFR während der Anionenaustauschchromatographie in 32 ml Puffer eluiert wurde, erfolgte anschließend das Aufkonzentrieren der erhaltenen Fractionen unter Anwendung einer Membran mit einer Porengröße von 10 kDa auf 1,5 ml.

**Tabelle 27: Anreicherungstabelle der rekombinanten(His)<sub>6</sub>-Prot-AFR .**

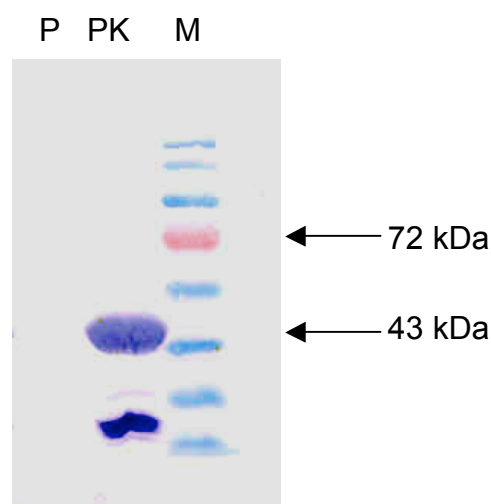
Anreicherungs-schritt	Volumen [ml]	Gesamt-units [U]	Gesamt-protein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Faktor [-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	16	1140	124,6	9,1	1	100
IMAC	4	935	15	62,3	6,8	82
Phenyl-Sepharose	8	914,3	12	76,2	8,3	80
Q-Sepharose	32	850	4,3	197,7	22	74

### 3.3 Protease-Verdau

Die mittels Affinitätschromatographie angereicherte (vgl. Kapitel II-17.1) und in 50 mM BisTris (pH 7,0) umgepufferte (vgl. Kapitel II-17.2)  $(\text{His})_6$ -Prot-AFR wurde nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (vgl. Kapitel II-21) mit der Protease Factor Xa über 24 Stunden bei 25 °C im Wasserbad inkubiert. Die Menge der Protease wurde nach Optimierung des Verdau auf 5 µg pro 50 µg Fusionsprotein bestimmt. Nach der Inkubation wurde die Probe direkt auf Eis gestellt, um die Aktivität des Faktor Xa-Enzyms zu beenden. Das Proteingemisch wurde in dem letzten Anreicherungs-schritt, der Anionenaustauschchromatographie (vgl. Kapitel II-17.3) in die einzelnen Proteine aufgetrennt.

### 4.4 Western Blot

Das Ergebnis der Abspaltung des  $(\text{His})_6$ -tags von der AF-Reduktase wurde mittels Western-Blot (vgl. Kapitel II-20) überprüft. In diesem Experiment wurden  $(\text{His})_6$ -tag-spezifische Antikörper verwendet, die die Anwesenheit des tags mit hoher Sensibilität detektieren.



**Abbildung 19: Western Blot nach dem Factor Xa-Verdau der  $(\text{His})_6$ -Prot-AFR.**

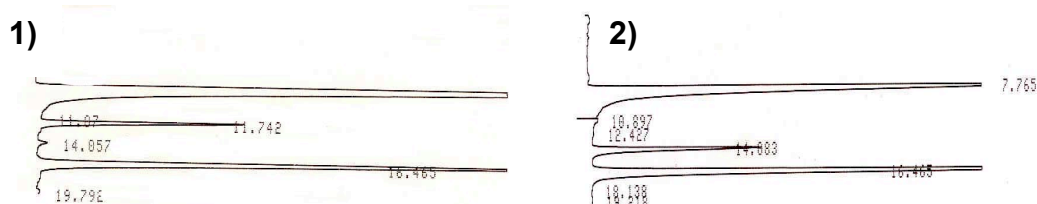
Der Verdau wurde bei 25 °C durchgeführt und optimiert, anschließend wurde er mittels Western Blot überprüft. P-Probe nach dem Verdau; PK-Positivkontrolle mit  $(\text{His})_6$ tag; M-Fermentas PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 µg).

Durch die Blot-Entwicklung konnte gezeigt werden, dass die (His)<sub>6</sub>-Prot-AFR nach der 24 h Inkubation mit der Protease (His)<sub>6</sub>-tag-frei war, und somit für das Kristallisationsverfahren zur Verfügung stand (Abbildung 19). Das angereicherte Enzym wurde anschließend dem Kooperationspartner (AG Scheidig, Universität des Saarlandes) übergeben.

## 4 Metabolismus der 1,5-AF in *S. meliloti* 1021

### 4.1 Umsetzung der 1,5-AF

Die rekombinante 1,5-AF-Reduktase aus *S. meliloti* 1021 verwendet 1,5-AF als Hauptsubstrat. In den Konversionen mit der in *E. coli* exprimierten AFR-(His)<sub>6</sub> wird aus der 1,5-AF das Polyol 1,5-AM gebildet (vgl. Kapitel III-3.7). Es sollte überprüft werden, ob die gleiche Umsetzung von 1,5-AF in Zellextrakten stattfindet. Zur Enzyminduktion wurde *S. meliloti* auf Mineral-Vitamin-Medium mit 1,5-AF als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert (vgl. Kapitel II-5.1). Dabei wurde die optische Dichte bei 600 nm sowie der Verbrauch des Substrates im Medium mittels HPLC verfolgt (Abbildung 8). Nachdem das Wachstum nahezu abgeschlossen war, wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, in 20 mM BisTris (pH 6,5) resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. Kapitel II-16.1). Die Zelltrümmer wurden in einem zweiten Zentrifugationsschritt vom Zellextrakt getrennt. Anschließend wurde der Rohextrakt mit der 1,5-AF inkubiert (vgl. Kapitel II-25.1). Der Inkubationspuffer wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels HPLC-Messung analysiert (vgl. Kapitel II-24).



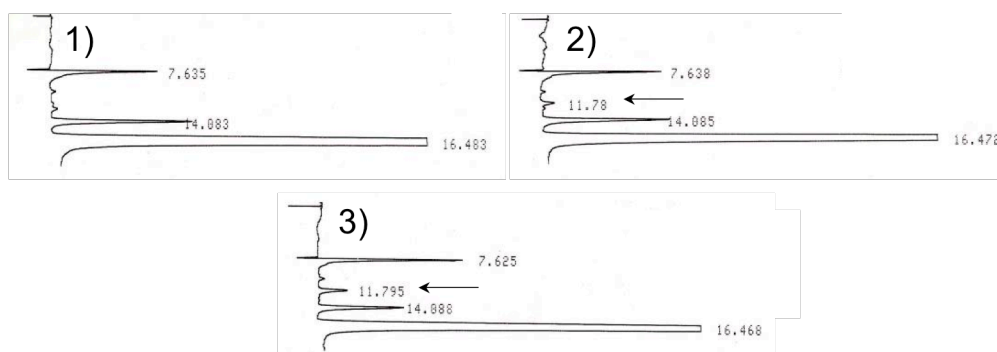
### Abbildung 20: Metabolismus der 1,5-AF *in vivo*

Im Reaktionsansatz wurden ca. 100 mg nasse Zellen in 100 mM BisTris, pH 7 mit 50 mM 1,5-AF bei 28 °C inkubiert. HPLC-Chromatogramme der Probenahme nach 5 min (1) und nach 35 min (2). Retentionszeiten - siehe Tabelle 24.

Die Untersuchungen mittels HPLC haben gezeigt, dass die Zellextrakte 1,5-AF zu 1,5-AM reduzieren (Abbildung 20), wobei offenbar endogene Reduktionsäquivalente genutzt werden. Durch diese Messungen konnte nachgewiesen werden, dass die Reduktion an C2 den ersten Schritt des 1,5-AF-Metabolismus bei *S. meliloti* darstellt, dabei wird stereoselektiv der Zuckeralkohol 1,5-AM gebildet.

#### 4.2 Umsetzung des 1,5-AM

Um die weitere Metabolisierung von 1,5-AM zu D-Mannose in *S. meliloti* zu untersuchen, wurde eine Inkubation des Polyols mit den Zellextrakten durchgeführt. Da an dieser Reaktion möglicherweise ein membranständiges Enzym beteiligt ist, wurden die Zellen nach dem Ultraschallaufschluss nicht abzentrifugiert, sondern die Zelltrümmer wurden in dem Reaktionsansatz mitinkubiert. Die Reaktion wurde über drei Stunden analytisch verfolgt, dabei konnte die 1,5-AM-Abnahme und die Entstehung eines neuen Peaks bei 11,78 min beobachtet werden (Abbildung 21), der mit der Retentionszeit des Standards D-Mannose übereinstimmte (Tabelle 24). Die Entstehung von D-Mannose kann somit nur durch das Einfügen der Lactolgruppe in 1,5-AM aufgrund einer Oxygenierungsreaktion erklärt werden.



**Abbildung 21: Metabolisierung des 1,5-AM im Rohextrakt von *S. meliloti* 1021**

Im Reaktionsansatz wurden 300 mg nasse Zellen mit 100 mM Tris (pH 7), 200 mM 1,5-AM, 14 mM NADPH und 5 mM FAD bei 28 °C inkubiert. Die Probenahme fand im Abstand von 15 min über einen Zeitraum von 3 h statt. Dargestellte Proben: 5 min (1), 90 min (2) und 3 h (3). Pfeil: gebildete D-Mannose



Die mögliche Bildung von 1,5-AF, die eine ähnliche Retentionszeit wie D-Mannose aufweist, konnte aufgrund der reduzierenden Bedingungen des Reaktionsansatzes (NADPH) und wegen des Reaktionsgleichgewichtes (s.o.) ausgeschlossen werden.

## 5 Monoxygenasen aus *S. meliloti* 1021

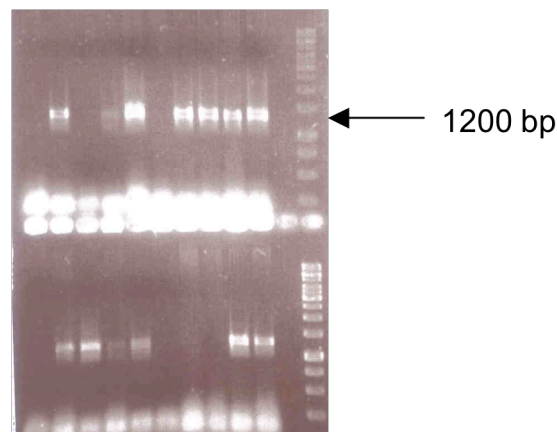
Im Rahmen des Genom Projektes (Finan et al., 2001; Capela et al., 2001; Barnett et al., 2001) wurden auf dem Hauptchromosom von *Sinorhizobium meliloti* zwei Gene identifiziert, die für Cytochrom P450-Monoxygenasen kodieren. Diese ORFs wurden als *Y02579* und *Y01812* bezeichnet. Die Umgebung der beiden Gene gibt keine Hinweise auf eine mögliche Funktion dieser ORFs. Es befinden sich auch keine Gene in der Nähe beider Sequenzen, die für Elektronentransferproteine kodieren (eine Reduktase und ein Schwefel-Eisen Protein).

Die Isolierung und die heterologe Expression der *CYP*-Gene im *E. coli*-System stellten das zweite Ziel dieser Arbeit dar.

### 5.1 Klonierung des *Y01812*-Genes aus *S. meliloti* 1021 und Expression in *E. coli* BL21(DE3)Gold

Von der in der Datenbank hinterlegten Sequenz des ORF *Y01812* wurden die Primer sm mono forw und sm mono/Hind rev His abgeleitet und direkt mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen und einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>tag versehen. Auf diese Weise wurden eine *Bam*HI- und eine *Eco*RI-Schnittstelle direkt vor dem Startcodon, sowie eine *Hind*III-Schnittstelle direkt nach dem Stopcodon eingefügt. Vor dem Stopcodon wurde ein C-terminaler (His)<sub>6</sub>tag generiert. Diese Primer wurden in einer PCR eingesetzt, in der die genomische DNA aus *S. meliloti* als Template verwendet wurde (vgl. Kapitel II-8.1). Damit konnte ein 1248 bp großes Amplifikat erzeugt werden, das mittels TOPO TA cloning Kit in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert und in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert wurde (vgl. Kapitel II-6.9.1). Die erhaltenen Klone wurden mittels *Colony*-PCR (vgl. Kapitel II-6.11.3) auf die Anwesenheit des Inserts überprüft (Abbildung 22). Ein positiver Klon wurde ausgewählt und dessen Plasmid (pMO1812smHis) wurde nach der Plasmid-Reinigung (vgl. Kapitel II-6.3)

sequenziert (GATC Biotech AG). Die Sequenzanalyse bestätigte, dass das *Y01812*-Gen vollständig und fehlerfrei aus der genomischen DNA amplifiziert worden war. Die Nukleotidsequenz der Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> sowie die abgeleitete Proteinsequenz des Enzyms sind in Abbildung 23 dargestellt. Das *Y01812*-Gen weist eine Größe von 1248 bp auf und wird durch einen G+C-Gehalt von 63,2 % charakterisiert. Um zu überprüfen, ob es sich im Fall der erhaltenen Sequenz um eine CYP-Monooxygenase handelt, wurde das Insert des Plasmids pMO1812smHis in den Expressionsvektor pET24a(+) umkloniert. Dazu wurde das Gen aus dem pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor mit *Bam*HI und *Hind*III ausgeschnitten (vgl. Kapitel II-6.4), und nachdem der pET24a(+) mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert worden war, erfolgte die Auftrennung der beiden Ansätze im 1 %-igen Agarosegel (vgl. Kapitel II-6.5). Die Insert- und Vektor-spezifischen Banden wurden mittels MiniElute<sup>™</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel reisoliert und in die Ligation (vgl. Kapitel II-6.9.2) eingesetzt. Nach der Ligation wurde die Plasmid-DNA pMO1812smHis+ durch Dialyse entsalzt und anschließend in elektrokompetente *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II- 6.11.1). Das Ergebnis der Ligation wurde mittels *Colony*-PCR überprüft (vgl. Kapitel II-6.11.3).



**Abbildung 22: *Colony*-PCR nach der Klonierung des *Y01812*-Gens in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor**

Im 1 %-igen Agarosegel wurden 5 µl PCR-Produkt nach der Amplifikation mit dem Primer sm mono forw und sm mono/Hind rev His aufgetragen. In der Spur 11 wurden 2,5 µg GeneRuler<sup>™</sup> 1 kb DNA Ladder dargestellt.

+1	Met Ser Ile Ala Pro Gly Ile Thr Ile Asp Gly Pro Ala Arg Arg Val Ser Leu Asp Val Arg Asn Pro Arg Phe Phe Arg Asn Pro Leu Pro Ala Tyr Ala
1	ATGTCCATCG CCCCGGGTAT CACCAICGAC GGGCCCGGCC CTTGAGGTC CTTGAGGTC CGCAACCCCG GTTTCITCCG CAATCCGCTG CCGGCCITACG
+1	Ala Ala Leu His Ala Gln Cys Pro Ala Phe Phe Trp Glu Glu Pro Gln Gln Trp Phe Phe Ala Gly Tyr Glu Gln Val Asn Ser Leu Leu Arg Asp Arg Arg
101	CGGGCTCCA TGGCAATGT CCGGCCTTTT TCTGGGAAGA GCCGAGCAG TGGTCTTTG CCGGCTACGA GCAGGTGAAC AGCCTGTTG CCGACCGTCC
+1	Arg Phe Gly Arg Gln Ile Leu His Val Ala Thr Arg Glu Glu Leu Gly Met Pro Glu Pro Lys Pro His Leu Lys Asp Phe Asp Ala Leu Glu Ala His Ser
201	CTTCGGCCGA CAGATCCTGC ATGTCCGCAC CCGGGAAGA CTCGGCATGC CGGAGCGAA ACCGCATGTG AAAGATTCG ATGCACTCGA GGCGCACTCG
+1	Leu Leu Glu Leu Glu Pro Pro Ala His Thr Arg Leu Arg Thr Leu Val Asn Arg Ala Phe Val Ser Arg Gln Ile Glu Leu Arg Pro Glu Ile Glu Ala
301	CTGCTCGAAC TGGAGCCTCC GGCCCAATACG CCGTTCGCA CGTCTGTCAA CCGCGCTTC GTCTCCGTC AGATCGAAGA GCTCAGGCCG GAAATCGAGG
+1	Ala Leu Ser His Ala Val Ile Asp Gly Phe Glu Lys Asp Gly Glu Thr Glu Leu Leu Lys Thr Tyr Ala Glu Thr Ile Pro Val Thr Ile Ala Arg Met
401	CGTCTCGCA TGGGTGATC GACGGCTTCG AGAAGGATGG CGAGACCGAG CTGTTGAAGA CCTATGCCGA GACGATCCCG GTAACCATCA TCGCGCGGAT
+1	Met Leu Gly Ile Pro Val Glu Ala Ala Pro Arg Leu Leu Asp Trp Ser His Arg Met Val Lys Met Tyr Val Phe Asn Pro Ser Leu Glu Thr Glu Phe Asp
501	GCTCGGCATT CCGGTCGAAG CCGCGCCGCG TCTGCTCGAC TGGTCCACC GCATGGTGAA GATGTACGTG TTCATATCCA GCCTGGAAAAC GGAGTTCGAC
+1	Ala Asn Asn Ala Ser Ala Glu Phe Ala Asp Tyr Leu Lys Gly Ile Ala Glu Lys Arg Thr Asn Pro Ala Asp Asp Leu Leu Thr His Met Ile Thr Ser
601	GCCAAACAATG CATCGCGGA GTTCGCGAC TACCTGAAAAG GGATCATAGC CGAGAAGCGG ACAAACCCCG CCGACGACCT GCTCAGGCAT ATGATCACCT
+1	Sei Glu Lys Asp Gly Glu Arg Leu Ser Asp Ala Glu Leu Ile Ser Thr Thr Val Leu Leu Leu Asn Ala Gly His Glu Ala Thr Val His Glh Ile Gly Asn
701	CGGAGAAAGA CCGCGAGCGC CTGTCCGACG CCGAGCTGAT TTCGACCACG GTCCTCCTTC TGAATGCCGG CCACGAGGCG ACGGTTTCATC AGATCGGCAA
+1	Asn Ala Val Arg Thr Ile Leu Gln Ser Gly Leu Ser Pro Ala Glu Leu Phe Ser Asp Glu Lys Ala Thr Glu Arg Thr Val Glu Cys Leu Arg Phe Ala
801	TGCGGTGCGC ACGATCCTGC AGTCCGGCCT CTCGCCCGCC GAACTTTTCT CGGACGAGAA GCGGACGGAG CGCACCGTGG AGGAGTGTCT GCGCTTCGCC
+1	Ala Pro Leu His Ile Phe Gln Arg Tyr Ala Leu Met Asp Ile Glu Leu Glu Asn Gly Ile Ala Leu Arg Lys Gly Asp Lys Ile Gly Leu Met Leu Gly Ala
901	GGCCCTTGC ACATCTTCCA GCGCTACGCC CTCATGGATA TCGAGCTGGA GAACGGCATC GCCCTCAGGA AAGGGACAA GATCGGCCGTG ATGCTGGGGG
+1	Ala Ala Asn Val Asp Pro Arg Lys Phe Ser Ser Pro Asp Thr Phe Arg Pro Asp Arg Asn Glu Gly Ala Asn Val Ser Phe Gly Ala Gly Leu His Phe Cys
1001	CGGCGAACGT CGATCCGCGC AAATTCTCTCT CTCGCCATAC GTTCAGGCCG GACCGCAACG AAGGCGCCAA TGTTCGTTC GGCGCCGCC TGCACCTTCTG
+1	Cys Ile Gly Ala Pro Leu Ala Arg Leu Glu Leu Gln Ile Ser Leu Pro Ile Leu Phe Arg Arg Leu Pro Gly Met Arg Leu Lys Asn Glu Pro Val Lys
1101	CATCGGCGCA CCGCTGGCAC GGCTGGAGTT GCAGATTTTC CTGCCGATCC TGTTCCGACG GCTTCCCGGG ATGCGGCTCA AGAACGAGCC GCCGGTCAAG
+1	Asp Ala Phe His Phe His Gly Leu Glu Arg Leu Asp Leu Val Trp ***
1201	GAGCCCTCC ACTTTCATGG TCTGGAGCGG CTCGATCTGG TCTGGTGA

Abbildung 23: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der Monooxygenase MO1812 aus *S. meliloti* 1021.

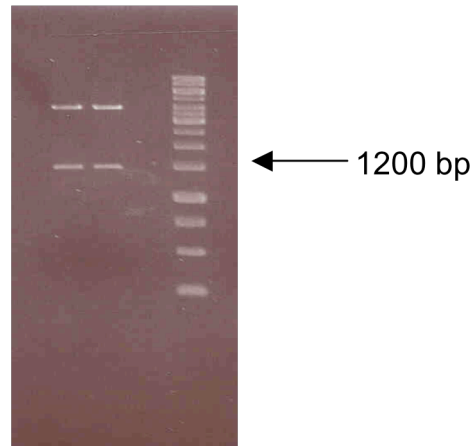
Durch die heterologe Expression des *Y01812*-Gens in *E. coli* BL21(DE3)Gold [pMO1812smHis] konnte die Bildung der aktiven Monooxygenase gezeigt und somit das Insert als Monooxygenase-*Y01812*-Gen bezeichnet werden.

## 5.2 Klonierung des *Y02579*-Genes aus *S. meliloti* 1021 und Expression in *E. coli* BL21(DE3)Gold

Die Sequenz des ORF *Y02579* war ebenfalls in der Datenbank hinterlegt, was eine direkte Primer-Ableitung ermöglichte. Diese wurden mit einer *Bam*HI-Schnittstelle am 5'-Ende und einer *Eco*RI- zusammen mit einer *Hind*III-Schnittstelle am 3'-Ende versehen. In die Sequenz des 3'-Primers wurde ein C-terminaler (His)<sub>6</sub>tag eingefügt. Diese Primer (2579 *Bam*HI forw und 2579 *Hind*III *Eco*RI His rev) wurden in einer PCR eingesetzt, in der die genomische DNA aus *S. meliloti* als Template verwendet wurde (vgl. Kapitel II-8.2). Das erhaltene Amplifikat wurde mittels TOPO TA cloning Kit in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert und in die *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.9.1). Die erhaltenen Klone wurden mittels *Colony*-PCR (vgl. Kapitel II-6.11.3) auf die Anwesenheit des Inserts überprüft. Ein positiver Klon (pMO2579smHis) wurde nach der Plasmid-Reinigung (vgl. Kapitel II-6.3) sequenziert (GATC Biotech AG). Die Sequenzanalyse bestätigte, dass es sich im Fall dieses Inserts um das *Y02579*-Gen handelt. Die Nukleotidsequenz der Monooxygenase MO2579-(His)<sub>6</sub> sowie die abgeleitete Proteinsequenz des Enzyms sind in Abbildung 25 dargestellt. Das *Y02579*-Gen ist 1401 bp lang und zeichnet sich durch einen G+C-Gehalt von 64,7 % aus.

Das Gen *Y02579* wurde in den Expressionsvektor pET24a(+) ligiert (vgl. Kapitel II-6.9.2). Dazu wurde das Insert pMO2579smHis aus dem pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor mit *Bam*HI und *Hind*III ausgeschnitten (vgl. Kapitel II-6.4), und nach dem Verdau des pET24a(+) mit den gleichen Restriktionsenzymen wurden beide Ansätze im 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II-6.5). Die Insert- und Vektor-spezifischen Banden wurden mittels MiniElute<sup>™</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel reisoliert und in die Ligation (vgl. Kapitel II-6.9.2) eingesetzt. Nach der Ligation wurde die Plasmid-DNA pMO2579smHis+ durch Dialyse entsalzt und anschließend in die elektrokompenten *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-

6.11.1). Das Ergebnis der Ligation wurde mittels *Colony-PCR* (vgl. Kapitel II-6.11.3) und Kontrollverdau (vgl. Kapitel II-6.4) überprüft (Abbildung 24).



**Abbildung 24: Kontrollverdau des Plasmids pMO2579smHis+ mit *Bam*HI und *Hind*III**

Im 1 %-igen Agarosegel wurden 5  $\mu$ l von jedem Verdauansatz aufgetragen. In der letzten Spur wurden 2,5  $\mu$ g GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder dargestellt.

+1	Met Asp Thr Arg Pro Glu Pro Phe Glu Pro Ala Pro Val Pro Arg Thr Gly Ile Pro Ser Arg Leu Glu Ile Arg Thr Val Leu Arg Asn Pro Leu
1	ATGATACGC GACCGGAGCC GTTCGAGCCG CCCGGCCCCG TCCCGGGCAC CGGATATCCC TCGGGGCTCG AGATATACCC CACGGTTCTG CGAAACCCCG
+1	Leu Glu Leu Trp Gly Glu Pro Ser Tyr Thr Leu Pro Trp Ile Glu Thr Lys Phe Ile Asn Gln Arg Thr Leu Ile Val Asn Asp Pro Gly Leu Ile Arg Tyr
101	TCGAGCTCTG GGGCGAGCCT TCATACACGC TTCCTGGAT CGAGACGAAG TTCATCAATC AGCGGACGGT TATCGTCAAC GATCCAGGCC TCATCCGGTA
+1	Tyr Ile Leu Val Glu Asn Ala Ala Asn Tyr Glu Met Ser Asn Val Arg Arg Leu Ile Leu Arg Asp Gly Leu Thr Ala Glu Gly Glu
201	CATCTCTGTC GAGAACGCG CCAACTACGA AATGTGAAAT GTTCGGGCGC TGATCTCTGC CCCGATCTCTG CGCGACGGCC TCCGACGGC GGAAGGGCGAG
+1	Val Trp Lys Arg Ser Arg Lys Ala Met Ala Pro Val Phe Thr Pro Arg His Ala Gln Gly Phe Ala Gly Gln Met Leu Arg Val Cys Glu Ala Phe Val Asp
301	GTCTGAAAC GGTCCGGCAA GCGGATGGCG CCGGTTTTCA CGCCAAGCA CGCAAGGC TTTCGGGGCC AGATGGCTCG CGTTTGGGAG GCCTTCGTTG
+1	Asp Arg Tyr Ala Gly Ala Ser Ser Glu Pro Phe Val Thr Asn Val Ala Val Asp Met Thr Glu Leu Thr Phe Glu Ile Leu Ala Glu Thr Leu Phe Ser Gly
401	ACCGCTACGC GGGCGCTCA TCGGAGCCCT TCGTCACCAA TGTCCGCGTG GACATGACGG AACTCACCTT CGAGATCTCTG GCGGAGACGC TCTTTTCCGG
+1	Gly Glu Ile Ala Val Glu Lys Gln Gly Phe Ala Ala Asn Val Glu Glu Leu Leu His Arg Met Gly Arg Val Asp Pro Met Asp Leu Leu Val Ala Pro Ser
501	CGAAATCGCC GTCGAAAAGC AGGGCTTCGC CGCCAATGTC GAGGAATGC TGCATCGAAT GGGGGCGGTC GATCCGATGG ACCTCCTGGT TCGCCCGGAGC
+1	Trp Val Pro Arg Leu Thr Arg Ile Gly Gly Arg Lys Val Leu Asp Arg Phe Arg Gly Val Val Ser Glu Thr Met Ser Leu Arg Arg Thr Thr Glu
601	TGGGTTCCGC GGCTGACCCG CATCCGGCGC CGAAAGGTGC TCGACCGTTT TCGCGGCGTC GTTTCGGAGA CGATGCTCTT GCGCCGGCGA CGGACGACGG
+1	Glu Ala Pro Gly Asp Val Pro Asn Asp Phe Leu Thr Leu Leu Glu Glu Gly Pro Asp Gly Leu Ser Thr Ser Glu Ile Glu Asp Asn Ile Leu Thr
701	AAGGCCCCGG CGACGTCCCG AACGACTTCC TGACCTTGTCT TGTGCAGGTG GAAGGTCCCG ATGGACTTTC GACCTCCGAG ATCGAGGACA ATATTCTCAC
+1	Thr Phe Ile Gly Ala Gly His Glu Thr Thr Ala Arg Ala Leu Ala Trp Cys Phe Tyr Cys Val Ala Asn Thr Pro Ala Tyr Arg Glu Thr Met Glu Gln Glu
801	CTTCATCGGC GCCGGCCAGC AGACGACCCG ACGGGCGCTC GCCTGGTGTCT TCTATTGGCT CGCCAATACG CCCGCCTACC GCGAGACGAT GGAGCAGGAG
+1	Ile Asp Ser Val Leu Ala Ser Gly Ala Asp Pro Val Asp Trp Leu Gly Arg Met Pro His Val Leu Ala Ala Phe Glu Glu Ala Leu Arg Leu Tyr Pro Pro
901	ATCGATTCCG TTCTTGGCAG CGGGCCCGAT CCGGTCCGACT GGCTCCGGCG CATGCCGCAT GTGCTTGGCG CCTTCGAGGA GGGGTTGAGG CTTATATCCG
+1	Pro Ala Pro Ser Ile Asn Arg Ala Ala Ile Glu Glu Asp Ala Trp Thr Ser Pro Glu Gly Glu Arg Val Pro Ile Arg Lys Gly Ile Ser Val Leu Val Met
1001	CGGGCCCATC CATCAACCGG GCGCGATCG AGGAGGATGC GTGGACATCC CCGGAAGGCG AGCGGTGCC GATCCGCAAG GGAATATCCG TGCTGGTGCAT
+1	Met Pro Trp Thr Leu His Arg His Ala Leu Tyr Trp Gln Lys Pro Arg Ala Phe Met Pro Glu Arg Phe Leu Pro Glu Asn Arg Asp Lys Ile Asn Arg Phe
1101	GCCTGGAGC CTCCACCGC ACGCGTCTTA CTGGCAGAAA CCCCGCGCTT TCATGCCGGA GCGTTTCCCT CCGGAAAACC GCGACAAAGT AAACCCGTTTC
+1	Gln Tyr Leu Pro Phe Gly Ala Gly Pro Arg Val Cys Ile Gly Ala Thr Phe Ala Leu Gln Glu Ala Val Ile Ala Leu Ala Val Leu Met His Arg Phe Arg
1201	CAGTACCTGC CCTTCGGGCG CGGCCCGGCG GTCTGCATCG GCGGACCTT CCGCGTGCAG GAGGGGTGA TCGCGGTTGC CGTGCTCATG CACCGCTTCC
+1	Arg Phe Asp Leu Thr Asp Glu Thr His Pro Trp Pro Val Gln Arg Leu Thr Thr Gln Pro Arg Gly Gly Leu Pro Met Lys Val Ser Ala Arg Val Lys **
1301	GCTTCGATCT GACGGACGAG ACGCATCCCT GGCCTGTGCA AAGGCTGACG ACGGACCCGA GGGGCGGCTT GCCGATGAAG GTGTCGGCAA GGGTCAAGTA
+1	**
1401	G

Abbildung 25: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der Monooxygenase MO2579 aus *S. meliloti* 1021.

## 6 Isolierung und Charakterisierung der rekombinanten Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> aus *E. coli* BL21(DE3)Gold

### 6.1 Anzucht

Die Anzucht der MO1812-(His)<sub>6</sub>-bildenden *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen wurde in 250 ml kanamycinhaltigem Pepton/Trypton-Medium im 1 L-Erlenmeyerkolben durchgeführt (vgl. Kapitel II-8.3). Es wurde eine Vorkultur (25 ml) mit 10 µl Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C angezogen. Diese wurde komplett in die Hauptkultur (250 ml) überimpft und bis zur Induktion bei 37 °C kultiviert. Die MO1812-(His)<sub>6</sub>-enthaltenden *E. coli*-Zellen wurden bei OD<sub>600</sub>=2 durch Zugabe von 100 µM IPTG induziert, anschließend wurde die Kultivierung über weitere 24 h bei 28 °C durchgeführt. Diese Temperatur hat sich als optimal für die Produktion der Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> erwiesen, da hier keine *inclusion body*-Bildung beobachtet werden konnte. Anschließend wurden die Zellen geerntet und das Pellet im Verhältnis 3 ml Puffer pro 1 g Feuchtwicht in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0) aufgenommen. Nach erfolgtem Zellaufschluss mittels Ultraschall (vgl. Kapitel II-16.2) wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation von den löslichen Proteinen getrennt und der Rohextrakt konnte für die Enzymanreicherung weiter verwendet werden.

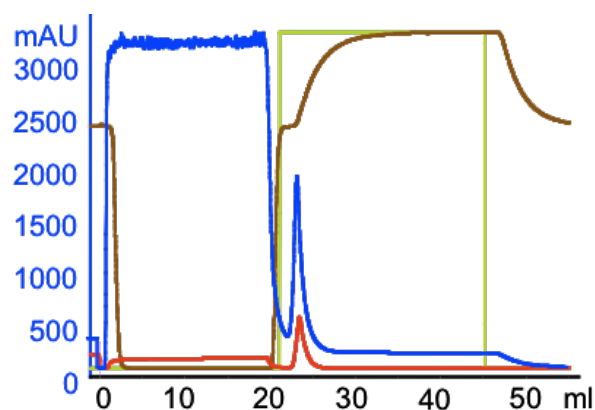
### 6.2 Reinigung

Die Reinigung der rekombinanten Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> aus dem Rohextrakt erfolgte durch eine Affinitätschromatographie (vgl. Kapitel II-17.1) an einer Chelating Crude 1 ml FF Säule. Das Protein wurde mit Imidazol eluiert und in drei Fraktionen von je 2 ml aufgefangen. Aufgrund des kovalent gebundenen Häms konnte bei der Elution der Monooxygenase zusätzlich zu der Protein-typischen Absorption bei 280 nm ein Peak bei 450 nm beobachtet werden. Die Monooxygenase-Fraktion wurde anschließend mittels Phenyl Sepharose-Säule umgepuffert (vgl. Kapitel II-17.2), um das Imidazol aus der Probe zu entfernen und um den Elutionspuffer durch 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) zu ersetzen. Zu jeder Enzymanreicherung wurden jeweils 3 g Feuchtwicht verwendet. Das

Elutionsdiagramm ist in Abbildung 26 dargestellt. Die Zusammenfassung des Anreicherungsverlaufs zeigt Tabelle 27. Die Tabelle zeigt, dass eine Ermittlung der Monooxygenase-Aktivität erst nach der Reinigung des Proteins möglich war. Der Aktivitäts-Assay wurde gemäß Kapitel II-3.10 durchgeführt.

**Tabelle 27: Anreicherungstabelle der rekombinanten Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub>**

Anreicherungsschritt	Volumen [ml]	Gesamtunits [U]	Gesamtprotein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Faktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	16	-	143	-	-	-
HisTrap	6	0,5	3,7	0,14	-	-



**Abbildung 26: Elutionsdiagramm einer Affinitätschromatographie der rekombinanten MO1812-(His)<sub>6</sub> aus *S. meliloti* 1021**

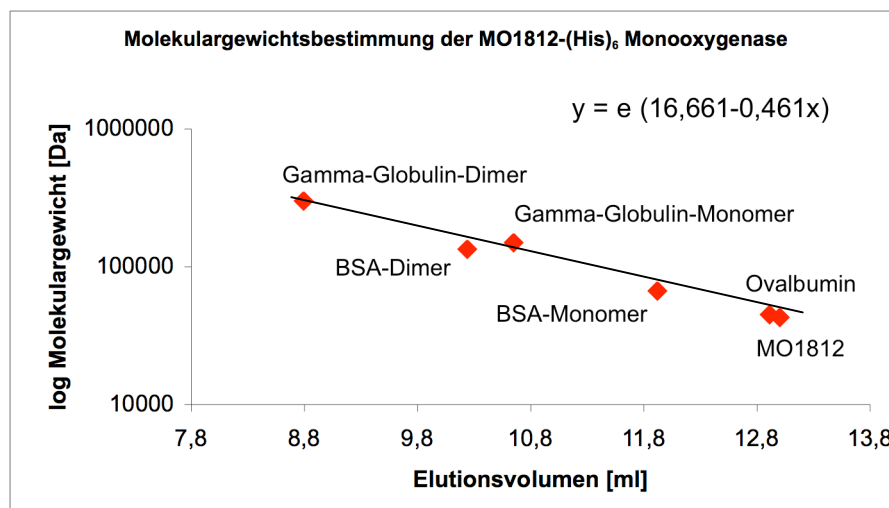
blau – Absorption bei 280 nm; rot – Absorption bei 450 nm; grün – Konzentration des Gradienten (bis 0,5 M Imidazol)

### 6.3 Bestimmung des Molekulargewichtes

Das Molekulargewicht der Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> konnte aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz ermittelt werden und betrug 43 kDa. Die experimentelle Molekulargewichtsbestimmung des Proteins erfolgte durch eine Gelfiltration (vgl. Kapitel II-26.2.2).



Hierzu wurde eine Superdex 200 HR10 30 Säule verwendet. Als Puffersystem für die Trennung der MO1812-(His)<sub>6</sub> wurde 50 mM BisTris (pH 7,0) mit 100 mM NaCl verwendet. Die Eichung dieser Säule wurde wie zuvor (vgl. Kapitel III-3.3) mit folgenden Proteinen durchgeführt: Gamma-Globulin, BSA und Ovalbumin. Nach der Bestimmung der Elutionsvolumina dieser Proteine wurde eine Eichgerade erstellt, indem der Logarithmus der Molekulargewichte gegen die Elutionsvolumina graphisch aufgetragen wurde. Anschließend folgte die Elution des Fusionsproteins (Abbildung 27). Aus der Geradengleichung konnte das relative Molekulargewicht der Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> von Mr = 43 errechnet werden. Dieses Protein liegt als Monomer vor.

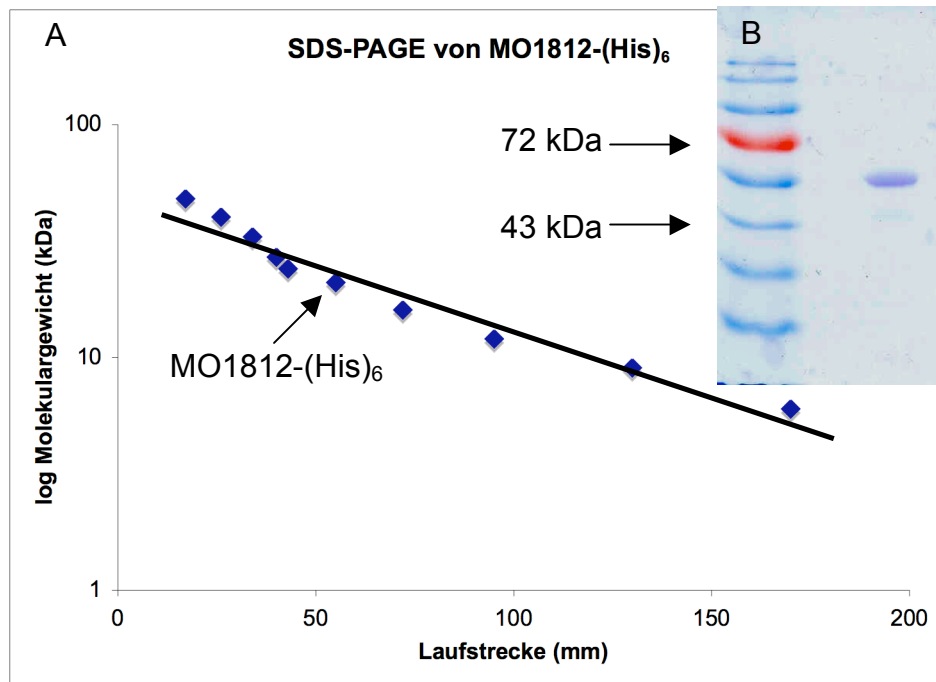


**Abbildung 27: Ermittlung des Molekulargewichtes der MO1812-(His)<sub>6</sub> mittels Gelfiltration**

Von jedem Eichprotein sowie der angereicherten Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> wurden 0,5 ml einer 2,5 mg/ml-Lösung auf die Superdex 200 HR10 30 Säule (vgl. Kapitel II-26.2.2) aufgetragen. Die Elutionsvolumina wurden bei einer Flussrate von 0,5 ml/min ermittelt.

#### 6.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Reinheit der Probe nach der Anreicherung zu überprüfen und um das Molekulargewicht verifizieren zu können, wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (vgl. Kapitel II-18.1). Dazu wurden ein 9 %-iges Trenn- und ein 4 %-iges Sammelgel verwendet (Abbildung 28).



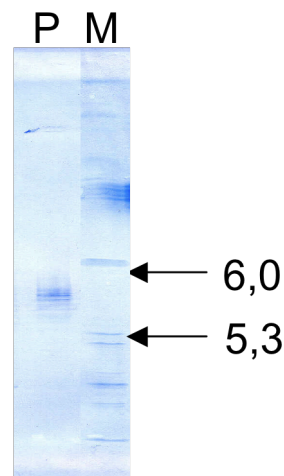
### Abbildung 28: SDS-PAGE nach der Anreicherung der rekombinanten MO1812-(His)<sub>6</sub>

(A) Graphische Auswertung der elektrophoretischen Trennung. (B) Links 10 µg Protein Ladder 11-170 kDa (Fermentas). Rechts 10 µg angereichertes Protein nach der Affinitätschromatographie.

Das in der SDS-PAGE durch den Vergleich mit den Referenzproteinen ermittelte Molekulargewicht der MO1812-(His)<sub>6</sub> stimmt mit dem aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewicht von 43 kDa überein.

## 6.5 Isoelektrischer Punkt

Die isoelektrische Fokussierung der MO1812-(His)<sub>6</sub> (vgl. Kapitel II-26.1) wurde in einem Polyacrylamidgel mit einem pH-Gradient von 3 bis 10 durchgeführt (Abbildung 29). Der isoelektrische Punkt konnte mittels der Eichproteine des Standards P9 auf pH 5,6 bestimmt werden.



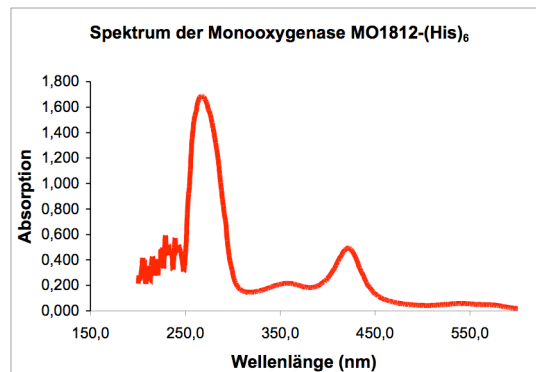
**Abbildung 29: Isoelektrische Fokussierung der MO1812-(His)<sub>6</sub> im pH-Bereich von 3 bis 10.**

Im Polyacrylamidgel (pH 3-10) wurden 10 µl Proteinstandard P9 (M) und 7,5 µg angereicherte MO1812-(His)<sub>6</sub> (P) bis zur Spannung 2000 V, 3,7 mA und 6,0 W fokussiert.

### 6.6 UV/VIS-Spektrum der rekombinanten Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub>

Die Aufnahme des Spektrums wurde durchgeführt, um feststellen zu können, ob es sich im Fall dieser Monooxygenase um ein Häm-enthaltendes und somit um ein aktives Protein handelt. Das Absorptionsspektrum der sich in einem oxidierten Zustand befindenden Monooxygenase zeigte einen Häm-spezifischen Peak bei 420 nm (Abbildung 30). Es konnten keine weiteren Peaks im Bereich zwischen 450 und 510 nm festgestellt werden, was auf eine Flavin-Anwesenheit hindeuten würde. Das bedeutet, dass dieses Enzym keine Reduktase- und keine Redoxin-Domäne enthält und somit für seine Aktivität auf die Präsenz der Reduktase und des Redoxins im Reaktionsgemisch angewiesen ist. Die Detektion eines Peaks bei 420 nm ist ein erster Hinweis darauf, dass das Enzym in einer aktiven Form vorliegt und lässt vermuten, dass auch die Konformation des Enzyms richtig ist. Eine Aussage über die Faltung einer Monooxygenase ist nach der Aufnahme eines CO-Differenz-Spektrums möglich (Omura und Sato, 1964). Dabei kann beobachtet werden, wie sich das Absorptionsmaximum des Häms unter dem Einfluss von Natriumdithionit von 420 nm auf 450 nm verschiebt (vgl. Kapitel VIII-6). Diese Reaktion beruht auf der Reduktion von Fe<sup>3+</sup> zu Fe<sup>2+</sup>, welches in der Lage ist, einen Komplex mit CO zu

bilden. Die maximale Absorption dieses Komplexes liegt bei 450 nm. Das CO-Differenz-Spektrum der Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> zeigte die erwartete Verschiebung des Peaks von 420 nm auf 450 nm, was die Vermutung bestätigte, dass es sich im Fall dieses Proteins um ein aktives und korrekt gefaltetes Enzym handelt.



**Abbildung 30: UV/VIS-Spektrum der Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> im Wellenlängenbereich von 150 nm bis 600 nm.**

## **7 Isolierung und Charakterisierung der rekombinanten Monooxygenase MO2579-(His)<sub>6</sub> aus *E. coli* BL21(DE3)Gold**

### **7.1 Anzucht**

Die MO2579-(His)<sub>6</sub>-enthaltenden *E. coli*-Zellen wurden in 250 ml kanamycinhaltigem Pepton/Trypton-Medium kultiviert. Es wurde eine Vorkultur (25 ml) mit 10 µl Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C angezogen. Diese wurde komplett in die Hauptkultur (250 ml) überimpft und bis zur Induktion bei 37 °C kultiviert. Die Induktion erfolgte bei einer OD<sub>600</sub>=1 durch Zugabe von 100 µM IPTG. Es wurden drei verschiedene Kulturen über weitere 24 h bei jeweils 37 °C, 28 °C und 20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und im Verhältnis 3 ml Puffer pro 1 g Feuchtgewicht in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0) aufgenommen. Danach erfolgte der Zellaufschluss mittels Ultraschall (vgl. Kapitel II-16.2). Der nach dem letzten

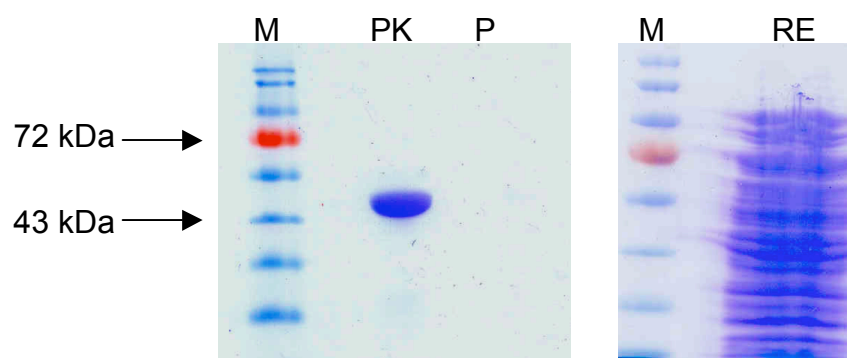
Zentrifugationsschritt erhaltene Rohextrakt wurde für die weitere Enzymanreicherung verwendet.

## 7.2 Reinigung

Die Reinigung der rekombinanten Monooxygenase MO2579-(His)<sub>6</sub> erfolgte mittels einer Affinitätschromatographie (vgl. Kapitel II-17.1). Die jeweiligen Rohextrakte aus den bei verschiedenen Temperaturen kultivierten Zellen wurden auf die Chelating Crude 1 ml FF Säule aufgetragen. Die Elution des Fusionsproteins wurde mittels Imidazol durchgeführt. In allen drei Ansätzen konnte jedoch keine bzw. nur eine sehr geringe Menge des Proteins eluiert werden. Der im Elutionsdiagramm erhaltene Proteinpeak war sehr klein und farblos, was die Annahme erlaubte, dass dieses Protein in *E. coli* sehr schwach exprimiert wird und in einer inaktiven Form vorliegt.

## 7.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinigung des Proteins wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft (vgl. Kapitel II-18.1). Es wurden ein 9 %-iges Trenn- und ein 4 %-iges Sammelgel verwendet.



### Abbildung 31: SDS-PAGE nach der Anreicherung der rekombinanten MO2579-(His)<sub>6</sub>

Links wurden 10 µg Protein Ladder 11-170 kDa (Fermentas) (M), 50 µg Positivkontrolle – gereinigte MO1812-(His)<sub>6</sub> (PK) und 30 µl der auf 0,5 ml eingengten Fraktion nach der Affinitätschromatographie (P) aufgetrennt. Rechts wurden 20 µg Rohextrakt (RE) aufgetragen.

Die erhaltene Proteinmenge war jedoch so gering, dass die Detektion des Proteins mittels Coomassie-Färbung nicht möglich war. Es konnte ebenfalls keine Bildung eines überexprimierten Proteins im Rohextrakt festgestellt werden (Abbildung 31).

#### 7.4 UV/VIS-Spektrum der rekombinanten Monooxygenase MO2579-(His)<sub>6</sub>

Das UV/VIS-Spektrum wurde aufgenommen, um bestätigen zu können, dass es sich im Fall dieser Monooxygenase tatsächlich um ein inaktives Protein handelt. Wie erwartet konnte bei der Aufnahme des Spektrums kein Peak bei 420 nm nachgewiesen werden (Abbildung 32), was die Vermutung, dass dieses Enzym keine aktive Häm-Form besitzt und somit inaktiv ist, verifiziert hat. Aufgrund dieser Feststellung wurden keine weiteren Experimente mit diesem Protein durchgeführt.

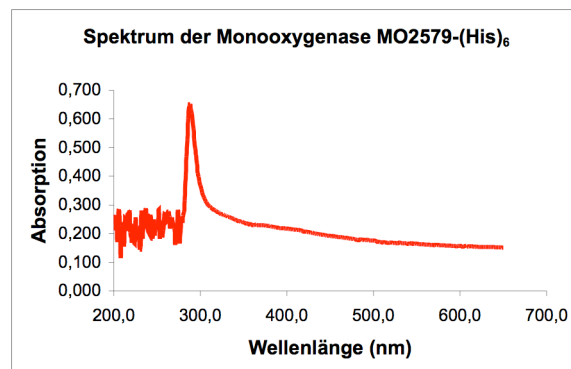


Abbildung 32: UV/VIS-Spektrum der Monooxygenase MO2579-(His)<sub>6</sub> im Wellenlängenbereich von 200 nm bis 650 nm.

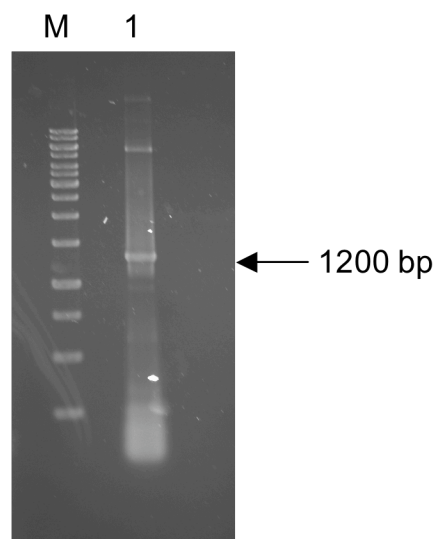
## 8 Putidaredoxin-Reduktase (PdR) und Putidaredoxin (Pdx) aus *Pseudomonas putida*

Da die Elektronentransferproteine für die Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> im Genom von *S. meliloti* nicht identifiziert werden konnten, und somit nicht zugänglich waren, wurde untersucht, ob die Elektronentransferproteine aus einem anderen Organismus von der Monooxygenase aus *S. meliloti* genutzt werden können. Kampher

abbauende *Pseudomonas putida*-Stämme verfügen über ein sogenanntes Kampher-Plasmid, das die Gene der Putidaredoxin-Reduktase, des Putidaredoxins und der Monooxygenase-P450<sub>cam</sub> trägt (*camA*-PdR, *camB*-Pdx, *camC*-CYP450). Die Sequenzen aller drei Gene sind bereits bekannt und somit auch in der Datenbank zu finden. Deswegen konnten die Primer auf dieser Basis direkt abgeleitet werden.

### 8.1 Klonierung des *camA*-Genes aus *Pseudomonas putida*

Von der in der Datenbank hinterlegten Sequenz wurden Primer abgeleitet und in einer PCR eingesetzt (vgl. Kapitel II-10.1), in der als Template die Plasmid-DNA (vgl. Kapitel II-6.3) aus *P. putida* verwendet wurde. Das Ergebnis der Amplifikation des *camA*-Genes wurde in einem 1 %-igen Agarosegel überprüft (Abbildung 33).



**Abbildung 33: *camA*-Gen Amplifikation aus der Plasmid-DNA von *P. putida*.**

Im 1 %-igen Agarosegel wurde in der Spur 1 ca. 1 µg PCR-Produkt nach Amplifikation mit Primer: *camA* Koga forw und *camA* Koga rev aufgetragen. In der Spur M wurde 2,5 µg GeneRuler™ 1 kb Ladder dargestellt.

Das Amplifikat wurde mittels TOPO TA cloning Kit in den pCR®II-TOPO®-Vektor kloniert und in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.9.1). Die Anwesenheit des Inserts in den erhaltenen Klonen wurde mittels *Colony*-PCR überprüft (vgl. Kapitel II-6.11.3). Es wurde ein positiver Klon ausgewählt und dessen

Plasmid (pcamA) wurde nach der Plasmidreinigung (vgl. Kapitel II-6.3) sequenziert (GATC Biotech AG). Die mittels Sequenzierung erhaltenen Ergebnisse bestätigten, dass es sich im Fall dieses 1286 bp großen Inserts um das *camA*-Gen handelt, das fehlerfrei aus der Plasmid-DNA amplifiziert werden konnte. Die Nukleotidsequenz des *camA*-Genes, sowie die abgeleitete Proteinsequenz des Enzyms wurden in Abbildung 34 dargestellt.

Das Plasmid pcamA wurde in einer zusätzlichen PCR als Template eingesetzt, bei der die Primer PdR NdeI forw und PdR BamHI rev verwendet wurden. Diese PCR wurde durchgeführt, um das Insert für die weitere Klonierung mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen zu versehen. Außerdem wurde das Startcodon GTG durch ATG ersetzt, was in der Substitution der Aminosäure Valin gegen Methionin resultierte. Der Austausch des Startcodons erhöht die Expression der Reduktase um das 18-fache (Peterson et al, 1989). Zusätzlich wurde mittels dieser PCR eine C-terminale Linkersequenz (TDGTASS) in das *camA*-Gen eingefügt und das Stopcodon entfernt, was für die spätere Fusionsproteinerstellung notwendig war. Das PCR-Produkt wurde in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II-6.5), mittels MiniElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) reisoliert, anschließend in den pCR®II-TOPO®-Vektor kloniert und in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.9.1). Die Klonierung wurde wie zuvor mittels *Colony*-PCR überprüft (vgl. Kapitel II-6.11.3). Das Plasmid wurde gereinigt (vgl. Kapitel II-6.3) und das Insert wurde sequenziert (GATC Biotech AG). Somit konnte bestätigt werden, dass die erneute *camA*-Gen-Amplifikation mutationsfrei verlaufen ist.

Um das *camA*-Gen als Putidaredoxin-Reduktase heterolog zu exprimieren, wurde das Insert aus dem pcamA Plasmid mittels der Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* ausgeschnitten (vgl. Kapitel II-6.4). Der pET24a(+)-Vektor wurde parallel dazu mit den gleichen Enzymen linearisiert. Beide Verdauansätze wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II-6.5) und mittels MiniElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel reisoliert. Anschließend wurden beide Reisolat in einen Ligationsansatz (vgl. Kapitel II-6.9.2) eingesetzt. Nach der Ligation wurde die Plasmid-DNA pcamA+ durch Dialyse entsalzt und in elektrokompente *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.11.1). Der Erfolg der Ligation wurde wiederum mittels *Colony*-PCR überprüft (vgl. Kapitel II-6.11.3).



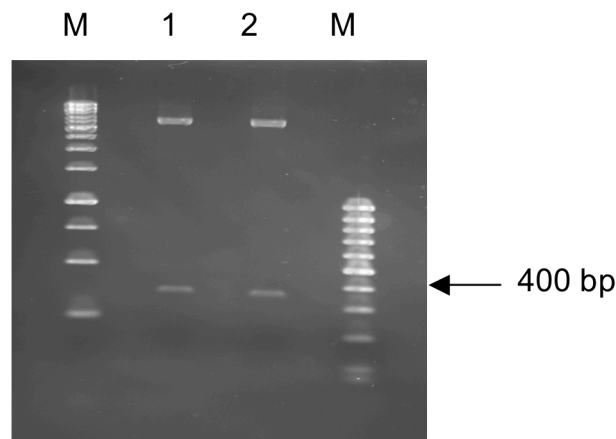
+1	Val Asn Ala Asn Asp Asn Val Val Ile Val Gly Thr Gly Leu Ala Gly Val Glu Val Ala Phe Gly Leu Arg Ala Ser Gly Trp Glu Gly Asn Ile Arg Leu
1	GTGAACGCAA ACGACAACGT GGTCAATCGTC GGTACCGGAC TGGCTGGCGT TAGAGTCCGC TTCGGCCTGC GCGCCAGCGG CTGGGAAGGC AATATCCGGT
+1	-Leu Val Gly Asp Ala Thr Val Ile Pro His His Leu Pro Pro Leu Ser Lys Ala Tyr Leu Ala Gly Lys Ala Thr Ala Glu Ser Leu Tyr Leu Arg Thr Pro
101	TGGTGGGGGA TCGGACGGTA ATTCCCCATC ACCTACCACC GCTATCCAAA GGTACTTTGG CCGGCAAAAGC CACAGCGGAA AGCCTGTACC TGAGAACC
+1	Pro Asp Ala Tyr Ala Ala Gln Asn Ile Gln Leu Leu Gly Thr Gln Val Thr Ala Ile Asn Arg Asp Arg Gln Gln Val Ile Leu Ser Asp Gly Arg Ala
201	AGATGCCTAT GCAGGCGAGA ACATCCAACT ACTCGGAGGC ACACAGTAA CGCTATCAA CCGGACCGCA CAGCAAGTAA TCCTATCCGA TGGCCGGGCA
+1	Leu Asp Tyr Asp Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Gly Arg Pro Arg Pro Leu Pro Val Ala Ser Gly Ala Val Gly Lys Ala Asn Asn Phe Arg Tyr Leu Arg
301	CTGGATTACG ACCGGCTGGT ATTGGCTACC GGAGGCGTIC CAAGACCCT ACCGGTGGCC AGTGGCGCAG TTGGAAGGC GAACAACTTT CGATACCTGC
+1	-Arg Thr Leu Glu Asp Ala Glu Cys Ile Arg Arg Gln Leu Ile Ala Asp Asn Arg Leu Val Val Ile Gly Gly Tyr Ile Gly Leu Glu Val Ala Ala Thr
401	GCACACTCGA GGACGCCGAG TGCATTCCGC GGCAGTGTAT TCGGGATAAC CGTCTGGTGG TGATTGGTGG CCGCTACATT GGCCTTGAAG TGGCTGCCAC
+1	-Thr Ala Ile Lys Ala Asn Met His Val Thr Leu Leu Asp Thr Ala Ala Arg Val Leu Glu Arg Val Thr Ala Pro Pro Val Ser Ala Phe Tyr Glu His Leu
501	CGCCATCAAG GCGAACATGC ACGTCACCCT GCTTGATACG GCAGCCCGGG TTCTGGAGCG GGTACCAGCC CCGCCGGTAT CGGCCTTTTA CGAGCACCTA
+1	His Arg Glu Ala Gly Val Asp Ile Arg Thr Gly Thr Gln Val Cys Gly Phe Glu Met Ser Thr Asp Gln Gln Lys Val Thr Ala Val Leu Cys Glu Asp Gly
601	CACCGGAAAG CCGGCGTTGA CATAACGAACC GGCACGCAGG TGTGCGGGTT CGAGATGTGC ACCGACCAA AGAAGGTAC GCGCGTCCCTC TGCAGGAGCG
+1	-Gly Thr Arg Leu Pro Ala Asp Leu Val Ile Ala Gly Ile Gly Leu Ile Pro Asn Cys Glu Leu Ala Ser Ala Ala Gly Leu Gln Val Asp Asn Gly Ile Val
701	GCACAAGGCT GCCAGCGGAT CTGGTAATCG CCGGGATTGG CCTGATACCA AACTGCGAGT TGGCCAGTGC GGCCGGCCTG CAGGTTGATA ACGGCATCGT
+1	-Val Ile Asn Glu His Met Gln Thr Ser Asp Pro Leu Ile Met Ala Val Gly Asp Cys Ala Arg Phe His Ser Gln Leu Tyr Asp Arg Trp Val Arg Ile Glu
801	GATCAACGAA CACATGCAGA CCTCTGATCC CTTGATCATG GCCGTCCGCG CCATCCCTCTG TGGCAAGGTG CCACGGATG AGCGGGGCC CTGGTTCCTGG TCCGATCAGT
+1	Ser Val Pro Asn Ala Leu Glu Gln Ala Arg Lys Ile Ala Ala Ile Leu Cys Gly Lys Val Pro Arg Asp Glu Ala Ala Pro Trp Phe Trp Ser Asp Gln Tyr
901	TCGGTCCCA ATGCCITTGA GCAGGCACGA AAGATCGCCG CCATCCCTCTG TGGCAAGGTG CCACGGATG AGCGGGGCC CTGGTTCCTGG TCCGATCAGT
+1	-Tyr Glu Ile Gly Leu Lys Met Val Gly Leu Ser Glu Gly Tyr Asp Arg Ile Ile Val Arg Gly Ser Leu Ala Gln Pro Asp Phe Ser Val Phe Tyr Leu Gln
1001	ATGAGATCGG ATTGAAGATG GTCGGACTGT CCGAAGGGTA CGACCGGATC ATTGTCCGGC GCTCTTTGGC GCAACCCGAC TTCAGCGGTTT TCTACCTGCA
+1	-Gln Gly Asp Arg Val Leu Ala Val Asp Thr Val Asn Arg Pro Val Glu Phe Asn Gln Ser Lys Gln Ile Ile Thr Asp Arg Leu Pro Val Glu Pro Asn Leu
1101	GGGAGACCGG GTATTGGCGG TCGATACAGT GAACCGTCCA GTGGAGTTCA ACCAGTCAAA ACAATAATC ACGGATCGTT TGCCGGTTGA ACCAAACCTA
+1	Leu Gly Asp Glu Ser Val Pro Leu Lys Glu Ile Ile Ala Ala Lys Ala Glu Leu Ser Ser Ala ***
1201	CTCGGTGACG AAAGCGTGCC GTTAAAGGAA ATCATCGCCG CCGCCAAAGC TGAACGTAGT AGTGCCTGA

**Abbildung 34: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der Putida-redoxin-Reduktase aus *P. putida*.**

## 8.2 Klonierung des *camB*-Genes aus *Pseudomonas putida*

Das *camB*-Gen wurde ebenfalls aus der Plasmid-DNA von *P. putida* amplifiziert (vgl. Kapitel II-10.2). Die Primer wurden aus der in der Datenbank hinterlegten Sequenz abgeleitet und in einer PCR eingesetzt, in der die Plasmid-DNA aus *P. putida* als Template verwendet wurde. Das Amplifikat wurde im 1 %-igen Agarosegel überprüft (Abbildung 36), in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert und in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.9.1). Die Klonierung wurde mittels *Colony*-PCR überprüft (vgl. Kapitel II-6.11.3). Das Plasmid pcamB wurde gereinigt (vgl. Kapitel II-6.3) und sequenziert (GATC Biotech AG). Die Sequenzierung bestätigte, dass die Amplifikation des *camB*-Gens fehlerfrei verlaufen ist. Die 324 bp große Nukleotidsequenz des *camB*-Gens, sowie die davon abgeleitete Proteinsequenz des Enzyms sind in Abbildung 36 dargestellt.

Das pcamB-Plasmid wurde erneut in einer PCR als Template eingesetzt, um das Insert mit Restriktionsschnittstellen und einem C-terminalen (His)<sub>6</sub>tag zu versehen. Dabei wurden die Primer Pdx BamHI forw und camB EcoRI rev His verwendet. Zusätzlich wurde mittels dieser PCR eine C-terminale Linkersequenz (PLEL) in das *camB*-Gen eingefügt, die für die spätere Fusionsproteinherstellung notwendig war. Das erhaltene Amplifikat wurde in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II-6.5), mittels MiniElute<sup>™</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel reisoliert und in den pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor kloniert (vgl. Kapitel II-6.9.1). Nach der Transformation in *E. coli* TOP10-Zellen wurde das Plasmid gereinigt (vgl. Kapitel II-6.3) und sequenziert (GATC Biotech AG).



**Abbildung 35: *camB*-Gen-Amplifikation aus der Plasmid-DNA von *P. putida*.**

Im 1 %-igen Agarosegel wurde in der Spur 1 und 2 ca. 1 µg PCR-Produkt nach der Amplifikation mit Primer: *camB* forw und *camB* rev aufgetragen. In der linken M-Spur wurde 2,5 µg GeneRuler™ 1 kb Ladder, in der rechten M-Spur wurden 2,5 µg GeneRuler™ 100 bp Ladder dargestellt.

+1	Met	Ser	Lys	Val	Val	Tyr	Val	Ser	His	Asp	Gly	Thr	Arg	Arg	Glu	Leu	Asp	Val	Ala	Asp	Gly	Val	Ser	Leu	Met	Gln	Ala	Ala	Val	Ser	Asn	Gly	Ile	Tyr														
1	ATG	TCT	AAAG	TAG	TG	TAT	GT	GTC	AC	AT	GAT	GGA	AC	GCG	TGC	GCG	AA	CT	GGA	TGT	GG	C	GG	AT	GCG	GC	TG	AT	GC	AG	GC	TG	CAG	TCT	CC	AAT	GG	TAT	CT									
+1	Tyr	Asp	Ile	Val	Gly	Asp	Cys	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Cys	Ala	Thr	Cys	His	Val	Tyr	Val	Asn	Glu	Ala	Phe	Thr	Asp	Lys	Val	Pro	Ala	Ala	Asn	Glu	Arg														
101	AC	GAT	ATT	GT	CG	GT	GAT	TGT	GCG	GC	AG	CG	CC	AG	CT	GT	GC	CAC	CT	GCC	AT	GT	CT	AT	GT	GA	AC	GA	AG	CG	TT	CAC	GC	ACA	AG	GT	GCC	CG	CC	AAC	GAG	CG						
+1	Arg	Glu	Ile	Gly	Met	Leu	Glu	Cys	Val	Thr	Ala	Glu	Leu	Lys	Pro	Asn	Ser	Arg	Leu	Cys	Cys	Gln	Ile	Ile	Met	Thr	Pro	Glu	Leu	Asp	Gly	Ile	Val	Val														
201	GG	AA	TC	GG	GC	AT	GCT	GG	AGT	GCG	T	CAC	GGC	CGA	ACT	GAA	G	CC	GA	AC	GAC	GA	GG	CT	CT	GCT	G	CC	AG	AT	CAT	C	AT	G	AC	G	CC	CG	AG	CT	GG	AT	GG	CAT	CG	TGG	T	GC
+1	Asp	Val	Pro	Asp	Arg	Gln	Trp	***																																								
301	GAT	GT	TCC	CG	AT	AG	GCA	ATG	G	TAA																																						

**Abbildung 36: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz des Putidaredoxins aus *P. putida*.**

Um das *camB*-Gen als Putidaredoxin heterolog exprimieren zu können, wurde das Insert aus dem *pcamB* Plasmid mit folgenden Restriktionsenzymen ausgeschnitten (vgl. Kapitel II-6.4): *Bam*HI und *Eco*RI. Der *pET24a(+)* Vektor wurde mit den gleichen Enzymen linearisiert. Beide Verdauansätze wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II-6.5) und die Zielfragmente mittels MiniElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel reisoliert. Beide Reisolat wurden anschließend in einen Ligationsansatz (vgl. Kapitel II-6.9.2) eingesetzt. Nach der Ligation wurde die Plasmid-DNA *pcamB+* durch Dialyse entsalzt und in elektrokompetente *E. coli*

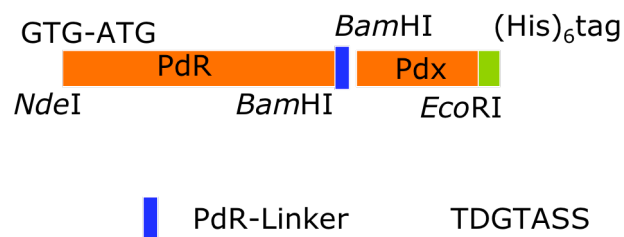
BL21(DE3)Gold-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.11.1). Der Erfolg der Ligation wurde mittels *Colony*-PCR überprüft (vgl. Kapitel II-6.11.3).

## 9 Das Fusionsprotein PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>

Nachdem durch die Klonierung des *camA*- und des *camB*-Gens, sowie deren genetische Modifizierung, die Voraussetzungen dazu geschaffen waren, sollten im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Gene fusioniert und zur Expression in eines Fusionsproteins *E. coli* eingesetzt werden.

### 9.1 Herstellung des Fusionsproteins PdR/Pdx und PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>

Um die Fusionsproteine PdR/Pdx und PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> zu erhalten, wurden beide Plasmide *pcamA*<sup>+</sup> und *pcamB*<sup>+</sup> benötigt. Als Zielplasmid wurde *pcamA*<sup>+</sup> verwendet. Das *camB*-Gen wurde mit *Bam*HI und *Eco*RI aus dem pET24a(+) ausgeschnitten, der Zielvektor (*pcamA*<sup>+</sup>) wurde entsprechend mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert. Die Verdauansätze wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II-6.5) und die DNA-Fragmente mittels MiniElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel reisoliert. Anschließend wurden das linearisierte Zielplasmid und das *camB*-Gen in einen Ligationsansatz eingesetzt (vgl. Kapitel II-6.9.2) (Abbildung 37). Nach der Ligation wurde das erhaltene *pcamA/camB*<sup>+</sup> Plasmid durch Dialyse entsalzt und in *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.11.1). Der Erfolg der Ligation wurde mittels *Colony*-PCR überprüft (vgl. Kapitel II-6.11.3). Das Plasmid *camA/camB*<sup>+</sup> wurde anschließend in eine zusätzliche PCR als Template eingesetzt, in der dem Fusionsprotein ein C-terminaler (His)<sub>6</sub>tag zugefügt wurde. Das Amplifikat wurde in den pCR®II-TOPO®-Vektor zwischenkloniert und in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.9.1). Die Klonierung wurde mittels *Colony*-PCR überprüft (vgl. Kapitel II-6.11.3). Das Plasmid *pcamA/camB*-His wurde gereinigt (vgl. Kapitel II-6.3) und sequenziert (GATC Biotech AG). Die Sequenzierung bestätigte das erfolgreiche Einfügen des (His)<sub>6</sub>tags. Das Insert *camA/camB*-His wurde aus dem pCR®II-TOPO®-Vektor mit *Nde*I und *Eco*RI ausgeschnitten. Der Zielvektor pET24a(+) wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert.



**Abbildung 37: Herstellung des Konstruktes PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>**

Anschließend wurden beide Verdauansätze in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II-6.9.2), ligiert (vgl. Kapitel II-6.5) und die DNA-Fragmente mittels MiniElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel reisoliert. Die Reisolatate wurden in einen Ligationsansatz eingesetzt (vgl. Kapitel II-6.9.2). Nach der Ligation wurde das erhaltene pcamA/camB-His+ Plasmid durch Dialyse entsalzt und in *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.11.1). Die Ligation wurde mittels Colony-PCR überprüft (vgl. Kapitel II-6.11.3).

## 9.2 Expression des Fusionsproteins PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> in *E. coli* BL21(DE3) Gold-Zellen

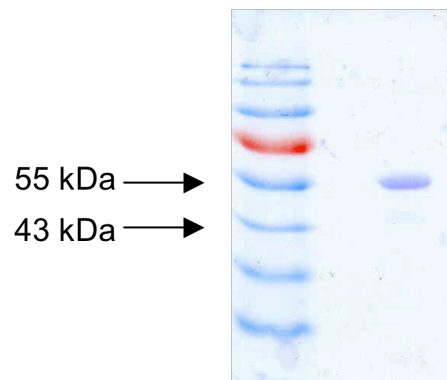
Die pcamA/camB-His+-tragenden *E. coli*-Zellen wurden in kanamycinhaltigem Pepton/Trypton-Medium kultiviert. Es wurde eine Vorkultur (25 ml) mit 10 µl Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C angezogen. Diese wurde komplett in die Hauptkultur (250 ml) überimpft und bis zur Induktion bei 37 °C kultiviert. Die Induktion der Produktion des Fusionsproteins erfolgte durch Zugabe von 100 µM IPTG, nachdem eine OD<sub>600</sub> von ca. 1,5 erreicht wurde. Über die nächsten 24 h wurde die Kultivierung bei 20 °C weitergeführt, um die *inclusion body*-Bildung zu vermeiden.

### 9.3 Anreicherung des Proteins PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>

Die Anreicherung des Fusionsproteins PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> wurde mittels Affinitätschromatographie (IMAC) (vgl. Kapitel II-17.1) durchgeführt. Die PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> enthaltenden Fraktionen konnten aufgrund der Absorption bei 280 nm und 450 nm identifiziert werden. Nach der IMAC wurden die proteinhaltigen Fraktionen (3 x 2 ml) mittels Phenyl-Sepharose-Säule in 100 mM Tris-Puffer (pH 7,5) umgepuffert (vgl. Kapitel II-17.2). Die Durchführung beider Chromatographien erfolgte gemäß Kapitel III-3.2.

### 9.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinheit der Probe nach Anreicherung und Umpufferung wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft (vgl. Kapitel II-18.1). Es wurden ein 9 %-iges Trenn- und ein 4 %-iges Sammelgel verwendet. In Abbildung 38 ist das Ergebnis der Trennung dargestellt.



**Abbildung 38: SDS-PAGE nach Anreicherung des Fusionsproteins PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> aus *E. coli* BL21(DE3)Gold**

Links 10 µg Protein Ladder 11-170 kDa (Fermentas). Rechts 10 µg gereinigtes Protein nach der Affinitätschromatographie.

In der Fraktion nach der Affinitätschromatographie (1,5 mg/ml) ist nur eine einzelne Bande auf dem Gel zu erkennen, die dem Eichprotein von 55 kDa entspricht. Die

miteinander verknüpften Gene führten zur Expression eines Fusionsproteins von 57,1 kDa, was auf dem SDS-Gel (Abbildung 38) deutlich zu erkennen ist. Damit konnte der Erfolg der Fusionierung der beiden Gene bestätigt werden.

## **10 Coexpression der MO1812-(His)<sub>6</sub> mit dem Fusionsprotein PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>**

Die Coexpression der Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> mit dem Fusionsprotein PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> im *E. coli*-System wurde als Alternative angewandt, um die Aktivität des P450-Proteins aus *S. meliloti* 1021 mit 1,5-AM als Substrat bestätigen zu können.

### **10.1 Herstellung des *E. coli*-Stammes**

Als Alternative für die Synthese und Expression des Fusionsproteins PdR-Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub>, wurde eine Coexpression der Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> mit dem Fusionsprotein PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> durchgeführt. Für dieses Verfahren wurden elektrokompente MO1812-(His)<sub>6</sub>-tragende *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen hergestellt (vgl. Kapitel II-6.10). Diese wurden anschließend mit dem pcamA/camB+b Plasmid transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden auf LB<sub>Kan+Amp</sub> Platten ausplattiert, um einen Selektionsdruck zum Erhalt der beiden Plasmide zu gewährleisten. Die Transformation wurde nach der Plasmid-Präparation (vgl. Kapitel II-6.3) mit einem Kontrollverdau überprüft (vgl. Kapitel II-6.4).

### **10.2 Anzucht der MO1812-(His)<sub>6</sub>- und PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>-tragenden *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen**

Die MO1812-(His)<sub>6</sub>- und PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub>-tragenden *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen wurden in 25 ml mit Ampicillin und Kanamycin versetztem Pepton/Trypton-Medium als Vorkultur über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Hauptkultur wurde mit dem ganzen Volumen der Vorkultur angeimpft und bis zur Induktion bei 37 °C weiterkultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 1,5

durch Zugabe von 100  $\mu$ M IPTG, danach wurden die Zellen bei 20 °C über weitere 24 h angezogen.

### 10.3 Coexpression

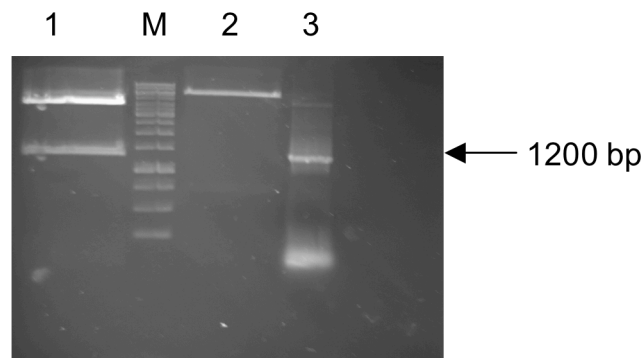
Die Coexpression der beiden Proteine war erfolgreich. Da die Reinigung der coexprimierten Enzyme nicht möglich war, wurde der nach dem Zellaufschluss (vgl. Kapitel II-16.2) erhaltene Rohextrakt für die Messungen eingesetzt. Als Kontrolle wurde Zellextrakt verwendet, der nur das PdR/Pdx-Protein enthielt. Dies sollte einen eventuellen unspezifischen Cosubstrat-Verbrauch ausschließen. Aufgrund der NADH-Abhängigkeit der PdR wurde dieses als Elektronen-Donor in den Assay eingesetzt. Die durchgeführten Messungen zeigten zwar eine deutliche NADH-Abnahme, jedoch war die gleiche Aktivität im Assay ohne Monooxygenase zu beobachten, was eindeutig auf eine unspezifische Reaktion des Rohextraktes mit dem Cosubstrat hingewiesen hat. Aufgrund dessen konnte keine Aussage getroffen werden, ob die Coexpression dieser Proteine zur 1,5-AM-Umsetzung führen kann.

## 11 Das Fusionsprotein PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub>

### 11.1 Herstellung des Konstruktes PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub>

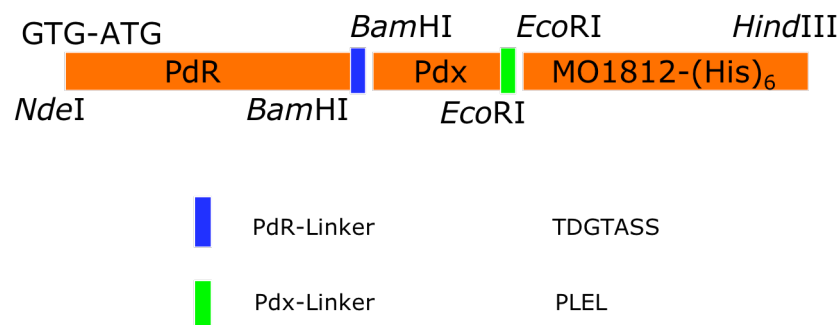
Für die Erstellung des Konstruktes PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> wurden zwei Plasmide benötigt: pMO1812smHis<sup>+</sup> und pcamA/camB<sup>+</sup>. Als Zielvektor wurde pcamA/camB<sup>+</sup> verwendet (vgl. Kapitel III-9.1). Dieser wurde gleichzeitig mit dem pMO1812smHis<sup>+</sup> Plasmid mit *Eco*RI und *Hind*III verdaut (vgl. Kapitel II-6.4). Auf diese Weise wurde das *Y01812*-Gen aus dem pMO1812smHis<sup>+</sup> Plasmid ausgeschnitten und das pcamA/camB<sup>+</sup> Plasmid wurde linearisiert. Beide Verdauansätze wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II-6.5) und die DNA-Fragmente wurden anschließend mittels MiniElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel reisoliert. Beide Reisolat wurden zusammen in einen Ligationsansatz (vgl. Kapitel II-6.9.2) eingesetzt (Abbildung 40).





**Abbildung 39: Kontrollverdau des Plasmids *camA/camB//MO1812smHis+* mittels *NdeI* und *BamHI* sowie *BamHI* und *EcoRI***

Im 1 %-igen Agarosegel wurde in der Spur 1 der Verdau der fusionierten *camA/camB*-Gene mit *NdeI-BamHI* aufgetragen. Spur 2 stellt den linearisierten Vektor dar. In der Spur 3 wurde das mit *EcoRI* und *BamHI* ausgeschnittene *MO1812*-Gen aufgetragen. In der M-Spur wurden 2,5 µg GeneRuler™ 1 kb Ladder dargestellt.



**Abbildung 40: Herstellung des Konstruktes PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub>**

Nach der Ligation wurde die Plasmid-DNA *pcamA/camB//MO1812smHis+* durch Dialyse entsalzt und in elektrokompente *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.11.1). Der Erfolg der Ligation wurde mittels *Colony-PCR* (vgl. Kapitel II-6.11.3) und Kontrollverdau (*NdeI-HindIII*) überprüft (vgl. Kapitel II-6.4), das Ergebnis ist in Abbildung 39 dargestellt.

## 11.2 Expression des Fusionsproteins PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> in *E. coli* BL21 (DE3)Gold

Die *pcamA/camB/MO1812smHis+*-tragenden *E. coli*-Zellen wurden in kanamycinhaltigem Pepton/Trypton-Medium kultiviert. Es wurde eine Vorkultur (25 ml) mit 10 µl Glycerinkultur beimpft und über Nacht bei 37 °C angezogen. Diese wurde komplett in die Hauptkultur (250 ml) überimpft und bis zur Induktion bei 37 °C kultiviert. Die Induktion der Enzymproduktion erfolgte durch Zugabe von 100 µM IPTG, nachdem eine OD<sub>600</sub> von ca. 2,0 erreicht worden war. Danach wurde die Kultivierung über weitere 24 h bei 37 °C durchgeführt.

## 11.3 Anreicherung des Proteins PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub>

Die Anreicherung des Fusionsproteins PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> erfolgte mittels Affinitätschromatographie (IMAC) (vgl. Kapitel II-17.1). Für die Isolierung des Fusionsproteins wurden 3 g nasse Zellen in 17 ml 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (pH 7,0) aufgenommen und mittels Ultraschall aufgeschlossen (vgl. Kapitel II- 16.2). Nach dem anschließenden Zentrifugationsschritt wurde der Rohextrakt auf die Chelating Crude 1 ml FF Säule aufgetragen. Das Fusionsprotein wurde in einer 2 ml Fraktion mit 0,5 M Imidazol eluiert und konnte aufgrund der Absorption bei 280 nm und 450 nm identifiziert werden. Danach wurde das Protein mittels Phenyl-Sepharose-Säule in 100 mM Tris-Puffer (pH 7,5) umgepuffert (Tabelle 28), (vgl. Kapitel II-17.2). Die erhaltene Proteinkonzentration wurde auf 1,25 mg/ml bestimmt.

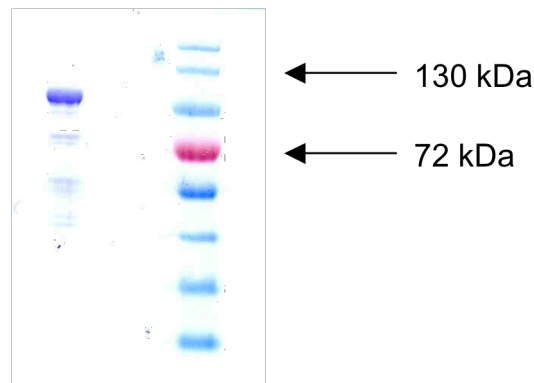
**Tabelle 28: Anreicherungstabelle des Fusionsproteins PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub>**

Anreicherungsschritt	Volumen [ml]	Gesamtunits [U]	Gesamtprotein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Faktor	Ausbeute [%]
Rohextrakt	17	-	116	-	-	-
HisTrap	2	0,05	2,5	0,02	-	-

Die Tabelle 28 zeigt, dass eine Aktivität erst nach der Reinigung nachgewiesen werden konnte. Die Messungen wurden gemäß Kapitel II-3.10 durchgeführt.

#### 11.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinheit der Probe nach der Anreicherung sowie der Erfolg der Fusionierung wurde durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft (vgl. Kapitel II-18.1). Dafür wurden ein 9 %-iges Trenn- und ein 4 %-iges Sammelgel verwendet. In Abbildung 41 ist das Ergebnis dieser Trennung dargestellt.



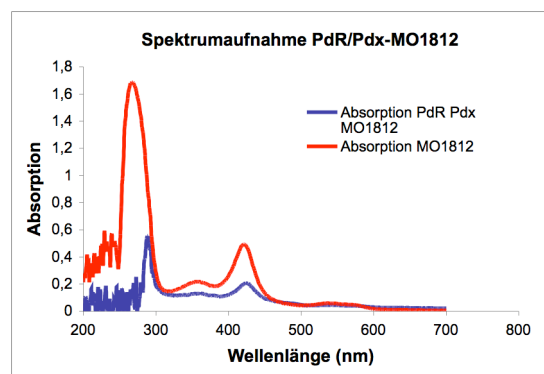
**Abbildung 41: SDS-PAGE nach Anreicherung des rekombinanten Fusionsproteins PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub>**

Rechts 10 µg Protein Ladder 11-170 kDa (Fermentas). Links 10 µg aufgereinigtes Protein nach der Affinitätschromatographie.

In der Fraktion nach der Affinitätschromatographie ist nur eine Bande auf dem Gel zu erkennen, die höher als das Eichprotein von 95 kDa liegt. Die miteinander verknüpften Gene führten zur Expression eines Fusionsproteins von 100 kDa, was auf dem SDS-Gel (Abbildung 41) zu erkennen ist. Damit konnte die erfolgreiche Expression der drei verschiedenen Proteine als Fusionsprotein im *E. coli*-System gezeigt werden.

### 11.5 UV/VIS-Spektrum des Fusionsproteins PdR/Pdx-MO2579-(His)<sub>6</sub>

Analog zur Monooxygenase wurde auch für das Fusionsprotein ein Spektrum aufgenommen. Es sollte damit gezeigt werden, dass das 100 kDa große Fusionsprotein PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> aktiv ist und die typischen Absorptionseigenschaften des Proteins MO1812-(His)<sub>6</sub> hat.



**Abbildung 42: UV/VIS-Spektrum der Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub> und des Fusionsproteins PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> im Wellenlängenbereich von 150 nm bis 600 nm.**

Beim Spektrum des Fusionsproteins war zwar der Peak im kurzwelligen UV in den längerwelligen Bereich verschoben, jedoch entsprach der Peak bei 420 nm dem der Kontrolle und wies auf das Vorliegen eines aktiven Häms im Protein hin (Abbildung 42).

## 12 Aktivitätsbestimmung der Monooxygenase MO1812

Die Beteiligung der Monooxygenase MO1812 an dem Abbau der 1,5-AF in *S. meliloti* sollte unter anderem durch die Aktivitätsmessungen gezeigt werden. Da in dem Modell des AF-Abbauweges, das für die Rhizobien angenommen wurde (Abbildung 5), eine Monooxygenase die Hydroxylierung des 1,5-AM katalysieren soll, wurde für die kinetischen Untersuchungen 1,5-AM als Substrat verwendet.

## 12.1 MO1812-(His)<sub>6</sub>

Aufgrund einer sehr geringen Aktivität konnten im Rahmen dieser Doktorarbeit keine ausführlichen kinetischen Untersuchungen der Monooxygenase durchgeführt werden, jedoch konnte eine deutliche Extinktionsänderung während der Inkubation des Enzyms mit 1,5-AM beobachtet werden. Da diese Monooxygenase für ihre Aktivität Elektronentransferproteine benötigt, wurden die Messungen mit Zugabe des Fusionsproteins PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> durchgeführt (vgl. Kapitel II-3.10). Als Cosubstrat wurde NADH verwendet, da die PdR strikte NADH-Abhängigkeit aufwies.

### Tabelle 29: Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität mit 1,5-AM als Substrat

Verschiedene Mengen der MO1812-(His)<sub>6</sub> wurden mit 100 µl einer 0,05 M 1,5-AM-Lösung und 0,9 mg des Elektronentransferproteins PdR/Pdx-(His)<sub>6</sub> bei 30 °C inkubiert. Dabei wurde die Abnahme des Cosubstrates NADH (0,72 mM) bei 340 nm verfolgt.

Proteinmenge [µg]	Spezifische Aktivität [U/mg]
40	0,01
80	0,02
160	0,04
240	0,06

Aus der Reaktionsgeschwindigkeit wurde die Volumenaktivität (U/ml) bestimmt, daraus wurde anschließend die spezifische Aktivität (U/mg) des Enzyms errechnet. Die hier präsentierten Werte wurden durch die dreifache Bestimmung der Monooxygenase-Aktivität (vgl. Kapitel II-3.10) ermittelt und stellen den daraus errechneten Mittelwert dar. Trotz sehr niedriger Werte konnte gezeigt werden, dass die Monooxygenase aus *S. meliloti* 1,5-AM als Substrat nutzen kann (Tabelle 29).

## 12.2 PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub>

Das Protein PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> wurde ebenfalls hinsichtlich der Aktivität mit 1,5-AM als Substrat untersucht. Dazu wurde das angereicherte Protein in verschiedenen Konzentrationen mit dem Cosubstrat der Reduktase, NADH, und 1,5-

AM inkubiert (Tabelle 30). Aus der Reaktionsgeschwindigkeit konnte die Volumenaktivität (U/ml) bestimmt werden, daraus wurde anschließend die spezifische Aktivität (U/mg) des Fusionsproteins errechnet. Die erhaltenen Werte waren hier ebenfalls sehr niedrig, es konnten jedoch zwischen verschiedenen Enzymkonzentrationen deutliche Unterschiede in der spezifischen Aktivität festgestellt werden. Die Ermittlung der Aktivität wurde gemäß Kapitel II-3.10 durchgeführt.

**Tabelle 30: Bestimmung der Aktivität des Fusionsproteins PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> mit 1,5-AM als Substrat**

Verschiedene Mengen der PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> wurden mit 100 µl einer 0,05 M 1,5-AM-Lösung bei 30 °C inkubiert. Dabei wurde die Abnahme des Cosubstrates NADH (0,72 mM) bei 340 nm verfolgt.

Proteinmenge [µg]	Spezifische Aktivität [U/mg]
120	0,006
240	0,013
360	0,02
480	0,025
600	0,05

Die hier präsentierten Werte wurden durch die dreifache Bestimmung der Fusionsprotein-Aktivität (vgl. Kapitel II-3.10) ermittelt und stellen den daraus errechneten Mittelwert dar. Diese Untersuchung hat gezeigt, dass die Monooxygenase aus *S. meliloti* auch in Form einer selbstständigen Monooxygenase, die durch Fusion mit dem Protein PdR/Pdx generiert wurde, in der Lage ist, 1,5-AM als Substrat zu verwenden.

### 13 Deletion des Monooxygenase-Gens *Y01812* in *S. meliloti* 1021

Die Deletion des Monooxygenase-Gens *Y01812* über Konjugation und homologe Rekombination sollte die Beteiligung dieses Enzyms an dem AF-Pathway in *S. meliloti* verifizieren. Es wurde erwartet, dass nach der Deletion des Gens die

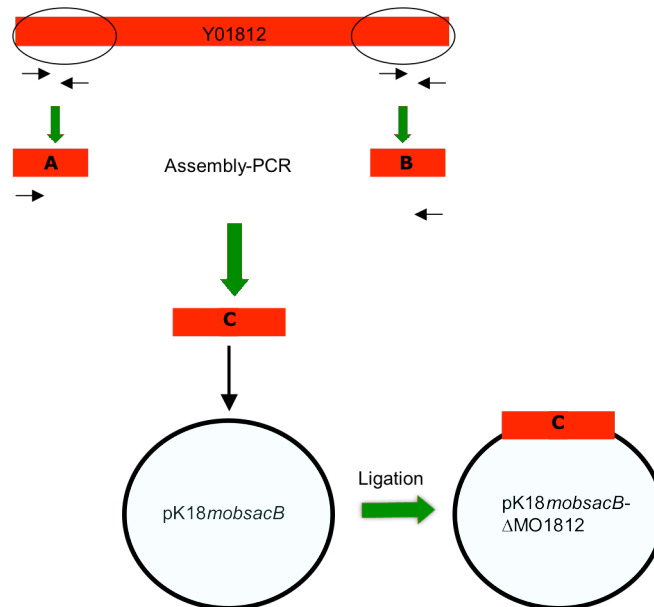
Expression der Monooxygenase nicht mehr stattfindet und es somit zu keinem AF-Abbau in den Zellen kommt.

### 13.1 Herstellung des Deletionskonstrukts

Das Konstrukt wurde unter Anwendung einer SOE-PCR erstellt (Abbildung 43). Dabei wurden die Primerpaare 1 MO1812 del forw mit 1 MO1812 del rev und 2 MO1812 del forw mit 2 MO1812 del rev eingesetzt. Mit Hilfe dieser Primerpaare und mit pMO1812smHis als Template wurden 2 Gen-Fragmente amplifiziert - die ersten und die letzten 200 bp des *Y01812*-Genes. Die PCR-Produkte wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II-6.5) und mittels MiniElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel reisoliert. Die Reisolatate wurden zusammen in der zweiten, sogenannten Assembly-PCR, als Template eingesetzt. Dabei wurden die Primer sm mono forw und sm mono/Hind rev verwendet. Somit wurden die in der ersten PCR erhaltenen Fragmente miteinander verknüpft und es wurde ein 400 bp großes Amplifikat erstellt. Das Amplifikat wurde in den pCR®II-TOPO®-Vektor kloniert (vgl. Kapitel II-6.9.1). Nach der Transformation in *E. coli* TOP10-Zellen wurde das Plasmid pΔY01812 gereinigt (vgl. Kapitel II-6.3) und sequenziert (GATC Biotech AG). Für die Konjugation wurde ein spezieller Vektor pK18*mobsacB* benötigt. Das Plasmid pK18*mobsacB* ist ein Derivat des Plasmids pUC18 (Schäfer et al. 1994) und wird auf Grund des *sacB*-Genes als „suicide vector“ bezeichnet. Das *sacB*-Gen kodiert für die Levansucrase [EC 2.4.1.10] aus *Bacillus subtilis* und ist ein effizienter Genselektionsmarker, der sowohl bei Gram-positiven als auch bei Gram-negativen Bakterien Anwendung findet (Jäger et al. 1995; Gay et al. 1983). Die Levansucrase ist an der Saccharose-Hydrolyse und der Levan-Synthese beteiligt. Die Expression des *sacB*-Gens auf einem Saccharose-enthaltenden Medium ist für die *S. meliloti*-Zellen letal. Auf diese Weise konnte überprüft werden, ob die enthaltenen Klone das Plasmid pK18*mobsacB* ins Genom integriert haben.

Das Umklonieren des 400 bp großen Inserts wurde über *Bam*HI- und *Hind*III-Schnittstellen durchgeführt (vgl. Kapitel II-6.4). Nach der Restriktion des pK18*mobsacB* und des pΔY01812 Plasmides wurden beide Verdauansätze im 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel II-6.5). Anschließend wurden die beiden

Vektor- und Insert-spezifischen Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem MiniElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) reisoliert. Die Reisolate wurden in den Ligationsansatz eingesetzt (vgl. Kapitel II-6.9.2).



#### Abbildung 43: Schematische Darstellung der Herstellung des Deletionskonstrukts

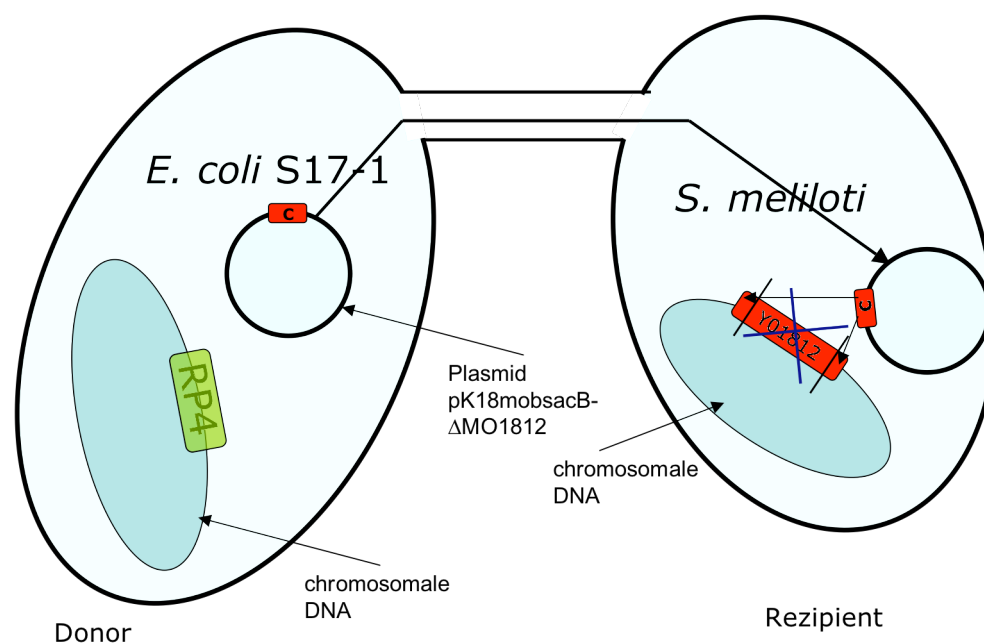
Es wurden je 200 bp vom 5'- (A) und vom 3'-Ende (B) des *Y01812*-Gens aus *S. meliloti* amplifiziert und anschließend mittels einer Assembly-PCR miteinander fusioniert. Das somit erhaltene Konstrukt (C) wurde mit dem *pK18mobsacB*-Vektor ligiert und in die *E. coli* S17-1-Zellen transformiert.

Nach der Ligation wurde die DNA des erhaltenen *pK18mobsacB-ΔMO1812* Plasmides durch Dialyse entsalzt und in *E. coli* S17-1-Zellen transformiert (vgl. Kapitel II-6.11.1). Der Stamm *E. coli* S17-1 wurde von Prof. Pühler (Bielefeld) zur Verfügung gestellt. Neben Kanamycin-Resistenz verfügt er über eine chromosomale Integration des RP4-Plasmides, was die Übertragung der zu mobilisierenden Plasmide während der Konjugation in die Akzeptor-Zellen ermöglicht. Der Erfolg der Ligation wurde mittels *Colony-PCR* (vgl. Kapitel II-6.11.3) unter Anwendung von genspezifischen Primern überprüft.



## 13.2 Konjugation und homologe Rekombination

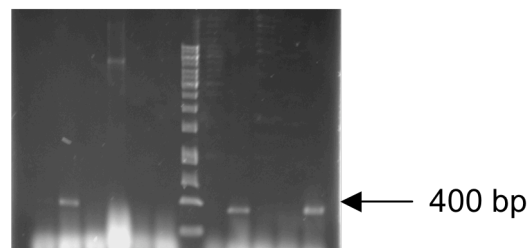
Die Konjugation fand zwischen den Donor-Zellen (*E. coli* S17-1) und Rezipienten-Zellen (*S. meliloti*) statt (vgl. Kapitel II-27.3). Die Integration des RP4-Plasmides in die chromosomale DNA des *E. coli* S17-1-Stamms ermöglicht den Transfer des pK18*mobsacB*-Plasmides in die *S. meliloti*-Zellen (Abbildung 44). Nach der Aufnahme durch die Rezipientenzellen wurde das Plasmid über seine homologen Stellen in die genomische DNA des Y01812 ORF von *S. meliloti* integriert und führte somit zu Deletion des Y01812-Gens. Nach der Konjugation wurden die Zellen auf TY-Platten ausplattiert und über Nacht bei 28 °C kultiviert.



### Abbildung 44: Prinzip der Gendeletion durch Konjugation

Aufgrund der Konjugation zwischen den Donor-Zellen (*E. coli* S17-1) und Rezipienten-Zellen (*S. meliloti*) wird das Plasmid pK18*mobsacB*-ΔMO1812 in die *S. meliloti* Zellen übertragen. Die Integration des RP4-Plasmides in die chromosomale DNA des *E. coli* S17-1-Stamms ermöglicht den Transfer des pK18*mobsacB*-Plasmides in die *S. meliloti*-Zellen. Das Plasmid pK18*mobsacB*-ΔMO1812 wird anschließend über seine homologen Stellen in die genomische DNA des Y01812 ORF von *S. meliloti* integriert und führt somit zu Deletion des Y01812-Gens.

Der Erfolg der Deletion wurde sowohl genetisch als auch physiologisch überprüft. Der genetische Nachweis wurde mittels PCR durchgeführt. In diesem Verfahren wurde die genomische DNA aus den erhaltenen Klonen isoliert und als Template in die PCR mit den *Y01812*-Gen-spezifischen Primern eingesetzt. Die Amplifikate von deletionspositiven Mutanten sollten eine Größe von 400 bp aufweisen (Abbildung 45), weil nach der homologen Rekombination des *Y01812*-Gens mit dem Plasmid [pK18*mobsacB*- $\Delta$ MO1812] und der darauffolgenden Deletion des Gens *Y01812* nur ein Fragment dieser Größe in der genomischen DNA von *S. meliloti* erhalten blieb.

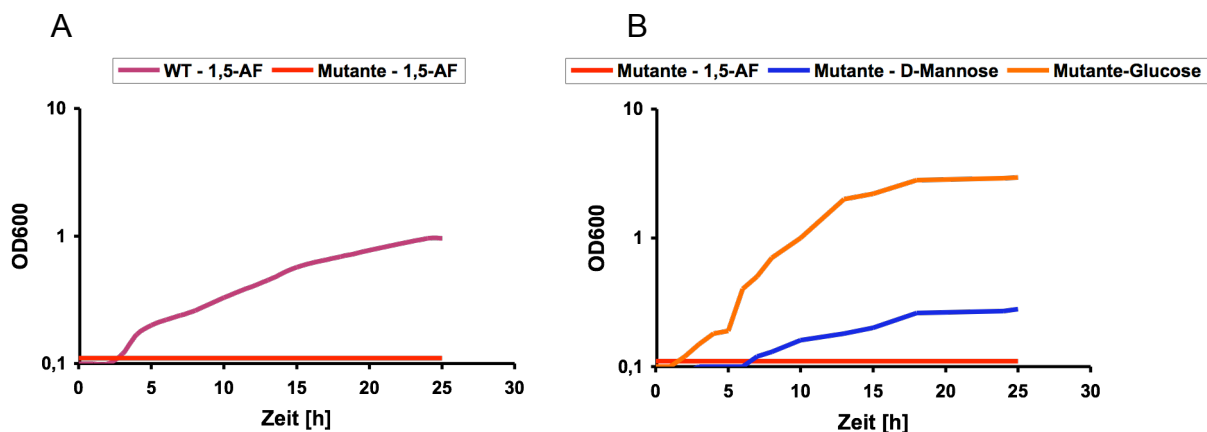


**Abbildung 45: Kontrolle der Deletion des *Y01812*-Gens aus *S. meliloti* 1021.**

Im 1 %-igen Agarosegel wurden jeweils 5  $\mu$ l der Kontroll-PCR aufgetragen. In der M-Spur wurden 2,5  $\mu$ g GeneRuler<sup>TM</sup> 1 kb Ladder dargestellt.

Die modifizierten *S. meliloti*-Zellen wurden selektiv auf Kanamycin-enthaltendem Medium kultiviert, um eine Anzucht von Wildtyp-Zellen auszuschließen und gleichzeitig die chromosomale Integration des pK18*mobsacB*- $\Delta$ MO1812-Plasmides zu erhalten.

Um die Beteiligung der Monooxygenase an dem AF-Abbau in *S. meliloti* zu verifizieren, wurden alle positiven Deletionsmutanten SmcY01812<sup>-</sup> auf 1,5-AF als einziger Kohlenstoffquelle kultiviert.



**Abbildung 46: Wachstum der Deletionsmutante *SmcY01812<sup>-</sup>***

(A) auf 1,5-AF in direktem Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm *S. meliloti* 1021. (B) auf D-Mannose als einziger Kohlenstoffquelle im Vergleich zu dem Wachstum auf 1,5-AF und Glucose; Kontrolle – Wachstum auf 1,5-AF.

Für diese Anzucht wurde MV-Medium verwendet und die Zelldichte über 25 Stunden verfolgt. Als Kontrolle wurde der Wildtyp-Stamm von *S. meliloti* 1021 kultiviert. Der Verlauf der Wachstumskurve ist in Abbildung 46 - A dargestellt. Es wurde kein Wachstum der Deletionsmutante *SmcY01812<sup>-</sup>* auf 1,5-AF festgestellt, im Gegensatz zum Wildtyp, der 1,5-AF verstoffwechseln kann. Die Wachstumsrate des Wildtyp-Stamms wurde auf 0,14 errechnet. Die Verdopplungszeit betrug 4,9 h.

Um zu verifizieren, dass die in die *S. meliloti*-Zellen eingebrachte Mutation keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der modifizierten Organismen hervorgerufen hat, wurde eine Anzucht auf Glucose und D-Mannose jeweils als einziger Kohlenstoffquelle durchgeführt. Beide Verbindungen sind als sehr gut verwertbare Substrate für die Rhizobien bekannt. Die Zellen wurden auf MV-Medium mit Zugabe von 10 mM D-Mannose bzw. 10 mM Glucose kultiviert, dabei wurde die Änderung der optischen Dichte verfolgt. Die Mutante *SmcY01812<sup>-</sup>* hat ein deutliches Wachstum in beiden Versuchen gezeigt (Abbildung 46 – B), was bewiesen hat, dass es sich trotz der Deletion des *Y01812*-Genes um lebensfähige Zellen handelt, wobei Glucose sich als besseres Substrat herausgestellt hat. Die Wachstumsrate auf D-Mannose wurde auf 0,04 errechnet, die auf Glucose auf 0,15. Die Verdopplungszeit betrug entsprechend 17,3 h auf D-Mannose und 4,6 h auf Glucose.

Die Deletion des Monooxygenase-Gens hat eindeutig gezeigt, dass dieses Protein unmittelbar an dem Abbauweg der 1,5-AF in *S. meliloti* beteiligt ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen, in denen keine Monooxygenase-Expression stattfinden kann, nicht in der Lage sind, den seltenen Zucker 1,5-AF zu verstoffwechseln, was die Wachstumsmöglichkeit auf dieser Verbindung ausschließt.

## IV Diskussion

### 1 Metabolismus der 1,5-AF

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, konnte 1,5-AF in zahlreichen Organismen nachgewiesen werden, wie z.B. in Bakterien, Pilzen, Algen, Pflanzen- und Säugergeweben. Deshalb scheint 1,5-AF ubiquitär vorzukommen, allerdings in sehr geringen Mengen. Bei der chemischen Grundstruktur der 1,5-AF handelt es sich um einen Desoxy-Zucker (1-Desoxy-D-Glucoson), der als zyklischer Ether vorliegt. Somit setzt die Metabolisierung der 1,5-AF eine Spaltung des zyklischen Ethers voraus. Die Literatur berichtet über verschiedenen Mechanismen der biochemischen Etherspaltung (White et al., 1996). Darunter ist die Einfügung eines Sauerstoffatoms an einem mit dem Ethersauerstoff verbundenen Kohlenstoffatoms der plausibelste Mechanismus, da es die Etherbindung destabilisiert. Somit ist die nach der Reduktion von 1,5-AF zu 1,5-AM erfolgende Oxygenierung zum Halbacetal der D-Mannose die metabolisch einfachste Lösung, zumal D-Mannose ein gutes Substrat für die Rhizobien ist (Arias et al., 1982). Im Falle der unmittelbaren Spaltung von 1,5-AF würde ein Dicarbonsäurezucker entstehen, dessen Metabolisierung nicht weniger problematisch ist, da auch dieser zunächst zum entsprechenden Zucker reduziert werden müsste.

Die ersten Untersuchungen zum Metabolismus von 1,5-AF in Rhizobien wurden mit *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5 durchgeführt und die AF-Reduktase wurde als Schlüsselenzym des Abbaus von 1,5-AF erkannt (Kühn et al., 2006). Die Metabolisierung des Polyols wurde mit *S. morelense*-Zellen verfolgt. Dabei konnte die Bildung der D-Mannose beobachtet werden, die bei Rhizobien über den Entner-Doudoroff-Weg (Entner und Doudoroff, 1952) in den zentralen Kohlenstoffwechsel überführt wird (Arias et al., 1982; Stowers, 1985). Der für *S. morelense* S-30.7.5 postulierte 1,5-AF Abbauweg ist in Abbildung 5 dargestellt.

Die Fähigkeit zum Wachstum auf 1,5-AF als einziger Kohlenstoffquelle konnte bereits in mehreren, hauptsächlich schnellwachsenden Rhizobien-Stämmen festgestellt werden (Kühn et al., 2006). Neben *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5 und *Sinorhizobium meliloti* 1021 wurde die Reduktion der 1,5-AF in *Rhizobium leguminosarum*, *Mesorhizobium loti* und *Mesorhizobium amorphae* nachgewiesen

(Kühn et al., 2006). Neben der Familie *Rhizobiaceae* konnte eine AF-Reduktase homologe Sequenz im Genom den physiologisch nah verwandten intrazellulären pathogenen Organismen *Brucella suis* und *B. melitensis* identifiziert werden. Die auffällige Ähnlichkeit des Metabolismus in pathogenen *Brucellaceae* und in symbiontischen *Rhizobiaceae* könnte auf eine wichtige metabolische Rolle der AF-Reduktase hinweisen (Kühn et al., 2006).

*Sinorhizobium meliloti* 1021 gehört zur Familie der *Rhizobiaceae* im Phylum Proteobacteria. Bei den *Rhizobiaceae* handelt es sich in der Regel um Gram-negative, durch Geißeln bewegliche, stäbchenförmige Bakterien, die frei im Boden vorkommen oder in symbiontischen Gemeinschaften mit Pflanzen wie *Medicago*, *Melilotus* und *Trigonella* sp. leben. Unter diesen Organismen befinden sich Rhizobien, die nicht nur als ein Modell für die Untersuchungen an Pflanzen – Bakterien Interaktionen gelten, sondern auch von großer Bedeutung für die globale Nährstoff – Zirkulation sind. Sie assimilieren 50 % der Gesamtmenge des durch lebende Organismen fixierten Stickstoffs (80 Millionen Tonnen) (Capela et al., 2001). Die Untersuchungen des Genoms von *S. meliloti* 1021 haben drei Replikons ergeben, die aus einem 3,7 Mb großen Chromosom sowie zwei Megaplasmiden, die als pSymA und pSymB bezeichnet werden, bestehen (Galibert et al., 2001). Alle drei Genomeinheiten lassen sich voneinander funktionell unterscheiden. Die chromosomal kodierten Eigenschaften dienen prinzipiell der Aufrechthaltung von grundlegenden Stoffwechselfunktionen (Capela et al., 2001). Das Plasmid pSymA trägt die für die symbiotischen Eigenschaften notwendigen Gene, z.B. zur Ausbildung von Wurzelknöllchen mit Leguminosen oder die Fähigkeit zur Stickstofffixierung (Capela et al., 2001). Auf dem pSymB Plasmid befinden sich im Wesentlichen die Gene, die dem Organismus Anpassungsfähigkeit an verschiedene Wachstumsbedingungen verleihen und Gene, die für zusätzliche wichtige Eigenschaften der Bakterienzelle kodieren, wie die Ausbildung von Exopolysacchariden, antibiotische Resistenzen sowie verschiedene katabole Enzymsysteme (Finan et al., 2001). Da die Gene der AF-Reduktase und der beiden CYP-Proteinen von *S. meliloti* auf dem Chromosom identifiziert wurden, könnte eine bedeutende Rolle dieser Proteine im Metabolismus von *S. meliloti* 1021 angenommen werden.

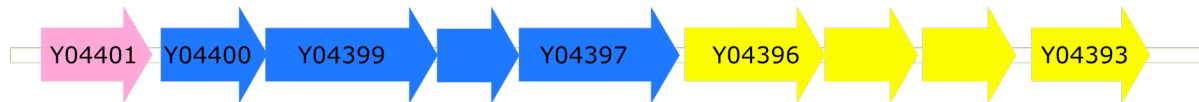
Die Untersuchungen der Monooxygenase aus *S. meliloti* 1021 haben gezeigt, dass dieses Enzym an der Hydroxylierung des 1,5-AM beteiligt ist. Die P450-Systeme bestehen neben der Monooxygenase aus zwei Hilfsproteinen, die die Elektronen vom Cosubstrat an die Monooxygenase weiterleiten. Es handelt sich hier um ein Flavoprotein (Reduktase) und ein Eisen-Schwefel Protein (Redoxin). Durch die Fusion des Monooxygenase-Gens *Y01812* aus *S. meliloti* mit den Putidaredoxin Reduktase- und Putidaredoxin-Genen aus *Pseudomonas putida* konnte ein Fusionsprotein erhalten werden, das im Test Aktivität mit 1,5-AM zeigte. Da die Aktivität sehr gering war, konnte bisher das Produkt der Umsetzung von 1,5-AM mit dem Fusionsprotein PdR/Pdx-MO1812-(His)<sub>6</sub> nicht identifiziert werden. Dennoch ist die Beteiligung der Monooxygenase MO1812 aus *S. meliloti* 1021 am 1,5-AF-Abbauweg unzweifelhaft, da die Inaktivierung des Gens *Y01812* durch Deletion zeigte, dass *S. meliloti* 1021 nicht mehr mit 1,5-AF als Kohlenstoffquelle wachsen kann. Da aber das Wachstum mit anderen Kohlenhydraten als Substrat dabei nicht beeinflusst war, scheint die Monooxygenase zumindest im Zentralstoffwechsel keine entscheidende Rolle zu spielen.

## 2 1,5-AF-Reduktase aus *S. meliloti* 1021

Das Enzym AF-Reduktase [EC 1.1.1.292] wurde erstmals aus *S. morelense* S-30.7.5 isoliert und charakterisiert (Kühn et al., 2006). Aufgrund der hohen Identität der AF-Reduktase mit der aus dem ORF *Smc04400* von *S. meliloti* 1021 abgeleiteten Sequenz (86 %), sowie identischen Peptidmassen und einer nachweisbaren Induktion der AF-Reduktase in *S. meliloti* 1021, wurde als sicher angenommen, dass dieser ORF eine AF-Reduktase kodiert (Kühn, 2004; Kühn et al., 2006).

Die Nukleotidsequenz des ORF *Smc04400* enthält konservierte Dehydrogenase-Motive, weshalb das abgeleitete Protein als mögliche Oxidoreduktase annotiert wurde (Kühn et al., 2006). Die Lage des Gens sowie die direkte Umgebung sind in Abbildung 47 dargestellt. Die Analyse der Umgebung erlaubt keinen genauen Rückschluss auf die biologische Funktion des Gens. Da es sich um eine Mischung aus theoretischen, nicht untersuchten Proteinfunktionen handelt, die sowohl an der

Fettsäuresynthese als auch am Kohlenstoffmetabolismus beteiligt sind, wird die Aussage über eine eventuelle Funktion des Gens erschwert.



#### Abbildung 47: Lage von *Smc04400* in Genom von *S. meliloti* 1021

Mögliche Proteinfunktionen der angegebenen ORF: Transkriptionsregulator (Y004401), AF-Reduktase (Y04400), Acyl-CoA-Transferase (Y04399), [EC2.8.3.-], Enoyl-CoA-Dehydratase (Y04398), [EC 4.2.1.7], L-Sorbose-Dehydrogenase (Y04397), [EC 1.2.1.-], Periplasmatisches Bindungsprotein (Y04396), Transportsystem Permeasen (Y04395/Y04394), ATP-Bindungsprotein (Y04393).

Das *Smc04400*-Gen wurde aus der genomischen DNA von *S. meliloti* 1021 kloniert. Die Expression wurde in *E. coli* durchgeführt, da sich die *codon usage* für ein prokaryontisches Gen optimal eignet (Kozak, 1983). Die heterologe Expression des *Smc04400*-Gens ergab, dass es sich eindeutig um das *afr*-Gen handelt, das für ein dimeres Protein mit der Größe von 74,1 kDa kodiert. Die Dimerisierung dieses Enzyms und die daraus resultierende Größe ergeben den bedeutendsten Unterschied zwischen den beiden rhizobiellen AF-Reduktasen. Die Dimerisierung wurde auch für die AF-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5 postuliert, da die C-terminale Domäne des Enzyms in Form eines großen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes vorliegt, das eine Zusammensetzung zweier Monomere ermöglichen würde (Dambe et al., 2006). Der Vergleich beider bakterieller AF-Reduktasen mit einer eukaryontischen Reduktase (Sakuma et al., 1998) ist in der Tabelle 31 zusammengefasst.

Die bakteriellen AF-Reduktasen zeigen mehrere Unterschiede im Vergleich zur eukaryontischen Reduktase. Die rhizobiellen Enzyme sind strikt NADPH-abhängig, während die Säuger-Reduktase beide Cosubstrate verwenden kann. Allerdings ist die Aktivität dieser Reduktase unter Verbrauch von NADH viel geringer und erreicht nur 4 % der mit NADPH bestimmten Aktivität (Sakuma et al., 1998). Das hepatische Protein reduziert neben dem Hauptsubstrat 1,5-AF auch weitere Aldehyde und Ketone, wie z.B. 2,3-Butandion, Formaldehyd, Acetaldehyd und Pyridin-3-aldehyd.



Diese Verbindungen gehören nicht zum Substratspektrum der beiden bakteriellen Reduktasen. Alle drei Enzyme setzen D-Glucoson um, die relativen Aktivitäten der rhizobiellen Reduktasen im Vergleich mit dem Hauptsubstrat liegen allerdings deutlich höher als bei dem Säugerenzym. Das Substratspektrum der Reduktasen aus *S. meliloti* und *S. morelense* ist gleich.

**Tabelle 31: Vergleich den Rhizobiellen AF-Reduktasen mit der eukaryontischen AF-Reduktase**

Quelle	MG (kDa)	Struktur	A <sub>sp</sub> (U/mg)	Cofactor	Substrate der Reduktionsreaktion	Relative Aktivität (%)
<i>S. meliloti</i> 1021	74,1	Dimer	947	NADPH	1,5-AF	100
					Glucoson	25
					Xyloson	34
					5-KF	36
<i>S. morelense</i> S-30.7.5	35,1	Monomer	488	NADPH	1,5-AF	100
					3-Keto-1,5-AF	36
					Xyloson	17
					Glucoson	22
					Alloson	10
<i>Sus suis</i>	38	Monomer	1,16	NADPH	1,5-AF	100
				NADH	Glucoson	2
					2,3-Butandion	53
					Formaldehyd	7
					Acetaldehyd	3
					Pyridin-3-aldehyd	81
					Glucuronsäure	15

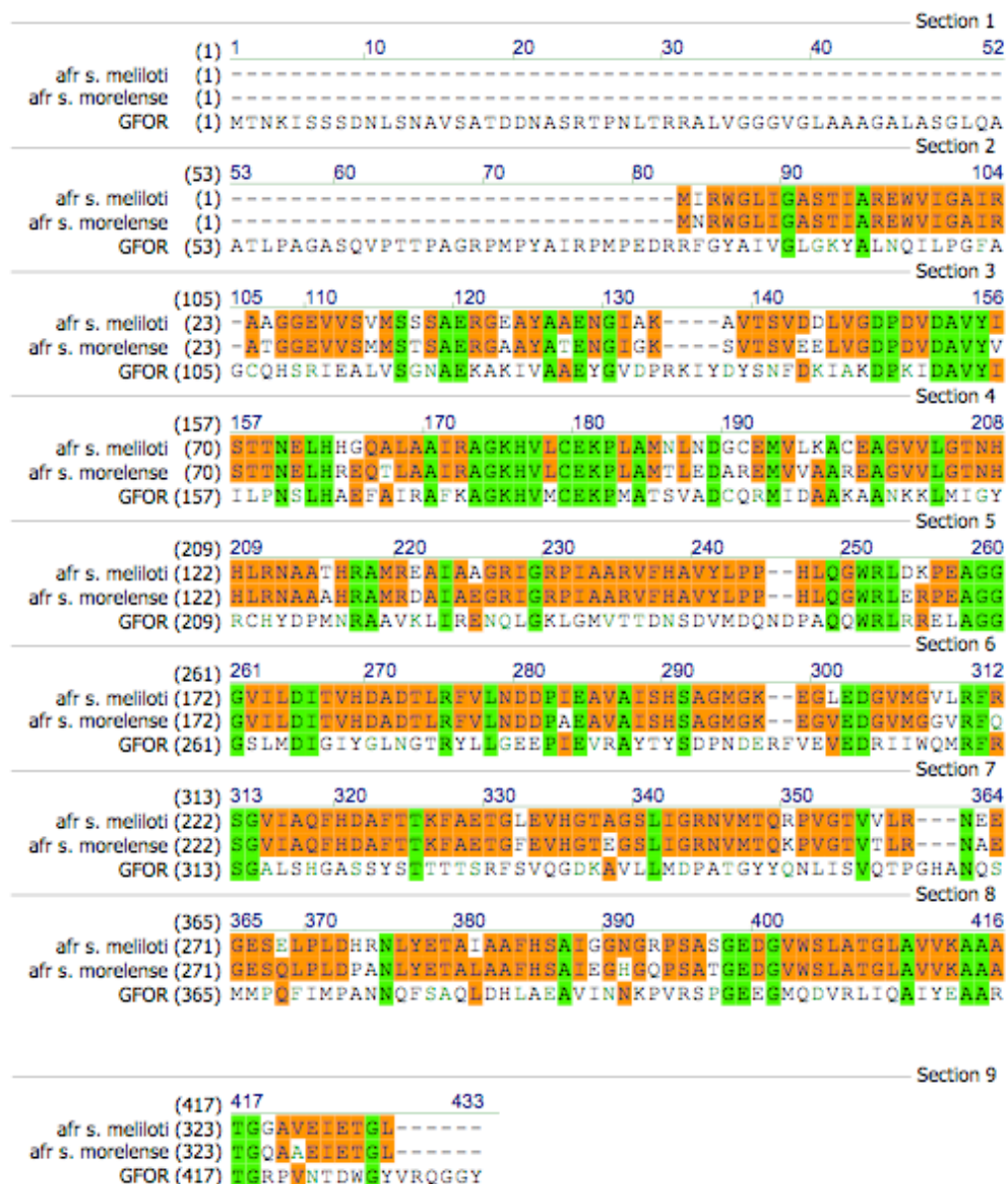
Bei den Untersuchungen mit der neu isolierten AF-Reduktase aus *S. meliloti* 1021 wurden die Substrate der bereits beschriebenen AF-Reduktase getestet (Kühn et al., 2006). Beide Enzyme weisen keine Aktivität mit den häufig vorkommenden Kohlenhydraten auf, deswegen wurden in beiden Fällen Osone untersucht, die anschließend in das Substratspektrum miteinbezogen werden konnten (Tabelle 29).

Die Osone (2-Ketoaldosen) stellen seltene Verbindungen dar und werden durch die enzymatische Oxidation von verschiedenen Hexosen mit Pyranose-2-Oxidase [EC 1.1.3.10] gewonnen (Giffhorn et al., 2000; Huwig et al., 1994). 2-Ketoaldosen können durch intramolekulare Reaktion der Aldehydgruppe am C-1 und der Hydroxylgruppe am C-5 in eine zyklische Halbacetalform überführt werden und liegen somit in der Pyranoseform als Strukturanaloga der 1,5-AF vor (Freimund und Köpper, 2004). Aufgrund des Substratspektrums könnte angenommen werden, dass die Grundstruktur der Substrate der bakteriellen AF-Reduktasen folgendermaßen zusammengefasst werden kann: die zyklischen Ether in Pyranoseform mit einer Carbonylfunktion an C-2-Position werden reduziert. Die Reduktion der linearen Aldehyde und Ketone durch die Säugerreduktase beweist dagegen, dass eine Ringstruktur der Substrate keine Bedingung für die Reduktionsreaktion ist (Sakuma et al., 1998).

Die Produkte der AF-Reduktase aus *S. meliloti* 1021 wurden bestimmt. Alle Reduktionsreaktionen führten zu identischen Produkten, wie sie mit AF-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5 erhalten wurden. Die durchgeführten Konversionen mit verschiedenen Substraten haben gezeigt, dass die 1,5-AF im bakteriellen System stereoselektiv und quantitativ zum Polyol 1,5-AM reduziert wird. Die Katalyse mit der eukaryontischen Reduktase ergab dagegen 1,5-AG als Produkt (Sakuma et al., 1998), das als strukturanaloge Verbindung zur D-Glucose physiologische Bedeutung für die Organismen besitzt (Yamanouchi et al., 2003). Die bakteriellen Reduktasen katalysieren eine weitere stereoselektive Reduktion, in der D-Glucoson zu D-Mannose umgesetzt wird. Andere Osone werden zu isomeren Gemischen von Hexosen bzw. Pentosen reduziert, bei denen sich die Hydroxylgruppen am C-2 in äquatorialer oder axialer Position befinden. Die Oxidationsreaktion wird von keiner der drei AF-Reduktasen katalysiert. Bei der eukaryontischen Reduktase konnte die Oxidation von 1,5-AG auch nicht durch Zugabe von hohen Substrat- und Cosubstratkonzentrationen gemessen werden (Sakuma et al., 1998). Die Affinität des Enzyms aus *S. meliloti* wurde für das Hauptsubstrat, das Cosubstrat und 5-KF durch die Bestimmung von  $K_m$ -Werten untersucht (Tabelle 25). Für die Osone wurden die Michaelis-Menten-Kinetiken nicht aufgenommen. Die durchgeführten Messungen ergaben  $K_m$ -Werte für 1,5-AF, NADPH und 5-KF von 1,0 mM, 0,06 mM und 6,1 mM. Der Vergleich mit der AF-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5 zeigt für das Enzym

aus *S. meliloti* 1021 eine viel höhere Affinität zum Hauptsubstrat. Der für das *S. morelense*-Protein bestimmte  $K_m$ -Wert liegt bei 8,4 mM für 1,5-AF. Die eukaryontische Reduktase dagegen weist eine noch bessere Bindung des Substrates auf, da der  $K_m$ -Wert für 1,5-AF bei 0,44 mM bestimmt wurde (Sakuma et al., 1998). Die Affinität der beiden bakteriellen Reduktasen gegenüber dem Hauptsubstrat unterscheidet sich deutlich, wobei beide Enzyme die gleiche metabolische Rolle besitzen, da sie die 1,5-AF als indirekte Kohlenstoffquelle zum Wachstum der Zellen benutzen, im Gegensatz zur Säuger-AF-Reduktase, die als Regulator benötigt wird. Dabei stehen hier sehr geringe 1,5-AF-Konzentrationen zur Verfügung, was die extrem hohe Affinität des eukaryontischen Enzyms gegenüber der 1,5-AF erklären würde.

Der Sequenzvergleich der AF-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5 und der aus *S. meliloti* 1021 mit der NCBI Datenbank weist auf keine Oxidoreduktase mit einer bekannten Funktion hin. Dennoch konnte eine hohe Homologie (73 bis 86 %) zu den putativen Oxidoreduktasen aus *Mesorhizobium loti*, *Brucella suis* und *B. melitensis* festgestellt werden (Kühn et al., 2006). Außerdem zeigt der Sequenzvergleich eine Übereinstimmung von ca. 30 % mit der Glucose-Fructose-Oxidoreduktase aus *Zymomonas mobilis*, die zu der Familie *GFO/IDH/MocA* gehört (Zachariou und Scopes, 1986). Das Alignment (Abbildung 48) zeigt, dass die AF-Reduktasen in den Bereichen den hochkonservierten Sequenz-Motiven mit der GFOR übereinstimmen. Zu diesen gehört das charakteristische NADP-Bindemotiv (-G<sub>5</sub>XXGXSXXA<sub>13</sub>-), das konservierte Substrat-Bindemotiv (-A<sub>86</sub>GKHVLCEK<sub>94</sub>-) und die katalytische Triade, die aus zwei unveränderlichen Aminosäureresten (Lys94 und Asp176) und His180 bei der AF-Reduktase (Kühn et al., 2006), sowie Tyr217 bei der GFOR besteht (Kingston et al., 1996; Wiegert et al., 1997). Aufgrund der markanten Eigenschaften, die die AF-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5 (Kühn et al., 2006) und die aus *S. meliloti* 1012 gemeinsam mit der Familie *GFO/IDH/MocA* aufweist, insbesondere mit der GFOR, wurden die beiden bakteriellen AF-Reduktasen dieser Familie zugeordnet.



**Abbildung 48: Aminosäurealignment der AF-Reduktase aus *S. meliloti* 1021, der AF-Reduktase aus *S. morelense* und der GFOR aus *Z. mobilis***

Grün sind die identischen Aminosäuren dargestellt, orange die konservierten.

AFR *S. meliloti* – AF-Reduktase aus *Sinorhizobium meliloti* 1021 [EC 1.1.1.292]; AFR *S. morelense* – AF-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5 [EC 1.1.1.292]; GFOR – Glucose-Fructose-Oxidoreduktase aus *Zymomonas mobilis* [EC 1.1.98.28]

Die Auflösung der Kristallstruktur der AF-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5 bestätigt die Zugehörigkeit des Enzyms zu der Familie *GFO/IDH/MocA*. Die AF-Reduktase besteht aus zwei Domänen. In der N-terminalen Domäne wurde die Rossmann-Falte identifiziert. Dies ist ein, für NAD(H)/NADP(H)-bindende Proteine,

typisches Motiv. Die Aminosäuresequenz der Rossmann-Falte ist in verschiedenen Proteinen sehr unterschiedlich, dennoch konnte eine Fingerprint-Region identifiziert werden. Diese besteht meist aus 30-35 Aminosäureresten. Das zentrale Motiv der Fingerprint-Regions ist sehr Glycin-reich und besitzt die Konsensussequenz GXGXXG für die NAD(H)-bindende Proteine (Bellamacina, 1996). Aufgrund der geringen Sequenzidentität zwischen den Dinukleotidbindenden Proteinen wurde die Konsensussequenz für die verschiedenen Proteinfamilien erweitert, wie z.B. GXXXGXG für die Mitglieder der Familie den *short-chain* Dehydrogenasen (Jornvall et al., 1995). Die Funktion der Rossmann-Falte ist mit der Bindung und Spezifität des Cosubstrats verbunden. In der Aminosäuresequenz der bakteriellen AF-Reduktasen wurde folgende Sequenz in dieser Region identifiziert: GASTIA (Dambe et al., 2006). Nur das erste Glycin ist bei der AF-Reduktase konserviert. Statt des zweiten Glycins kommt ein Serin auf Position 10 vor, wobei das Ala13 für NADP(H)-bindende Enzyme konserviert ist (Dambe et al., 2006). Die C-terminale Domäne besteht aus acht  $\beta$ -Faltblättern, die meist antiparallel orientiert sind und fünf  $\alpha$ -Helices (Dambe et al., 2006). Diese Domäne enthält die Aminosäurenreste, die einerseits an der Substratbindung beteiligt sind und andererseits die Konversion des Substrates mitbeeinflussen (Dambe et al., 2006).

Die Charakterisierung der AF-Reduktase aus *S. meliloti* 1021 hat eindeutig gezeigt, dass dieses Enzym eine hohe Homologie zur AF-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5 aufweist. Beide Enzyme stellen die ersten bakteriellen AF-Reduktasen dar, die nicht nur durch Aktivitätsmessungen in Zellextrakten nachgewiesen werden konnten, sondern isoliert und vollständig charakterisiert wurden. Die geringe Übereinstimmung zu der eukaryontischen Reduktase schließt die Möglichkeit aus, dass es sich im Fall der bakteriellen und eukaryontischen AF-Reduktasen um nah verwandte Proteine handelt.

### **3 Biologische Funktion der AF-Reduktase**

Die AF-Reduktase aus *S. meliloti* 1021 wird, wie die AF-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5 (Kühn et al., 2006), durch die Anwesenheit von 1,5-AF induziert und zeigt eine sehr hohe Spezifität für die Reduktion der 1,5-AF und verschiedener 2-Ketoaldosen. Da die AF-Reduktase zum Wachstum des Organismus auf 1,5-AF

als einziger Kohlenstoffquelle benötigt wird, wird ihre Funktion in Rhizobien als metabolisch betrachtet. Die Lokalisierung des *afr*-Gens auf dem Chromosom in *S. meliloti* deutet auf eine metabolisch bedeutende Funktion der AF-Reduktase in Rhizobien hin. Die in *E. coli*, Pflanzen und Säuger-Zellen vorkommenden AF-Reduktasen wurden als regulatorische Proteine beschrieben, die den Abbau des Speicherpolysaccharids Glycogen durch die Bildung des Signalmoleküls 1,5-AG beeinflussen (Konishi et al., 2000; Sakuma et al., 1998; Shiga et al., 1999). Es wurde vermutet, dass es sich im Fall der rhizobiellen Reduktasen ebenfalls um regulatorische Proteine handeln könnte. Die Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass das Produkt der 1,5-AF Reduktion, 1,5-AM, weiter verstoffwechselt wird und als leichtverwertbare Kohlenstoffquelle in Form von D-Mannose in den ED-Weg eintreten kann (Kühn et al., 2006). Somit wurde die Signalrolle des 1,5-AM ausgeschlossen. Sowohl 1,5-AM als auch D-Mannose sind dafür bekannt, dass sie durch Lektine spezifisch gebunden werden können (Mo et al., 2001; Schaeffer et al., 1980). Derartige Kohlenhydrat-Lektin-Wechselwirkungen wurden für Rhizobien bereits im Zusammenhang mit der Wirtsspezifität beschrieben. Bei diesem Mechanismus handelt es sich um die gegenseitige Erkennung von Wirt und Symbiont aufgrund der spezifischen Bindungen der bakteriellen Exo- oder Kapselpolysaccharide mit den Lektinen der Leguminosen (Werner, 1987). Die extrazellulären Polysaccharide sind speziesspezifisch und bei einigen Organismen wurde ein besonders hoher Anteil von manno-konfigurierten Zuckern festgestellt. Daraus könnte man auf eine eventuelle Rolle der AF-Reduktase in Rhizobien schließen, die bei der Ausbildung solcher Oberflächenstrukturen durch Bereitstellung der manno-konfigurierten Zucker beteiligt sein könnte.

Die Untersuchungen der AF-Reduktase aus *S. morelense* S-30.7.5 und aus *S. meliloti* 1021 haben auf eine Verwandtschaft der beiden Enzyme mit der Glucose-Fructose-Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* hingewiesen. Dieses Enzym hat, durch die Bildung von Sorbitol, eine osmoprotektive Funktion (Loos et al., 1994), die möglicherweise auch auf die rhizobiellen AF-Reduktasen bezogen werden könnte. Derartige Polyol-Verbindungen kommen in biologischen Systemen vor und werden als sogenannte kompatible Solute bezeichnet (Le Rudulier et al., 1984; Measures, 1975). Es konnte bereits ein Glycin-Betain-Salz mit solcher Funktion bei *Rhizobium meliloti* nachgewiesen werden (Smith et al., 1988), ebenso bei *E. coli*,

*Salmonella typhimurium* und *Klebsiella pneumoniae* (Landfald und Strom, 1986; Le Rudulier und Bouillard, 1983). Aufgrund der gebildeten Proteinmengen sowie der Substrataffinität weisen die rhizobiellen Reduktasen Eigenschaften der bakteriellen Polyol-Dehydrogenasen auf, die häufig bei der Assimilation von Kohlenhydraten in Bakterien identifiziert werden (Doten und Mortlock, 1985a; Schneider und Giffhorn, 1989). Ungewöhnlich ist jedoch die hohe Substratspezifität der AF-Reduktasen in Rhizobien für die Verbindungen, die in der Natur sehr selten und in geringen Mengen vorkommen. Das Auftreten der 1,5-AF wurde bis jetzt im Zusammenhang mit dem durch  $\alpha$ -1,4-Glucanlyasen [EC 4.2.2.13] katalysierten Abbau von Stärke und Glycogen (Yu et al., 1995) beschrieben. In *E. coli* wurde dieser Prozess als *Third Glycogenolytic Pathway* (vgl. Abbildung 3) bezeichnet (Shiga et al., 1998). In *Sinorhizobium*-Spezies wurde festgestellt, dass Speicherpolysaccharide intrazellulär akkumulieren können (Povolo und Casella, 2000; Zevenhuizen, 1981), es bleibt jedoch unklar, ob bakterielle  $\alpha$ -1,4-Glucanlyasen an deren Abbau teilnehmen. Da aber die zu den *Rhizobiaceae* gehörenden Bakterien in Form von Bakteroiden am Metabolismus der Wirtspflanze beteiligt sind (Werner, 1987), könnte das Auftreten der 1,5-AF durch die  $\alpha$ -1,4-Glucanlyasen der *Fabales* erklärt werden. Der *Third Glycogenolytic Pathway* wurde bis jetzt bei Rhizobien und deren Wirtspflanzen noch nicht untersucht. Doch die bisher erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die AF-Reduktase an der Umwandlung des seltenen Zuckers 1,5-AF zu einer leichtverwertbare Kohlenstoffquelle beteiligt ist, was auch die eventuelle regulatorische Funktion des Abbauweges in Rhizobien, wie bei anderen taxonomischen Gruppen angenommen (Werner, 1987), in Frage stellt. Als natürliche Substrate der AF-Reduktase könnten auch die Strukturanaloga der 1,5-AF, 2-Ketoaldosen, in Betracht gezogen werden, die ebenfalls selten in den biologischen Systemen vorkommen (Gabriel et al., 1993; Smirnov und Wheeler, 2000). Ihre biologische Aktivität für die Konversion von Glucoson wurde bei Weißfäulepilzen beschrieben (Baute und Baute, 1983; Baute et al., 1986a). Ebenso können die Osonen als Zwischenmetabolite im Kohlenstoffwechsel auftreten. Eine NAD(P)H-abhängige L-Sorboson-Dehydrogenase, die an der Assimilation der L-Sorbose über L-Sorbosone beteiligt ist, wurde in *Gluconobacter suboxydans* beschrieben, (Saito et al., 1997; Shinjoh et al., 2002). Die induzierbare AF-Reduktase würde hier an der Assimilation von Osonen durch C-2-Reduktion teilnehmen.

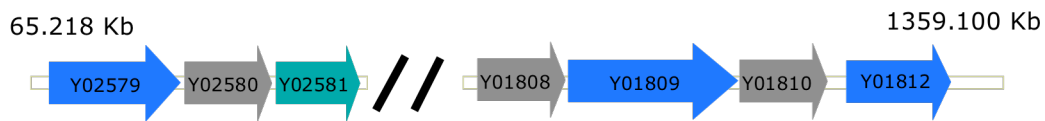
#### 4 Die Monooxygenase MO1812 aus *S. meliloti* 1021

Es wurden bereits mehrere CYP-Systeme in N<sub>2</sub>-fixierenden Bakterien der Familie der *Rhizobiaceae* charakterisiert, unter anderen in *Rhizobium leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum* oder *Agrobacterium tumefaciens*, das zwei P450-ähnliche ORFs besitzt (Kanemoto et al., 1989). Betrachtet man die N<sub>2</sub>-fixierenden Organismen allgemein, findet man weitere P450-ähnliche Sequenzen z.B. in *Anabaena* sp. (Lammers et al., 1990). In *B. japonicum* wurde ein Cytochrom P450-Locus beschrieben, dessen Gene unter symbiontischen Bedingungen exprimiert werden, wobei fest steht, dass dieses P450-System nicht notwendig für die Knöllchenbildung oder N<sub>2</sub>-Fixierung ist. Die Rolle dieses Cytochroms ist deswegen noch nicht vollkommen klar (Tully und Keister, 1993). In *R. leguminosarum* und in *S. meliloti* wurde ein Ferredoxin-Oxygenase-Komplex beschrieben, der durch sogenannte *mocCABRDE(F)*-Gene kodiert wird. Alle Gene sind auf dem Sym-Plasmid lokalisiert. Die Proteine des Komplexes sind an der Synthese von *Rhizopine* (3-O-methyl-scylo-inosamine, 3-O-MSI) beteiligt (Bahar et al., 2000; Bahar et al., 1998). Diese Verbindung wird von Bakteroiden in den Wurzelknöllchen synthetisiert, was die Lokalisierung der Gene auf dem Sym-Plasmid erklärt.

In *S. morelense* S-30.7.5 und in *S. meliloti* 1021 ist eine CYP-Monooxygenase an der Umsetzung von 1,5-AM zu D-Mannose beteiligt. Zwei theoretische CYP-kodierende Gene konnten auf dem Chromosom von *S. meliloti* 1021 identifiziert werden, die bis jetzt nicht untersucht worden waren und somit eine unbekannte Funktion besaßen.

Auf der Aminosäure-Ebene sind beide Gene nur zu 16 % homolog (Abbildung 50). Außerdem liegen sie im Chromosom weit voneinander entfernt (Abbildung 49), was auch eine eventuelle gemeinsame Funktion ausschließt. Die unmittelbare genetische Umgebung gibt leider keine Hinweise auf eine mögliche Rolle der beiden Proteine, es konnten auch keine Elektronentransferproteine, wie eine FAD-enthaltende Reduktase und ein Eisen-Schwefel-Protein (Redoxin) gefunden werden. Die Gene *Y02579* und *Y01812* wurden aus der genomischen DNA von *S. meliloti* 1021 kloniert. Die heterologe Expression war nur im Fall der Monooxygenase MO1812 erfolgreich.

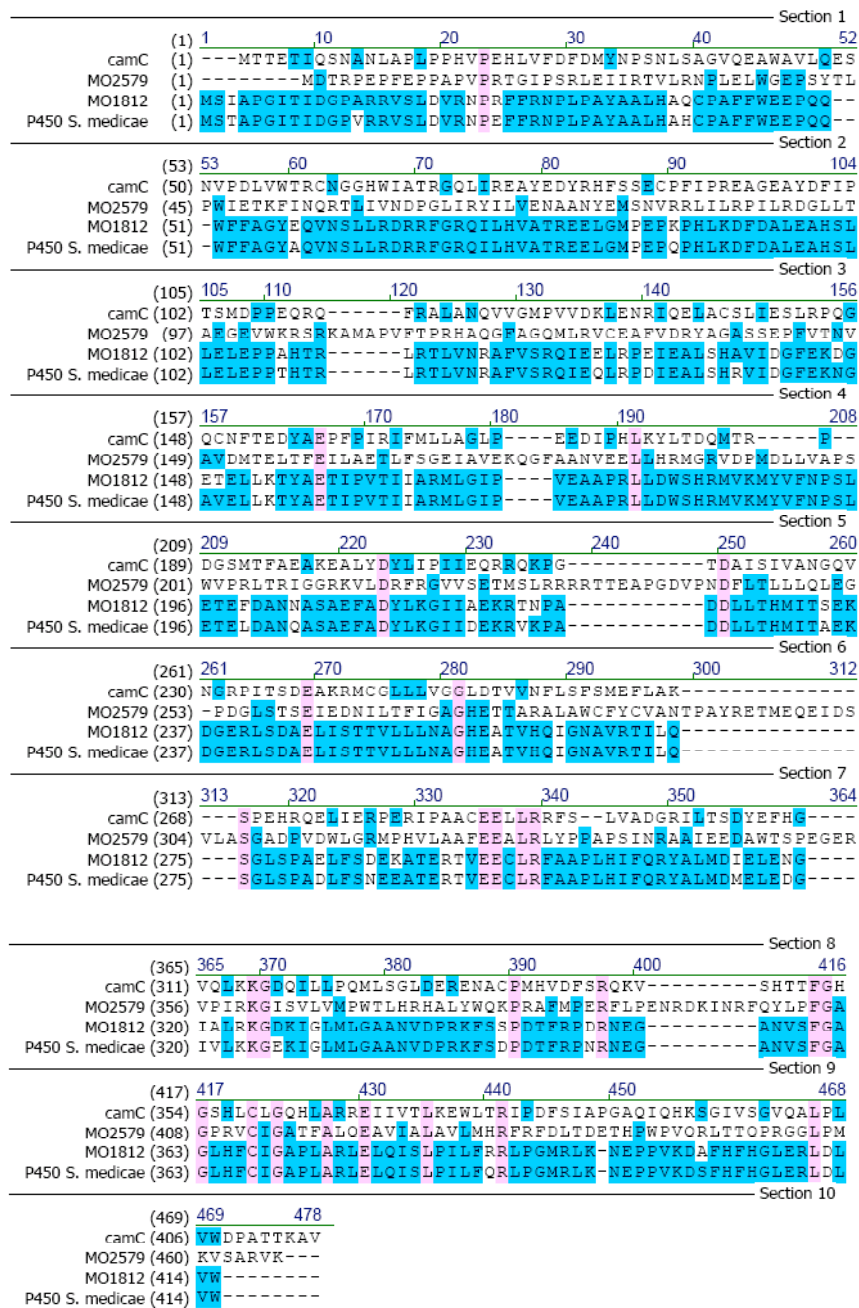




**Abbildung 49: Lage der beiden CYP-Genen (Y02579 und Y01812) auf dem Chromosom von *S. meliloti* 1021.**

Mögliche Proteinfunktionen der angegebenen ORF: Cytochrom P450-Monooxygenase (Y02579), Malat Synthase (Y02581), konservatives hypothetisches Protein (Y01808), O-acetylhomoserin Sulphydrylase (Y01809), partielle Transposase (Y01810/Y01811), Cytochrom P450-like Monooxygenase (Y01812).

Die Monooxygenase MO1812 liegt als ein niedermolekulares Protein vor, das keine posttranslationale Modifikation erfordert, was vorteilhaft für eine Expression im *E. coli*-System ist. Bei der Enzymanreicherung der in *E. coli* heterolog exprimierten Monooxygenase stellte sich heraus, dass ein Teil des Proteins in Form von *inclusion bodies* vorliegt (nicht dargestellt). Die Erniedrigung der Kultivierungstemperatur nach der Induktion von 37 °C auf 20 °C ermöglichte die Herstellung des Proteins in löslicher Form. Die spezifische Aktivität gegenüber 1,5-AM betrug 0,14 U/mg (Tabelle 27). Trotz der niedrigen Aktivität konnte gezeigt werden, dass die Monooxygenase MO1812 mit 1,5-AM als Substrat aktiv war. Die niedrige Aktivität der Monooxygenasen ist in der Literatur bekannt. Diese wird durch andere Nachteile wie limitierte Stabilität, Verbrauch des teuren Cofactors NAD(P)H zur Reduktion des Häm-Eisens und die Abhängigkeit von Elektrontransferproteinen begleitet (Urlacher et al., 2004). Die Monooxygenase MO1812 aus *S. meliloti* benötigt wie praktisch alle CYP-Monooxygenasen, zusätzlich Elektronentransferproteine für ihre Aktivität. Da keine derartigen Proteine im Genom von *S. meliloti* identifiziert werden konnten, wurden nicht die für die Monooxygenase MO1812-spezifischen Hilfssysteme verwendet, sondern diejenigen aus dem CAM-System von *P. putida*. Es wurde eine Fusion von Putidaredoxin-Reduktase (PdR, *camA*) und Putidaredoxin (Pdx, *camB*) hergestellt. Die Herstellung dieses Konstruktes ermöglichte die Dosierung der verwendeten Enzyme bei der Assay-Entwicklung für die 1,5-AM-Messungen.



**Abbildung 50: Aminosäurealignment der Monooxygenasen 1812 und 2579 aus *S. meliloti* 1021 mit der Monooxygenase aus *S. medicae* und P450<sub>CAM</sub>**

Blau sind die identischen Aminosäuren dargestellt, rosa die konservierten.

camC – Monooxygenase P450<sub>CAM</sub> aus *P. putida*; MO2579 – Monooxygenase 2579 aus *Sinorhizobium meliloti* 1021; MO1812 – Monooxygenase 1812 aus *Sinorhizobium meliloti* 1021; P450 *S. medicae* – CYP-Monooxygenase aus *Sinorhizobium medicae*

Die Anwendung eines Elektronentransfersystems aus einem anderen Organismus könnte auch eine Erklärung für die niedrige Aktivität der Monooxygenase sein. Vor allem wenn man die niedrige Homologie der Monooxygenase MO1812 aus *S. meliloti* mit der Monooxygenase des CAM-Systems (20 %) (Abbildung 50) betrachtet, könnte man sich eine genauso geringe Sequenzübereinstimmung des Hilfssystems vorstellen. Zusätzlich könnte die niedrige Aktivität der Monooxygenase auch dadurch erklärt werden, dass das Substratspektrum dieses Proteins unbekannt ist und das hier als Substrat verwendete 1,5-AM keines der Hauptsubstrate der Monooxygenase darstellt.

Die Literatur berichtet über Monooxygenasen, bei denen das P450-System ein einziges Polypeptid ist, wie z.B. in P450<sub>bm3</sub> aus *Bacillus megaterium* oder CYP102A7 aus *Bacillus licheniformis* (Dietrich et al., 2008). Um aus der Monooxygenase MO1812 ein P450-System zu erzielen, wurde diese Monooxygenase mit dem Eisen-Schwefel Protein (Pdx) und dem Flavoprotein (PdR) aus *P. putida* fusioniert. Mit den beiden Elektronentransferproteinen aus dem CAM-System wurden bereits aktive Fusionsproteine mit der Monooxygenase aus P450<sub>CAM</sub> erstellt (Sibbesen et al., 1996). Die Reihenfolge der Proteine wurde nach Sibbesen et al. (1996) konstruiert. Die Expression des Konstruktes ergab ein 100,1 kDa großes Protein, das allerdings nur eine geringe spezifische Aktivität gegenüber 1,5-AM (0,02 U/mg) hatte (Tabelle 28). Durch die spektrale Charakterisierung und die Aktivitätsbestimmung mit 1,5-AM als Substrat konnte die Herstellung des fusionierten aktiven P450-Systems mit der Monooxygenase 1812 aus *S. meliloti* bestätigt werden. Die Beteiligung der Monooxygenase MO1812 an dem neuartigen Abbauweg von 1,5-AF in *S. meliloti* wurde damit verifiziert.

## **5 Die Proteinfamilie der Monooxygenase 1812 aus *S. meliloti* 1021**

Die Superfamilie der CYP-P450 Proteine ist sehr heterogen (Kelly et al., 2003). Die Konservierung der Sequenzen innerhalb der Superfamilie ist gering und kann zwischen verschiedenen Familien sogar unter 20 % liegen.

Über die in dieser Arbeit untersuchte Monooxygenase 1812 aus *Sinorhizobium meliloti* 1021 wurde in der Literatur bis jetzt nicht berichtet. Der Sequenz des Y01812-Gens wurde aufgrund der Homologie zu anderen CYP-Systemen die theoretische Funktion einer P450-Monooxygenase zugewiesen. Die höchste Übereinstimmung zeigt sie zu einem Cytochrom P450 aus *Sinorhizobium medicae* (Abbildung 50). Weitere homologe Sequenzen gehören zu unterschiedlichen P450-Systemen aus Rhizobien. Diese sind in der Tabelle 32 zusammengefasst. Da manche dieser Proteine bis jetzt nicht untersucht wurden, wird die ihnen zugewiesene Funktion als theoretisch bezeichnet.

**Tabelle 32: Homologie-Untersuchungen der Monooxygenase 1812 aus *S. meliloti* 1021**

Quelle	Protein	Homologie (%)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	P450-ähnliche Monooxygenase	100
<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	Cytochrom P450	92
<i>Rhizobium etli</i> CIAT652	theoretisches Cytochrom P450	63
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	theoretische Cytochrom P450 Hydroxylase	63
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Cytochrom P450 Hydroxylase	63
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 3841	theoretisches Cytochrom P450	62
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	Cytochrom P450 Hydroxylase	56

Aufgrund der Topologie der Proteine, die an dem Elektronentransfer vom Cosubstrat zur Monooxygenase beteiligt sind, können die Cytochrome P450 in zehn Klassen unterteilt werden (Hannemann et al., 2007). Die Übersicht ist in der Tabelle 33 zusammengefasst.

**Tabelle 33: Klassifizierung der P450-Systeme aufgrund der Topologie der Elektronentransferproteine**

Klasse/Quelle	Elektronentransportkette	Lokalisierung	Literatur
<b>Klasse I</b>			
Bakterien	NAD(P)H>FdR>Fdx>P450	Zytosol; löslich	Trower et al., 1990; Sawada et al., 2004; Kelly et al., 2003
Mitochondrien	NADPH>FdR>Fdx>P450	P450: innere mitochondriale Membran FdR: membranassoziiert Fdx: mitochondriale Matrix; löslich	Estabrook, 1999
<b>Klasse II</b>			
Bakterien	NADH>CPR>P450	Zytosol; löslich, <i>Streptomyces carbophilus</i>	Serizawa und Matsuoka, 1991
Mikrosomen A	NADPH>CPR>P450	membranverankert, ER	Schenkman und Jansson, 2003
Mikrosomen B	NADPH>CPR>cytb5>P450	membranverankert, ER	Schenkman und Jansson, 2003
Mikrosomen C	NADH>cytb5Red>cytb5>P450	membranverankert, ER	Schenkman und Jansson, 2003
<b>Klasse III</b>			
Bakterien	NAD(P)H>FdR>Fdx>P450	Zytosol; löslich, <i>Citrobacter braakii</i>	Hawkes et al., 2002; Meharena et al., 2004
<b>Klasse IV</b>			
Bakterien	Pyruvat, CoA>OFOR>Fdx>P450	Zytosol; löslich, <i>Sulfolobus tokadaii</i>	Puchkaev et al., 2002; Zhang et al., 1996
<b>Klasse V</b>			
Bakterien	NADH>FdR>Fdx-P450	Zytosol; löslich, <i>Methylococcus capsulatus</i>	Jackson et al., 2002
<b>Klasse VI</b>			
Bakterien	NAD(P)H>FdR>Fdx-P450	Zytosol; löslich, <i>Rhodococcus rhodochrous</i> 11Y	Rylott et al., 2006; Seth-Smith et al., 2002
<b>Klasse VII</b>			
Bakterien	NADH>PFOR-P450	Zytosol; löslich, <i>Rhodococcus</i> sp. NCIMB 9784, <i>Burkholderia</i> sp., <i>Ralstonia metallidurans</i>	Hunter et al., 2005; Roberts et al., 2002; De Mot und Parret, 2002
<b>Klasse VIII</b>			
Bakterien, Pilze	NADPH>CPR-P450	Zytosol; löslich, <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Fusarium oxy-sporum</i>	Warman et al., 2005; De Mot und Parret, 2002
<b>Klasse IX</b>			
nur NADH-abhängig, Pilze	NADH>P450	Zytosol; löslich, <i>Fusarium oxy-sporum</i>	Daiber et al., 2005
<b>Klasse X</b>			
unabhängig, Pflanzen/Säuger	P450	membrangebunden, ER	Wang und Kulmacz, 2002; Grechkin, 2002; Tijet und Brash, 2002

Innerhalb dieser zehn Klassen befinden sich Monooxygenasen, die sowohl ein Flavoprotein als auch ein Schwefel-Eisen-Protein zum Elektronentransfer für ihre Aktivität benötigen (Klasse I, II, III, IV). Die zweite Gruppe in diesen zehn Klassen stellen Monooxygenasen dar, die entweder eine Reduktase- oder eine Redoxin-Domäne in ihrer Sequenz enthalten und somit nur ein externes Protein zum Elektronentransfer brauchen (V, VI). Eine dritte Gruppe bilden selbstständige P450-Systeme (Klasse VII, VIII, IX, X), deren Aktivität von keinen zusätzlichen Proteinen abhängig ist.

In die Klasse I werden die meisten bakteriellen und mitochondrialen P450-Proteine eingeordnet. Obwohl die prokaryontischen und eukaryontischen Systeme phylogenetisch nicht miteinander verwandt sind, bestehen beide aus drei separaten und unabhängigen Polypeptiden: einer FAD-enthaltenden Reduktase, die die Elektronen vom Cosubstrat (NADH/NADPH) auf das zweite Protein (Ferredoxin) überträgt, welches die Elektronen direkt auf die Monooxygenase überführt, die den dritten Bestandteil des Systems darstellt. In Bakterien kommen alle drei Elemente in der löslichen Form vor, in den eukaryontischen Systemen liegt dagegen nur das Ferredoxin als lösliches Protein in der mitochondrialen Matrix vor, während die Reduktase membranassoziiert und die Monooxygenase membrangebunden ist (Bernhardt, R., 1996; Estabrook, 1999; Gunsalus, I. C. und Sligar, S. G., 1978; Kelly et al., 2003; Lambeth, J. D.; 1991; Sawada et al., 2004; Trower et al., 1990). Was die Monooxygenase MO1812 aus *S. meliloti* 1021 betrifft, zeigen alle Befunde, dass es sich um ein bakterielles System der Klasse I handelt, bei dem alle drei Komponente getrennt vorkommen und in gelöster Form im Cytoplasma der Zelle vorliegen.

## V Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Abbauweg des neuartigen Zuckers 1,5-Anhydro-D-fructose (1,5-AF) in *Sinorhizobium meliloti* 1021, einem Modellbakterium dessen Genomsequenz bekannt ist, aufgeklärt. Die beteiligten Enzyme Anhydrofructose-Reduktase (AFR) und eine P450-Monooxygenase (CYP) wurden in Zellextrakten nachgewiesen und charakterisiert. Die postulierten Reaktionen wurden mit den rekombinanten Enzymen *in vitro* verifiziert. Der erste Reaktionsschritt wird durch AFR katalysiert, die 1,5-AF stereoselektiv zu 1,5-Anhydro-D-mannitol (1,5-AM) reduziert. Die AFR aus *S. meliloti* 1021 ist ein dimeres, strikt NADPH-abhängiges Enzym 74,1 kDa und hat 80 % Sequenzidentität zu AFR aus *S. morelense* S-30.7.5. Die für *S. morelense* S-30.7.5 postulierte Hydroxylierung von 1,5-AM an C-1 zu D-Mannose durch ein CYP-System konnte experimentell bestätigt werden. Zwei putativ für CYP kodierende ORFs wurden aus *S. meliloti* kloniert und charakterisiert. Nur die aus dem ORF *Y01812* erhaltene Monooxygenase konnte in aktiver Form exprimiert werden. Für den Elektronentransfer von NADH auf die MO1812 wurden aus *P. putida* die Gene der Putidaredoxin-Reduktase (*camA*) und des Putidaredoxins (*camB*) kloniert und mit der MO1812-(His)<sub>6</sub> fusioniert. Im Test mit 1,5-AM war das Fusionsprotein aktiv. Die Beteiligung der Monooxygenase an dem Abbauweg von 1,5-AF in *S. meliloti* 1021 wurde zusätzlich durch Deletion des Gens *Y01812* verifiziert, wobei die Fähigkeit des Bakteriums zum Wachstum auf 1,5-AF verloren ging.

## VI Summary

A catabolic pathway of the new sugar 1,5-anhydro-D-fructose (AF) in Rhizobia was clarified in the frame of this work. *S. meliloti* 1021 strain was chosen as a model due to the complete genetic data available. The enzymes of this pathway were identified in cellextracts and characterized. Their participation in these reactions was verified. The first reaction is catalysed through AF reductase which reduces stereoselective AF to 1,5-anhydro-D-mannitol (AM). The *afr*-gene from *S. meliloti* has 1002 bp and the derived polypeptide showed 80 % identity with the AFR from *S. morelense*. The AF reductase from *S. meliloti* is a strictly NADPH dependent dimeric protein of 74 kDa and it has 80 % homology to the AFR from *S. morelense* S-30.7.5. The for *S. morlense* S-30.7.5 C-1 postulated oxygenation of 1,5-AM to the D-mannose through a CYP system could be verified. Two putative CYP coding ORF's from *S. meliloti* were cloned and characterized. Only the monooxygenase from the ORF Y01812 could be expressen in an active form. For the electron transport from NADH the MO1812 two genes: putidaredoxin reductase (*camA*) and putidaredoxin (*camB*) from *P. putida* were cloned and fused with the monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub>. The fusion protein was in the test with 1,5-AM activ. To confirm the involvement of this monooxygenase in the 1,5-anhydro-D-fructose pathway the monooxygenase-gene was accessorially knocked out in *S. meliloti* 1021, what resulted in no-growth of the organism on 1,5-AF.



## VII Literaturverzeichnis

**Ahren, B.; Holst, J. J.; Yu, S.** (2000) 1,5-Anhydro-D-fructose increases glucose tolerance by increasing glucagon-like peptide-1 and insulin in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 397: 219-225

**Ahren, B. und Yu, S.** (2004) Use of a cyclic ether for the preparation of medicaments affecting glucose tolerance. *US Pat. Appl.* 20020198158

**Allen, E. und Allen, O.** (1950) Biochemical and symbiotic properties of the *Rhizobia*. *Bacteriol. Rev.* 14: 273-330

**Andersen S.M.; Lundt, I.; Marcussen, J.** (2000) 1,5-anhydro-D-fructose: stereoselective conversion to 1,5-anhydroalditols and deoxy/amino substituted analogues. *J. Carb. Chem.* 19: 717-725

**Andersen S.M.; Lundt, I.; Marcussen, J.; Sotofte, I.; Yu, S.** (1998) Structure of 1,5-anhydro-D-fructose: x-ray analysis of crystalline acetylated dimeric forms. *J. Carb. Chem.* 17: 1027-1035

**Andersen, S. M.; Lundt, I.; Marcussen, J.; Yu, S.** (2002) 1,5-Anhydro-D-fructose, a versatile chiral building block: biochemistry and chemistry. *Carbohydr. Res.* 337: 873-890

**Appleby, A. C.** (1967) A soluble haemoprotein P450 from nitrogen-fixing *Rhizobium* bacteroids. *Biochim. Biophys. Acta* 147: 399-402

**Arias, A.; Gardiol, A.; Martinez-Drets, G.** (1982) Transport and catabolism of D-mannose in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 151: 1069-1072

**Bahar, M.; de Majnik, John; Saint, C.P.; Murphy, P.J.** (2000) Conservation of a Pseudomonad-like hydrocarbon degradative ferredoxin oxygenase complex involved in rhizopine catabolism in *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2 (3): 257-259

**Bahar, M.; de Majnik, John; Wexler, M.; Fry, J.; Poole, P.S.; Murphy, P.J.** (1998) A model for the catabolism of rhizopine in *Rhizobium leguminosarum* involves a ferredoxin oxygenase complex and the inositol degradative pathway. *MPMI* 11: 1057-1068

**Barnett, M.; Fisher, R. F.; Jones, T.; Komp, C.; Abola, A. P.; Barloy-Hubler, F.; Bowser, L.; Capela, D.; Galibert, F.; Gouzy, J.; Gurjal, M.; Hong, A.; Huizar, L.; Hyman, R.; Kahn, D.; Kahn, M. L.; Kalman, S.; Keating, D. H.; Palm, C.; Peck, M. C.; Surzycki, R.; Wells, D.; Yeh, K. H.; Davis, R. W.; Federspiel, N. A.; Long,**

**S. R.** (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. PNAS 98: 9883-9888

**Baute, M. A. und Baute, R.** (1983) Occurrence among macrofungi of the bioconversion of glucosone to corticosterone. Phytochemistry 23: 271-274

**Baute, M. A.; Baute, R.; Deffieux, G.** (1988) Fungal enzymic activity degrading 1,4- $\alpha$ -D-glucans to 1,5-D-anhydrofructose. Phytochemistry 27: 3401-3403

**Baute, M. A.; Deffieux, G.; Baute, R.** (1986a) Bioconversion of carbohydrates to unusual pyrone compounds in fungi: occurrence of microthecin in morels. Phytochemistry 25: 1472-1473

**Baute, M. A.; Deffieux, G.; Baute, R.; Badoc, A.; Vercauteren, J.; Leger, J. M.; Neveu, A.** (1991) Fungal enzymic activity degrading 1,4- $\alpha$ -D-glucans to echinosporin (5-Epipentomycin I). Phytochemistry 5: 1419-1423

**Baute, M. A.; Deffieux, G.; Vercauteren, J.; Baute, R.; Badoc, A.** (1993) Fungal enzymic activity degrading 1,4- $\alpha$ -D-glucans to ascopyrones P and T in *Pezizales* and *Tuberales*. Phytochemistry 33: 41-45

**Bellamacina, C. R.** (1996) The nicotinamide dinucleotide binding motif: A comparison of nucleotide binding proteins. FASEB J. 10: 1257-1269

**Bergmeyer, H. U. und Gawehn, K.** (1977) Grundlagen der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie

**Berman, T. und Magasanik, B.** (1966a) The pathway of myo-inositol degradation in *Aerobacter aerogenes*. Dehydrogenation and dehydration. J. Biol. Chem. 241: 800-806

**Berman, T. und Magasanik, B.** (1966b) The pathway of myo-inositol degradation in *Aerobacter aerogenes*. Ring scission. J. Biol. Chem. 241: 807-813

**Bernhardt, R.** (1996) Cytochrome P450: Structure, function, and generation of reactive oxygen species. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 127: 137-221

**Bernhardt, R.** (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. J. Biotech. 124: 128-145

**Birnboim, H. C.** (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol. 100: 243-255

**Black, S.M.; Harikrishna, J.A.; Szklarz, G.D.; Miller, W.L.** (1994) The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, cytochrome P450<sub>sc</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 7247-7251

**Boeyens, J. C. A.; Marais, J. L. C.; Perold, G. W.** (1982) The occurrence, conformation and crystal structure of 1,5-anhydro-D-glucitol in *Protea* spp. *Phytochemistry* 99: 1959-1960

**Bojsen, K.; Yu, S.; Kragh, K. M.; Marcussen, J.** (1999) A group of  $\alpha$ -1,4-glucan lyases and their genes from the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: purification, cloning, and heterologous expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1430: 396-402

**Bojsen, K.; Yu, S.; Marcussen, J.** (1999) A group of  $\alpha$ -1,4-glucan lyase genes from the fungi *Morchella costata*, *M. vulgaris* and *Peziza ostracoderma*. Cloning, complete sequencing and heterologous expression. *Plant Molec. Biol.* 40: 445-454

**Borsig, L.; Berger, E. G.; Malissard, M.** (1997) Expression and purification of His-tagged beta-1,4-galactosyltransferase in yeast and in COS cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 586-589

**Bowie, J. U. und Gray, G. R.** (1984) Synthesis and mass spectra of the partially methylated and partially ethylated anhydro-D-mannitol acetates derived by reductive cleavage of permethylated and perethylated *Saccharomyces cerevisiae* D-mannans. *Carbohydr. Res.* 129: 87-97

**Brill, W. J.** (1975) Regulation and genetics of bacterial nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.* 29: 109-129

**Broberg, A.; Kenne, L.; Pedersen, M.** (1999) Analysis of 1,5-anhydro-D-fructose, microthecin, and 4-Deoxy-hexo-2,3-diulose in algae using gas chromatography – mass spectrometry in selected ion monitoring mode. *Anal. Biochem.* 268: 35-42

**Brown, T. A.** (1999) *Gentechnologie für Einsteiger*. 2 ed., Spektrum Akademischer Verlag.

**Brown, C. M. und Dilworth, M. J.** (1975) Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 86: 39-48

**Buchter-Larsen, A. Morgan, A. J.; Yu, S.** (2003) Ascopyrone synthase, 1,5-anhydro-D-fructose-dehydratase, process. US Pat. Appl. 20030187064

**Burkardt, B.; Schillik, D.; Pühler, A.** (1987) Physical characterization of *Rhizobium meliloti* megaplasmids. *Plasmid* 17:13-25

**Burnell, J. N. und Holmes, R. S.** (1983) Purification and properties of sorbitol dehydrogenase from mouse liver. *Int. J. Biochem.* 15: 507-511

**Buse, J. B.; Freeman, J. L.; Edelman, S. V.; Jovanovic, L.; McGill, J. B.** (2003) Serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark): a short-term glycemic marker. *Diabetes Technol. Ther.* 5: 355-363

**Cao, P.; Bülow, H.; Dumas, B.; Bernhardt, R.** (2000) Construction and characterization of a catalytic fusion protein system: P-450<sub>11β</sub>-adrenodoxin reductase-adrenodoxin. *Biochim. Biophys. Acta* 1476: 253-264

**Capela, D.; Barloy-Hubler, F.; Gouzy, J.; Bothe, G.; AmpeBecker, A.; Boutry, M.; Cadieu, E.; Dreano, S.; Gloux, S.; Godrie, T.; Goffeau, A.; Kahn, D.; Kiss, E.; Lelaure, V.; Masuy, D.; Pohl, T.; Portetelle, D.; Pühler, A.; Purnelle, B.; Ramsperger, U.; Renard, C.; Thebault, P.; Vandenberg, M.; Weidner, S.; Galibert, F.** (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *PNAS* 98: 9877-9882

**Chakrabarty, A. M.** (1972) Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 112: 815-823

**Chakrabarty, A. M.; Chou, G.; Gunsalus, I. C.** (1973) Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 1137-1140

**Chao, T. C.; Becker, A.; Buhrmester, J.; Pühler, A.; Weidner, S.** (2004) The *Sinorhizobium meliloti fur* gene regulates, with dependence on Mn(II), transcription of the *sitABCD* operon, encoding a metal-type transport. *J. Bacteriol.* 186: 3609-3620

**Chase T., Jr.** (1986) Mannitol-1-phosphate dehydrogenase of *E. coli*. Chemical properties and binding of substrates. *Biochem. J.* 239: 435-443

**Chen, B. P. und Hai, T.** (1994) Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene* 139: 73-75

**Cottens, S.** (2004) Pharmaceutical compositions. US Pat. Appl. 20040006012

**Daiber, A.; Shoun, H.; Ullrich, V.** (2005) Nitric oxide reductase (P450<sub>nor</sub>) from *Fusarium oxysporum*. *J. Inorg. Biochem.* 99: 185-193

**Dambe, T.R.; Kühn, A.M.; Brossette, T.; Giffhorn, F.; Scheidig, A.J.** (2006) Crystal structure of NADP(H)-Dependent 1,5-anhydro-D-fructose reductase from *Sinorhizobium morrelense* at 2.2 Å resolution: construction of a NADH-accepting mutant and its application in rare sugar synthesis. *Biochemistry.* 45: 10030-10042

**Danneel, H. J.; Rossner, E.; Zeeck, A.; Giffhorn, F.** (1993) Purification and characterisation of a pyranose oxidase from the basidiomycete *Peniophora gigantea* and chemical analysis of its reaction products. Eur. J. Biochem. 214: 795-802

**Deffieux, G.; Baute, R.; Baute, M. A.; Atfani, M.; Carpy, A.** (1986) 1,5-Anhydrofructose, the precursor of the pyrone microthecin in *Morchella vulgaris*. Phytochemistry 26: 1391-1393

**Degtyarenko, K.N.; Archakov, A.I.** (1993) Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. FEBS Lett. 332: 1-8

**Delves, C. J.; Ballantine, S. P.; Tansik, R. L.; Baccanari, D. P.; Stammers, D. K.** (1993) Refolding of recombinant *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase and characterization of the enzyme. Protein Expr. Purif. 4: 16-23

**De Mot, R. und Parret, A. H.** (2002) A novel class of self-sufficient cytochrome P450 monooxygenases in prokaryotes. Trends Microbiol. 10: 502-508

**Dietrich, M.; Eiben, S.; Asta, Ch.; Ahn Do, T.; Pleiss, J.; Urlacher, V. B.** (2008) Cloning, expression and characterization of CYP102A7, a self-sufficient P450 monooxygenase from *Bacillus licheniformis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79: 931-940

**Doten, R. C. und Mortlock, R. P.** (1985) Inducible xylitol dehydrogenases in enteric bacteria. J. Bacteriol. 162: 845-848

**Elsser, D.; Morgan, A. J.; Yu, S.; Thomas, L. V.** (2003) Ascopyrone: Antimicrobial agent. US Pat. Appl. 20030203963

**Elvebak, L. E.; Cha, H. J.; McNally, P.; Gray, G. R.** (1995) Authentic standards for the reductive-cleavage method. The positional isomers of partially methylated and acetylated or benzoylated 1,5-anhydro-D-mannitol. Carbohydr. Res. 274: 71-83

**Emerich, D. W.; Ruiz-Argueso, T.; Ching, T. M.; Evans, H. J.** (1979) Hydrogen-dependent nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. 137: 153-160

**Entner, N. und Doudoroff, M. M.** (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. J. Biol. Chem. 196: 853-862

**Estabrook, R.** (1999) An introduction to the cytochrome P450s. Mol. Aspects Med. 20: 5-137

**Feiters, M. C. und Jeffery, J.** (1989) Zinc environment in sheep liver sorbitol dehydrogenase. Biochemistry 28: 7257-7262

**Finan, T. M.; Weidner, S.; Wong, K.; Buhrmester, J.; Chain, P.; Vorholter, F. J.; Hernandez-Lucas, I.; Becker, A. und andere** (2001) The complete sequence of the 1,683 kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 9889-9894

**Finlay, B. B. und Falkow, S.** (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 136-169

**Fletcher, H. G. und Diehl, H. W.** (1952) The preparation of 1,5-anhydro-D-mannitol (styracitol) from D-mannitol. J. Am. Chem. Soc. 74: 3175-3176

**Fontaine, L.; Meynial-Salles, I.; Girbal, L.; Yang, X.; Croux, C.; Soucaille, P.** (2002) Molecular characterization and transcriptional analysis of adhE2, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. J. Bacteriol. 184: 821-830

**Frandsen, T. P. und Svensson, B.** (1998) Plant  $\alpha$ -glucosidases of the glycoside hydrolase family 31. Molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. Plant Mol. Biol. 37: 1-13

**Freimund, S. und Köpper, S.** (2004) The composition of 2-keto aldoses in organic solvents as determined by NMR spectroscopy. Carbohydr. Res. 339: 217-220

**Freimund, S.; Huwig, A.; Giffhorn, F.; Köpper, S.** (1998) Rare keto-aldoses from enzymatic oxidation: substrates and oxidation products of pyranose-2-oxidase. Chem. Eur. J. 4: 2442-2455

**Freudenberg, W. und Felton, G. E.** (1932) Studies on carbohydrate metabolism II. The rate of metabolism of d-2-oxyglucal and styracitol in the rabbit. J. Biol. Chem. 99: 657-662

**Fry, J.; Wood, M.; Poole, P. S.** (2001) Investigation of myo-inositol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and its effect on nodulation competitiveness. Mol. Plant Microbe Interact. 14:1016-1025

**Gabriel, J.; Volc, J.; Sedmera, P.; Daniel, G.; Kubatova, E.** (1993) Pyranose dehydratase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: improved purification, and identification of 6-desoxy-D-glucosone and D-xylosone reaction products. Arch. Microbiol. 160: 27-34

**Galibert, F.; Finan, T. M.; Long, S. R.; Puhler, A.; Abola, P.; Ampe, F.; Barloy-Hubler, F.; Barnett, M. J. und andere** (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Science 293: 668-672

**Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Ferrari, E., Hoch, J. A.** (1983): Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. **153**: 1424-1431

**Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Wood, W. A.; Krieg, N. R.** (1994) Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Massachusetts

**Giffhorn, F.** (2000) Fungal pyranose oxidases: occurrence, properties and biotechnical applications in carbohydrate chemistry. Appl. Microbiol. Biotechnol. **54**: 727-740

**Giffhorn, F.; Köpper, S.; Huwig, A.; Freimund, S.** (2000) Rare sugars and sugar-based synthons by chemo-enzymatic synthesis. Enzyme Microb. Technol. **27**: 734-742

**Glumer, A. und Yu, S.** (2004) Synthesis of copolymers containing anhydrofructose derivatives. Eur. Pat. NZ515755

**Gotoh, O.** (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding sequences. J. Biol. Chem. **267**: 83-90

**Grechkin, A.N.** (2002) Hydroperoxide lyase and divinyl ether synthase. Prostaglandins Other Lipid Mediat. **68–69**: 457–470.

**Guengerich, F.P.** (2004) Cytochrome P450: what have we learned and what are the future issues? Drug Metab. Rev. **36**: 159-197

**Gunsalus, I.C. und Sligar, S.G.** (1978) Oxygen reduction by the P450 monooxygenase systems. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. **47**: 1-44

**Gussow, D. und Clackson, T.** (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. **17**: 4000

**Hadley, R. G.; Eaglesham, A. R.; Szalay, A. A.** (1983) Conservation of DNA regions adjacent to *nifKDH* homologous sequences in diverse slow-growing *Rhizobium* strains. J. Mol. Appl. Genet. **2**: 225-236

**Halliwell, C. M.; Morgan, G.; Ou, C. P.; Cass, A. E.** (2001) Introduction of a (poly)histidine tag in L-lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules. Anal. Biochem. **295**: 257-261

**Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580

**Hanahan, D.; Jessee, J.; Bloom, F. R.** (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. Methods Enzymol. 204: 63-113

**Hannemann, F.; Bichet, A.; Ewen, K.M.; Bernhardt, R.** (2007) Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains. Biochim. Biophys. Acta 1770: 330-344

**Harikrishna, J.A.; Black, S.M.; Szklarz, G.D.; Miller, W.L.** (1993) The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, cytochrome P450<sub>scc</sub>. DNA Cell Biol. 12: 371-379

**Hartree, E. F.** (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal. Biochem. 48: 422-427

**Hasegawa, A.** (1991) 1,5-Anhydroglucitol analogue. Eur. Pat. JP19900044365

**Hawkes, D. B.; Adams, G. W.; Burlingame, A. L.; Ortiz de Montellano, P. R.; De Voss, J. J.** (2002) Cytochrome P450(cin) (CYP176A), isolation, expression, and characterization. J. Biol. Chem. 277: 27725-27732

**Hayano, K. und Fukui, S.** (1967) Purification and properties of 3-ketosucrose-forming enzyme from the cells of *Agrobacterium tumefaciens*. J. Biol. Chem. 242: 3655-3672

**He, X. M. und Liu, H. W.** (2002) Formation of unusual sugars: mechanistic studies and biosynthetic applications. Annu. Rev. Biochem. 71: 701-754

**Hlavica, P.** (1984) On the function of cytochrome b<sub>5</sub> in the cytochrome P450-dependent oxygenase system. Arch. Biochem. Biophys. 228: 600-608

**Hossain, N.; Rozenski, J.; De Clercq, E.; Herdewijn, P.** (1997) Synthesis and antiviral activity of the  $\alpha$ -analogues of 1,5-anhydrohexitol nucleosides (1,5-anhydro-2,3-dideoxy-D-ribohexitol nucleosides). J. Org. Chem. 62: 2442-2447

**Huang, Y.; Fritsch, P. W.; Shi, S. S.** (2003) A revision of the imbricate group of *Styrax* series *cyrta* (*Styracaceae*) in Asia. Annals. Of the Missouri Botanical Garden 90: 491-553

**Hummel, W.** (1997) New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. Adv. Biochem. Eng Biotechnol. 58: 145-184



**Hunter, D. J.; Roberts, G. A.; Ost, T. W.; White, J. H.; Muller, S.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L.; Chapman, S. K.** (2005) Analysis of the domain properties of the novel cytochrome P450 RhF. *FEBS Lett.* 579: 2215-2220

**Huwig, A.; Danneel, H. J.; Giffhorn, F.** (1994) Laboratory procedures for producing 2-keto-D-glucose, 2-keto-D-xylose and 5-keto-D-fructose from D-glucose, D-xylose and L-sorbose with immobilized pyranose oxidase of *Peniophora gigantea*. *J. Biotechnol.* 33: 309-315

**Hynes, M. F.; Simon, R.; Müller, P.; Niehaus, K.; Labes, M.; Pühler, A.** (1986) The two megaplasmids of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. *Mol. Gen. Genet.* 202: 356-362

**Ingelman-Sundberg, M. und Johansson, I.** (1980) Cytochrome b5 as electron donor to rabbit liver Cytochrome P-450LM2 in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 582-586

**Inoue, T.; Sunagawa, M.; Mori, A.; Imai, C.; Fukuda, M.; Takagi, M.; Yano, K.** (1989) Cloning and sequencing of the gene encoding the 72 kDa dehydrogenase subunit of alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.* 171: 3115-3122

**Jackson, C. J.; Lamb, D. C.; Marczylo, T. H.; Warrilow, A. G.; Manning, N. J.; Lowe, D. J.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L.** (2002) A novel sterol 14 $\alpha$ -demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily. *J. Biol. Chem.* 277: 46959-46965

**Jäger, W., Schäfer, A., Kalinowski, J., Pühler, A.** (1995): Isolation of insertion elements from Gram-positive *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Rhodococcus* strains used in the *Bacillus subtilis sacB* gene as a positive selection marker, *FEMS Microbiol. Lett.* 126: 1-6

**Jeziore-Sassoon, Y.; Hamblin, P. A.; Bootle-Wilbraham, C. A.; Poole, P. S.; Armitage, J. P.** (1998) Metabolism is required for chemotaxis to sugars in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* 144 (Pt1) 229-239

**Johnson, D. A. und Liu, H. W.** (1998) Mechanisms and pathways from recent deoxy-sugar biosynthesis research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 642-649

**Jordan, D. C. und Allen, O.** (1974) Genus I. *Rhizobium*. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 262-264

**Jornvall, H.; Persson, M.; Jeffery, J.** (1981) Alcohol and polyol dehydrogenases are both divided into two protein types, and structural properties cross-relate the

different enzyme activities within each type. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 78: 4226-4230

**Jornvall, H.; Persson, M.; Krook, M.; Atrian, S.; Gonzalezduarte, R.; Jeffery, J.; Ghosh, D.** (1995) Short-chain dehydrogenases reductases (Sdr). Biochemistry 34: 6003-6013

**Junichi, A. und Hideto, I.** (2003) Bacterial growth regulators or inhibitors with the use of 1,5-D-anhydrofructose. US Pat. Appl. 2003161862

**Kametani, S. und Akanuma, H.** (1997) Glycogenolysis through lyase reaction and 1,5-anhydroglucitol. Seikagaku 69: 1361-1372

**Kametani, S.; Shiga, Y.; Akanuma, H.** (1996) Hepatic production of 1,5-anhydrofructose and 1,5-anhydroglucitol in rat by third glycogenolytic pathway. Eur. J. Biochem. 242: 832-838

**Kanagasundaram, V. und Scopes, R. K.** (1992) Cloning, sequence analysis, and expression of the structural gene encoding glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 174: 1439-1447

**Kanemoto, R. H.; Powell, A. T.; Akiyoshi, D. E.; Regier, D. A.; Kerstetter, R. A.; Nester, E. W.; Hawes, M. C.; Gordon, M. P.** (1989) Nucleotide sequence and analysis of the plant-inducible locus *pinF* from *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bacteriol. 171: 2506-2512

**Kaslow, D. C. und Shiloach, J.** (1994) Production, purification and immunogenicity of a malaria transmission-blocking vaccine candidate. TBV25H expressed in yeast and purified using nickel-NTA agarose. Biotechnology (N. Y.) 12: 494-499

**Keister, D. L.; Tully, R. E.; Van Berkum, P.** (1999) A cytochrome P450 gene cluster in the *Rhizobiaceae*. J. Gen. Appl. Microbiol. 45: 301-303

**Kelly, S. L.; Lamb, D. C.; Jackson, C. J.; Warrilow, A. G. S.; Kelly, D. E.** (2003) The biodiversity of microbial cytochromes P450. Adv. Microb. Physiol. 47:131-86.

**Kenkou, M. und Mami, F.** (2003) Process for producing food having good keeping qualities and food keeping agents. US Pat. Appl. 2003152676

**Kessler, R. J. und Fanestil, D. D.** (1986) Interference by lipids in the determination of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 159: 138-142

**Kingston, R. L.; Scopes, R. K.; Baker, E. N.** (1996) The structure of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NADP. Structure 4: 1413-1428

**Kizawa, H.; Tomura, D.; Oda, M.; Fukamizu, A.; Hoshino, T.; Gotoh, O.; Yasui, T.; Shoun, H.** (1991) Nucleotide sequence of the unique nitrate/nitrite-inducible cytochrome P450 cDNA from *Fusarium oxysporum*. J. Biol. Chem. 266: 10632-10637

**Knowler, W. C.** (1994) Screening for NIDDM. Opportunities for detection, treatment, and prevention. Diabetes Care 17: 445-450

**Konishi, Y.; Hashima, K.; Kishida, K.** (2000) Increases in 1,5-anhydroglucitol levels in germinating amaranth seeds and in ripening banana. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 2462-2465

**Koutz, P.; Davis, G. R.; Stillman, C.; Barringer, K.; Cregg, J.; Thill, G.** (1989) Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. Yeast 5: 167-177

**Kozak M.** (1983) Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. Microbiol. Rev. 47: 1-45

**Kudo T.; Tomura, D.; Liu, D.L.; Dai, X.Q.; Shoun, H.** (1996) Two isozymes of P450nor of *Cylindrocarpum tonkinense*: molecular cloning of the cDNAs and genes, expressions in the yeast, and the putative NAD(P)H-binding site. Biochimie 78: 792–799

**Kühn, A.** (2004) Dissertation. Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Deutschland

**Kühn, A.; Yu, S.; Giffhorn, F.** (2006) Catabolism of 1,5-anhydro-D-fructose in *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5: discovery, characterisation, and overexpression of a new 1,5-anhydro-D-fructose reductase and its application in sugar analysis and rare sugar synthesis. Appl. Env. Microbiol. 72: 1248-1257

**Kuznetsov, V.Y.; Blair, E.; Farmer, P.J.; Poulos, T.L.; Pifferitti, A.; Sevrioukova I.F.** (2005) The putidaredoxin reductase-putidaredoxin electron transfer complex. J. Biol. Chem. 280: 16135-16142

**Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

**Labout, J. J. M.** (1985) Conversion of liquefied starch into glucose using a novel glucoamylase. Stärke 37: 157-161

**Lambeth, J. D.** (1991) Enzymology of mitochondrial side-chain cleavage by cytochrome P-450scc. Frontiers in Biotransformation 58-100

**Lamed, R. und Zeikus, J. G.** (1980) Glucose fermentation pathway of *Thermoanaerobium brockii*. J. Bacteriol. 141: 1251-1257

**Lamed, R. und Zeikus, J. G.** (1981) Novel NADP-linked alcohol-aldehyde/ketone oxidoreductase in thermophilic ethanologenic bacteria. Biochem. J. 195: 183-190

**Lammers, P. J.; McLaughlin, S.; Papin, S.; Trujillo-Provencio, C.; Ryncarz, J.** (1990) Developmental rearrangement of cyanobacterial *nif* genes: nucleotide sequence, open reading frames, and cytochrome P450 homology of the *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *nifD* element. J. Bacteriol. 172: 6981-6990

**Landfald, B. und Strom, A. R.** (1986) Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 165: 849-855

**Lee, S. S.; Yu, S.; Withers, S. G.** (2003) Detailed dissection of a new mechanism for glycoside cleavage:  $\alpha$ -1,4-glucan lyase. Biochemistry 42: 13081-13090

**Leitner, C.; Volc, J.; Haltrich, D.** (2001b) Purification and characterization of pyranose oxidase from the white rot fungus *Trametes multicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3636-3644

**Le Rudulier, D.; Bernard, T.; Goas, G.; Hamelin, J.** (1984) Osmoregulation in *Klebsiella pneumoniae*: enhancement of anaerobic growth and nitrogen fixation under stress by proline betaine, gamma-butyrobetaine, and other related compounds. Can. J. Microbiol. 30: 299-305

**Le Rudulier, D. und Bouillard, L.** (1983) Glycin betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the *Enterobacteriaceae*. Appl. Environ. Microbiol. 46: 152-159

**Lichtenhaler, F. W.; El Ashry, E. S. H.; Göckel, V. H.** (1980) Sugar enolones, XIV. A convenient access to 1,5-anhydroketoses. Tetrahedron Lett. 21: 1429-1432

**Loos, H.; Kramer, R.; Sahm, H.; Sprenger, G. A.** (1994) Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentration of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. J. Bacteriol. 176: 7688-7693

**Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J.** (2001) Brock Microbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

**Mallinder, P. R.; Pritchard, A.; Moir, A.** (1992) Cloning and characterization of a gene from *Bacillus stearothermophilus* var. non-diastaticus encoding a glycerol dehydrogenase. Gene 110: 9-16

**Mansuy, D.** (1998) The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol.* 121: 5-14

**Maret, W. und Auld, D. S.** (1988) Purification and characterization of human liver sorbitol dehydrogenase. *Biochemistry* 27: 1622-1628

**Martinez-de Drets, G. und Arias, A.** (1972) Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 103: 97-103

**Martinez-de Drets, G.; Arias, A.; Rovira, d. C.** (1974) Fast- and slow-growing *Rhizobia*: differences in sucrose utilization and invertase activity. *Can. J. Microbiol.* 20: 605-609

**Masamitsu, F. und Junichi, A.** (2002) Use of 1,5-D-anhydrofructose as food color. *Eur. Pat.* JP2002027945

**McLean, K.J.; Sabri, M.; Marshall, K.R.; Lawson, R.J.; Lewis, D.G.; Clift, D.; Balding, P.R.; Dunford, A.J.; Warman, A.J.; McVey, J.P.; Quinn, A.M.; Sutcliffe, M.J.; Scrutton, N.S.; Munro, A.W.** (2005) Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 796-801

**Measures, J. C.** (1975) Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* 257: 398-400

**Mehareenna, Y. T.; Li, H.; Hawkes, D. B.; Pearson, A. G.; De Voss, J. J.; Poulos, T. L.** (2004) Crystal structure of P450cin in complex with its substrate, 1,8-cineole, a close structural homologue to D-camphor, the substrate for P450cam. *Biochemistry* 43: 9487-9494

**Mei, J.; Yu, S.; Ahren, B.** (2005) A 90-day toxicological evaluation of 1,5-anhydro-D-fructose in Sprague-Dawley rats. *Drug Chem. Toxicol.* 28 (3): 263-272

**Meyers, J. A.; Sanchez, D.; Elwell, L. P.; Falkow, S.** (1976) Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127: 1529-1537

**Miura, Y. und Fulco, A. J.** (1974) ( $\Omega$ -2) hydroxylation of fatty acids by a soluble system from *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* 249: 1880-1888

**Mo, H.; Winter, H. C.; Van Damme, E. J.; Peumans, W. J.; Misaki, A.; Goldstein, I. J.** (2001) Carbohydrate binding properties of banana (*Musa acuminata*) lectin I. Novel recognition of internal  $\alpha$ -1,3-linked glucosyl residues. *Eur. J. Biochem.* 268: 2609-2615

- Morgan, A. J. und Yu, S.** (2003) Process Ascopyrone. US Pat. Appl. 2003232417
- Mortlock, R. P.** (1976) Catabolism of unnatural carbohydrates by microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 13: 1-53
- Nakamura, T.; Naito, A.; Takahashi, Y.; Akanuma, H.** (1986) Oxidation of 1,5-anhydro-D-glucitol to 1,5-anhydro-D-fructose catalysed by an enzyme from bacterial membranes. *J. Biochem.* 99: 607-613.
- Nimmegern, E.; Black, J.; Futer, O.; Fulghum, J. R.; Chambers, S. P.; Brummel, C. L.; Raybuck, S. A.; Sintchak, M. D.** (1999) Biochemical analysis of the modular enzyme inosine 5-monophosphate dehydrogenase. *Protein Expr. Purif.* 17: 282-289
- Nishii, K.; Sato, S.; Nakamura, K.** (1990) Jap. Pat. 268679-A
- Omura, T. und Sato, R.** (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *Biol. Chem.* 239: 2379-2385
- Oestergaard, J. und Knudsen, S. L.** (1976) Use of sweetenzyme in industrial continuous isomerization. Various process alternatives and corresponding product types. *Stärke* 28: 350-356
- Parke, D. und Ornston, L. N.** (1986) Enzymes of the beta-ketoadipate pathway are inducible in *Rhizobium* and *Arobacterium* spp. and constitutive in *Bradyrhizobium* spp. *J. Bacteriol.* 165: 288-292
- Parniske, M.** (2000) Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 320-328
- Paulsen, I. T.; Seshadri, R.; Nelson, K. E.; Eisen, J. A.; Heidelberg, J. F.; Read, T. D.; Dodson, R. J.; Umayam, L. und andere** (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99: 13148-13153
- Peterson, J.A.; Lorence, M.C.; Amarneh, B.** (1990) Putidaredoxin reductase and Putidaredoxin – cloning, sequence determination and heterologous expression of the proteins. *J. Biotech. Chem.* 265: 6066-6073
- Pfennig, N.** (1965) Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien. *Zbl. Abt., I. Abt. Orig. Suppl.* 1: 179-189

- Pfennig, N. und Lippert, K. D.** (1966) Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Microbiol.* 55: 245-256
- Philippsen, A.; Schirmer, T.; Stein, M. A.; Giffhorn, F.; Stetefeld, J.** (2005) Structure of zink-independent sorbitol-dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.4Å resolution. *Acta Cryst D.* 61(Pt 4):374-379
- Pire, C.; Esclapez, J.; Ferrer, J.; Bonete, M. J.** (2001) Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. *FEMS Microbiol. Lett.* 200: 221-227
- Pitkänen, E.** (1973) Occurrence of 1,5-anhydroglucitol in human cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta* 48: 159-166
- Pitkänen E.** (1990) 1,5-anhydro-D-glucitol – a novel type of sugar in the human organism. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 201: 55-62
- Pitkänen, E. und Pitkänen, O. M.** (1990) Plasma 1,5-anhydroglucitol in experimental galactosemia in the rat. *Experientia* 46: 85-87
- Pitkänen, E.; Pitkänen, O.M.** (1992) Renal tubular reabsorption of 1,5-anhydro-D-glucitol and D-mannose in vivo in the rat. *Eur. J. Physiol.* 420: 367-375
- Povolo, S. und Casella, S.** (2000) A critical role for aniA in energy-carbon flux and symbiotic nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti*. *Arch. Microbiol.* 174: 42-49
- Puchkaev, A. V.; Wakagi, T.; Ortiz de Montellano, P. R.** (2002) CYP119 plus a *Sulfolobus tokodaii* strain 7 ferredoxin and 2-oxoacid: ferredoxin oxidoreductase constitute a high-temperature cytochrome P450 catalytic system. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 12682-12683
- Rank, K. B.; Mildner, A. M.; Leone, J. W.; Koeplinger, K. A.; Chou, K. C.; Tomasselli, A. G.; Heinrikson, R. L.; Sharma, S. K.** (2001) [W206R]-procaspase 3: an inactivatable substrate for caspase 8. *Protein Expr. Purif.* 22: 258-266
- Redinbaugh, M. G. und Turley, R. B.** (1986) Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal. Biochem.* 153: 267-271
- Refdahl, C. und Morgan, A. J.** (2003) Ascopyrone P synthase. US Pat. Appl. 2003170832

**Rehg, J. E. und Torack, R. M.** (1977) Partial purification and characterization of sorbitol dehydrogenase from rat brain. *J. Neurochem.* 28: 655-660

**Reid, M. F. und Fewson, C. A.** (1994) Molecular characterisation of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.* 20: 13-56

**Roberts, G. A.; Celik, A.; Hunter, D. J.; Ost, T. W.; White, J. H.; Chapman, S. K., Turner, N. J.; Flitsch, S. L.** (2003) A self-sufficient cytochrome P450 with a primary structural organization that includes a flavin domain and a [Fe-2S] redox center. *J. Biol. Chem.* 278: 48914-48920

**Rylott, E. L.; Jackson, R. G.; Edwards, J.; Womack, G. L.; Seth-Smith, H. M.; Rathbone, D. A.; Strand, S. E.; Bruce, N. C.** (2006) An explosive- degrading cytochrome P450 activity and its targeted application for the phytoremediation of RDX. *Nat. Biotechnol.* 24: 216-219

**Saito, Y.; Ishii, Y.; Hayashi, H.; Imao, Y.; Akashi, T.; Yoshikawa, K.; Noguchi, Y.; Soeda, S. und andere** (1997) Cloning of genes coding for L-sorbose and L-sorbose dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and microbial production of 2-keto-L-gulonate, a precursor of L-ascorbic acid, in recombinant *G. oxydans* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 454-460

**Sakai, Y. und Tani, Y.** (1992) Cloning and sequencing of the alcohol oxidase-encoding gene (AOD1) from formaldehyde-producing asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii* S2. *Gene*: 114: 67-73

**Sakuma, M.; Kametani, S.; Akanuma, H.** (1998) Purification and some properties of a hepatic NADPH-dependent reductase that specifically acts on 1,5-anhydro-D-fructose. *J. Biochem. (Tokyo)* 123: 189-193

**Sakuma, M.; Kubota, S.** (2008) Mouse AKR1E1 is an ortholog of pig liver NADPH dependent 1,5-anhydro-D-fructose reductase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 1-5

**Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

**Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74: 5463-5467

**Sawada, H.; Kuykendall, L. D.; Young, J. M.** (2003) Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49: 155-179



**Sawada, N.; Sakaki, T.; Yoneda, S.; Kusudo, T.; Shinkyō, R.; Ohta, M.; Inouye, K.** (2004) Conversion of vitamin D3 to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 by *Streptomyces griseolus* cytochrome P450SU-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320: 156–164.

**Schäffer, A. J.; Amundsen, S. K.; Jones, J. M.** (1980) Effect of carbohydrates on adherence of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. *Infect. Immun.* 30: 531-537

**Schäfer, A.; Tauch, A.; Jäger, W.; Kalinowski, J.; Thierbach, G.; Pühler, A.** (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from *Escherichia coli* plasmids pK18 und pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145: 69-73

**Schauder, S.; Schneider, K. H.; Giffhorn, F.** (1995) Polyol metabolism of *Rhodobacter sphaeroides*: biochemical characterisation of a short-chain sorbitol dehydrogenase. *Microbiology* 141 (Pt 8): 1857-1863

**Schenkman, J.B. und Jansson, I.** (2003) The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol. Ther.* 97: 139–152.

**Schiwara, H. W. und Domagk, G. F.** (1968) Degradation of deoxysugars by bacterial enzymes. V. Purification and characterisation of an NADP-dependent abequeose dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Hoppe Seylers. Z. Physiol. Chem.* 349: 1321-1329

**Schlöter, M.; Wiehe, W.; Assmus, B.; Steindl, H.; Becke, H.; Hoflich, G.; Hartmann, A.** (1997) Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2038-2046

**Schneider, K. H. und Giffhorn, F.** (1989) Purification and properties of a polyol dehydrogenase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur. J. Biochem.* 184: 15-19

**Schuerman, P. L.; Liu, J. S.; Mou, H.; Dandekar, A. M.** (1997) 3-Ketoglycoside-mediated metabolism of sucrose in *E. coli* as conferred by genes from *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 560-565

**Segovia, L.; Pinero, D.; Palacios, R.; Martinez-Romero, E.** (1991) Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 426-433

**Serizawa, N. und Matsuoka, A.** (1991) A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in prokaryote that catalyses hydroxylation of ML-236B to

pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1084: 35-40

**Servo, C. und Pitkänen, E.** (1975) Variation in polyol levels in cerebrospinal fluid and serum in diabetic patients. *Diabetologia* 11: 575-580

**Seth-Smith, H. M.; Rosser, S. J.; Basran, A.; Travis, E. R.; Dabbs, E. R.; Nicklin, S.; Bruce, N. C.** (2002) Cloning, sequencing, and characterization of the hexahydro-1,3,5-triazine degradation gene cluster from *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4764-4771

**Sevrioukova, I. F.; Garcia, C.; Li, H.; Bhaskar, B.; Poulos, L.** (2003) Crystal structure of Putidaredoxin, the [2Fe-2S] component of the P450<sub>cam</sub> monooxygenase system from *Pseudomonas putida*. *J. Mol. Biol.* 333: 377-392

**Sevrioukova, I. F.; Hazzard, J. T.; Tollin, G.; Poulos, T. L.** (2001) Laser flash induced electron transfer in P450<sub>cam</sub> monooxygenase: Putidaredoxin Reduktase – Putidaredoxin interaction. *Biochemistry* 40: 10592-10600

**Shaham, M.; Chakrabarty, A. M.; Gunsalus, I. C.** (1973) Camphor plasmid-mediated chromosomal transfer in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 116: 944-949

**Shiga, Y.; Kametani, S.; Mizuno, H.; Akanuma, H.** (1996) *Escherichia coli* phosphorylates 1,5-anhydroglucitol and releases 1,5-anhydroglucitol-6-phosphate when glucose is absent in the medium. *J. Biochem.* 119: 173-179

**Shiga, Y.; Mizuno, H.; Akanuma, H.** (1993) Conditional synthesis and utilization of 1,5-anhydroglucitol in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 7138-7141

**Shinjo, M.; Tazoe, M.; Hoshino, T.** (2002) NADPH-dependent L-sorbose reductase is responsible for L-sorbose assimilation in *Gluconobacter suboxydans* IFO 3291. *J. Bacteriol.* 184: 861-863

**Sibbesen, O.; De Voss, J.; Ortiz de Montellano, P.** (1996) Putidaredoxin reductase-putidaredoxin-cytochrome P450<sub>cam</sub> triple fusion protein. *J. Biol. Chem.* 271: 22462-22469

**Sinclair, M.I.; Maxwell, P.C.; Lyon, B.R.; Holloway, B.W.** (1986) Chromosomal location of TOL plasmid DNA in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 168: 1302-1308

**Smirnoff, N. und Wheeler, G. L.** (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35: 291-314

**Smith, L. T.; Pocard, J. A.; Bernard, T.; Le Rudulier, D.** (1988) Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 170: 3142-3149

**Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M. und andere** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 150: 76-85

**Sode, K.; Sugiura, H.; Tsugawa, W.; Watazu, Y.; Hamafuji, T.** (2000) Enzyme electrochemical preparation of a 3-keto derivative of 1,5-anhydro-D-glucitol using glucose-3-dehydrogenase. Appl. Biochem. Biotechnol. 84-86: 947-954

**Sono, M.; Roach, M.P.; Coulter E.D.; Dawson, J.H.** (1996) Heme-containing monooxygenases. Chem. Rev. 96: 2841-2888

**Stanley, J.; Brown, G. G.; Verma, D. P.** (1985) Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. J. Bacteriol. 163: 148-154

**Steup, M.** (1988) Starch degradation. S. 255-296. In Steup, M., The Biochemistry of Plants. 14, Academic Press, San Diego

**Stowers, M. D.** (1985) Carbon metabolism in *Rhizobium* species. Annu. Rev. Microbiol. 39: 89-108

**Suzuki, M.; Kametani, S.; Uchida, K.; Akanuma H.** (1996) Production of 1,5-anhydroglucitol from 1,5-anhydrofructose in erythroleukemia cells. J. Biochem. 240: 23-29

**Taguchi, T.; Haruna, M.; Okuda, J.** (1993) Effects of 1,5-anhydro-D-fructose on selected glucose-metabolizing enzymes. Biotechnol. Appl. Biochem. 18 (Pt 3): 275-283

**Takaya, N.; Suzuki, S.; Kuwazaki, S.; Shoun, H.; Maruo, F.; Yamaguchi, M.; Takeo, K.** (1999) Cytochrome P450nor, a novel class of mitochondrial cytochrome P450 involved in nitrate respiration in the fungus *Fusarium oxysporum*. Arch. Biochem. Biophys. 372: 340-346

**Takemura, H.; Kondo, K.; Horinouchi, S.; Beppu, T.** (1993) Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurianus*. J. Bacteriol. 175: 6857-6866

**Thomas, L. V.; Yu, S.; Ingram, R. E.; Refdahl, C.; Elsser, D.; Delves-Broughton, J.** (2002) Ascopyrone P, a novel antibacterial derived from fungi. J. Appl. Microbiol. 93: 697-705

**Tijet, N. und Brash, A.R.** (2002) Allene oxide synthases and allene oxides. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 68–69: 423–431.

**Trower, M.K.; Emptage, M.H.; Sariaslani, F.S.** (1990) Purification and characterization of a 7Fe ferredoxin from *Streptomyces griseus*. Biochim. Biophys. Acta 1037: 281–289.

**Trudgill, P.W.; DuBus, R.; Gunsalus, I.C.** (1966) A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. J. Biol. Chem. 241: 1194–1205

**Tsumoto, K.; Ejima, D.; Kumagai, I.; Arakawa, T.** (2003a) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. Protein Expr. Purif. 28: 1-8

**Tsumoto, K.; Umetsu, M.; Yamada, H.; Ito, T.; Misawa, S.; Kumagai, I.** (2003b) Immobilized oxidoreductase as an additive for refolding inclusion bodies: application to antibody fragments. Protein Eng. 16: 535-541

**Tsugawa, W.; Horiuchi, S.; Tanaka, M.; Wake, H.; Sode, K.** (1996) Purification of a marine bacterial glucose dehydrogenase from *Cytophaga marionoflava* and its application for measurement of 1,5-anhydro-D-glucitol. Appl. Biochem. Biotechnol. 56: 301-310

**Tully, R. E.; Van Berkum, P.; Lovins, K. W.; Keister, D. L.** (1998) Identification and sequencing of a P450 gene cluster from *Bradyrhizobium japonicum*. Biochim. Biophys. Acta 1398: 243-255

**Tully, R. E. und Keister, D. L.** (1993) Cloning and mutagenesis of a cytochrome P450 Locus from *Bradyrhizobium japonicum* that is expressed anaerobically and symbiotically. Appl. Env. Microbiol. 59: 4136-4142

**Ugalde, R. A.** (1999) Intracellular lifestyle of *Brucella* spp. Common genes with other animal pathogens, plant pathogens, and endosymbionts. Microbes. Infect. 1: 1211-1219

**Unger, B.P.; Gunsalus, I.C.; Sligar, S.G.** (1986) Nucleotide sequence of the *Pseudomonas putida* cytochrome P450<sub>cam</sub> gene and its expression in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 261: 1158-1163

**Urlacher, V. B.; Lutz-Wahl, S.; Schmid, R. D.** (2004) Microbial P450 enzymes in biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64: 317-325

**Usuda, K.; Toritsuka, N.; Matsuo, Y.; Kim, D. H.; Shoun, H.** (1995) Denitrification by the fungus *Cylindrocarpon tonkinense*: anaerobic cell growth and two isozyme

forms of cytochrome P-450nor. Appl. Environ. Microbiol. 61: 883–889

**Van Aerschot, A.** (2004) Alkylated hexitol nucleoside analogues and oligomers thereof. US Pat. Appl. 20040033367

**Van Beeumen, J. und De Ley, J.** (1968) Hexapyranoside: cytochrome oxidoreductase from *Agrobacterium tumefaciens*. Eur. J. Biochem. 6: 331-343

**Wang, L.-H. und Kulmacz, R.J.** (2002) Thromboxane synthase: structure and function of protein and gene. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 68–69: 409–422.

**Weber, K. und Osborn, M.** (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244: 4406-4412

**Wendt, U. K.; Wenderoth, I.; Tegeler, A.; Von Schaewen, A.** (2000) Molecular characterisation of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant J. 23: 723-733

**Werck-Reichhart, D.; Feyereisen, R.** (2000) Cytochromes P450: a success story . Genome Biol. 1 Reviews3003

**Werner, D.** (1987) Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen. 1st. ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart

**White, J. S. und Parke, W.** (1989) Fructose adds in variety to breakfast. Cereals Foods World 34: 392-398

**White, G. F.; Russel, N. J.; Tidswell, E. C.** (1996) Bacterial scission of ether bonds. Microbiol. Rev. 60: 216-232

**Wiechelman, K. J.; Braun, R. D.; Fitzpatrick, J. D.** (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for colour formation. Anal. Biochem. 175: 231-237

**Wiegert, T.; Sahn, H.; Sprenger, G. A.** (1997) The substitution of a single amino acid residue (Ser-116-->Asp) alters NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* into a glucose dehydrogenase with dual coenzyme specificity. J. Biol. Chem. 272: 13126-13133

**Witcoff, H. A. und Reuben, B. G.** (1996) Industrial organic chemicals. Wiley-Interscience

**Yamanouchi, T. und Akanuma, Y.** (1994) Serum 1,5-anhydroglucitol (1,5 AG): new clinical marker for glycemic control. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 24 Suppl: S261-S268

**Yamanouchi, T.; Inoue, T.; Ichiyanagi, K.; Sakai, T.; Ogata, N.** (2003) 1,5-Anhydroglucitol stimulates insulin release in insulinoma cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1623: 82-87

**Yamanouchi, T.; Inoue, T.; Ogata, E.; Kashiwabara, A.; Ogata, N.; Sekino, N.; Yoshimura, T.; Ichiyanagi, K.; Kawasaki, T.** (2001) Post-load glucose measurements in oral glucose tolerance tests correlate well with 1,5-anhydroglucitol, an indicator of overall glycaemic state, in subject with impaired glucose tolerance. *Clin. Sci.* 101: 227-233

**Yamanouchi, T.; Tachibana, Y.; Akanuma, H.; Minoda, S.; Shinohara, T.; Moromizato, H.; Miyashita, H.; Akaoka, I.** (1992) Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol in the human body. *Am. J. Physiol.* 263: E268-E273

**Yoshida, N.; Uchida, E.; Katsuragi, T.; Tani, Y.** (2003) A novel NAD-dependent dehydrogenase, highly specific for 1,5-anhydro-D-glucitol, from *Trichoderma longibrachiatum* strain 11-3. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 2603-2607

**Yu, S.** (2005) Enzymatic description of the anhydrofructose pathway of glycogen degradation II. Gene identification and characterisation of the reactions catalyzed by aldose-2-ulose dehydratase that converts 1,5-anhydro-D-fructose to microthecin with ascopyrone M as intermediate. *Biochim. Biophys. Acta* 1723: 63-73

**Yu, S.; Ahmad, T.; Kenne, L.; Pedersen, M.** (1995) A-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading enzyme. III. Substrate specificity, mode of action, and cleavage mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1244: 1-9

**Yu, S.; Bojsen, K.; Svensson, B.; Marcussen, J.** (1999)  $\alpha$ -1,4-glucan lyases producing 1,5-anhydro-D-fructose from starch and glycogen have sequence similarity to  $\alpha$ -glucosidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1433: 1-15

**Yu, S.; Christensen, T. M.; Kragh, K. M.; Bojsen, K.; Marcussen, J.** (1997) Efficient purification, characterization and partial amino acid sequencing of two  $\alpha$ -1,4-glucan lyases from fungi. *Biochim. Biophys. Acta* 1339: 311-320

**Yu, S. und Fiskesund, R.** (2006) The anhydrofructose pathway and its possible role in stress response and signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1760: 1314-1322

**Yu, S.; Kenne, L.; Pedersen, M.** (1993) A-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading enzyme. I. Efficient purification and characterization from red seaweeds. *Biochim. Biophys. Acta* 1156: 313-320

**Yu, S; Mei, J.; Ahren, B.** (2004a) Basic toxicology and metabolism studies of 1,5-anhydro-D-fructose using bacteria, cultured mammalian cells, and rodents. *Food and Chem. Tox.* 42: 1677-1686

**Yu, S. und Pedersen, M.** (1993) A-1,4-glucan lyase, a new class of starch/glycogen degrading-degrading enzyme. II. Subcellular localization and partial amino acid sequence. *Planta* 191: 137-142

**Yu, S. Pedersen, M.; Kenne, L.** (2004b) Glucan lyase producing 1,5-anhydrofructose. US Pat. Appl. 5695970

**Yu, S.; Refdahl, C.; Lundt, I.** (2004c) Enzymatic description of the anhydrofructose pathway of glycogen degradation; I. Identification and purification of anhydrofructose dehydratase, ascopyrone tautomerase and  $\alpha$ -1,4-glucan lyase in the fungus *Anthracobia melaloma*. *Biochim. Biophys. Acta* 1672: 120-129

**Zachariou, M. und Scopes, R. K.** (1986) Glucose-fructose oxidoreduktase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J. Bacteriol.* 167: 863-869

**Zehr, B. D.; Savin, T. J.; Hall, R. E.** (1989) A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 182: 157-159

**Zevenhuizen, L. P.** (1981) Cellular glycogen, beta-1,4-glucan, poly beta-hydroxybutyric acid and extracellular polysaccharides in fast-growing species of *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 47: 481-497

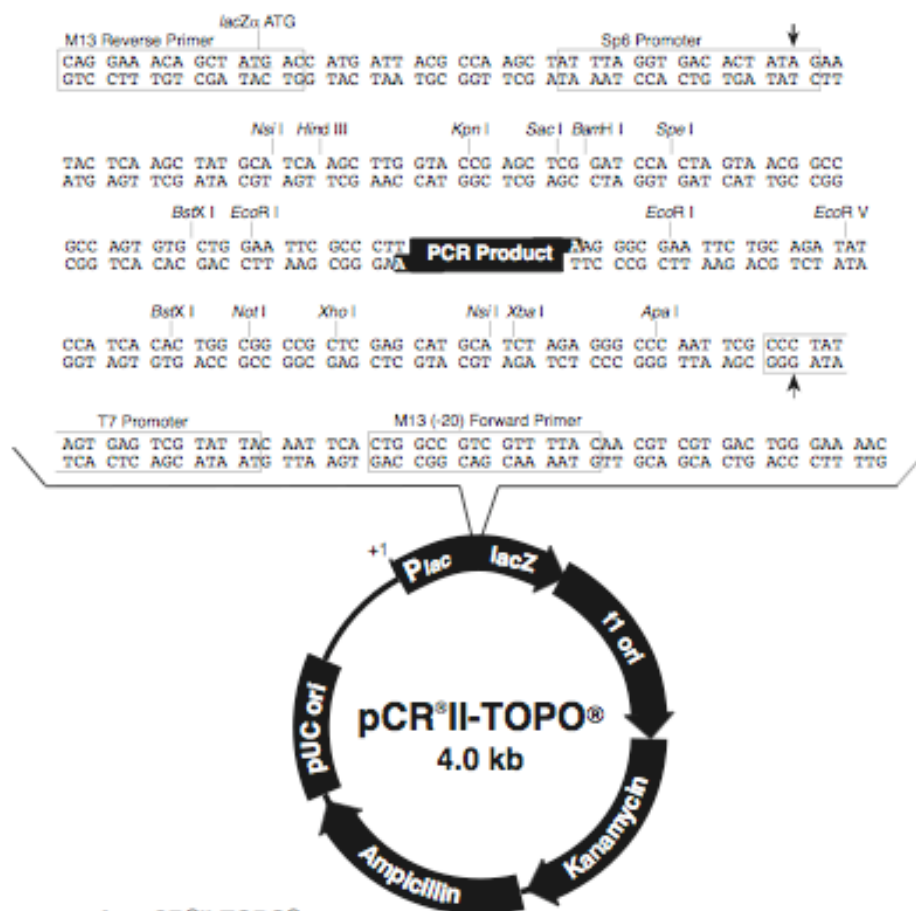
**Zhang, I.; Takaya, N.; Kitazume, T.; Shoun, H.** (2001) Purification and cDNA cloning of nitric oxide reductase cytochrome P450nor (CYP55A4) from *Trichosporon cutaneum*. *Eur. J. Biochem.* 268: 3198-3204

**Zhang, Q.; Iwasaki, T.; Wakagi, T.; Oshima, T.** (1996) 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase from the thermoacidophilic archaeon. *Sulfolobus* sp. strain 7. *J. Biochem. (Tokyo)* 120: 587-599.

## VIII Anhang

### 1 Verwendete Vektoren

#### 1.1 pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>-Vektor



Comments for pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>  
3973 nucleotides

*LacZ* $\alpha$  gene: bases 1-589  
M13 Reverse priming site: bases 205-221  
Sp6 promoter: bases 239-256  
Multiple Cloning Site: bases 269-383  
T7 promoter: bases 406-425  
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448  
f1 origin: bases 590-1027  
Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155  
Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033  
pUC origin: bases 3178-3851

Abbildung 51: Vektorkarte von pCR<sup>®</sup>II-TOPO (Invitrogen)



## 1.2 Expressionsvektor pET-24a(+)

### pET-24a(+) sequence landmarks

T7 promoter	311-327
T7 transcription start	310
T7*Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites ( <i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His*Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	714-1793
pBR322 origin	3227
Kan coding sequence	3936-4748
<i>f1</i> origin	4844-5299

The maps for pET-24b(+), pET-24c(+) and pET-24d(+) are the same as pET-24a(+) (shown) with the following exceptions: pET-24b(+) is a 5309bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-24c(+) is a 5308bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-24d(+) is a 5307bp plasmid; the *Bam*H I site is in the same reading frame as in pET-24c(+). An *Nco* I site is substituted for the *Nde* I site with a net 1bp deletion at position 238 of pET-24c(+). As a result, *Nco* I cuts pET24d(+) at 234, and *Nhe* I cuts at 229. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 239 in pET-24a(+). *Nde* I does not cut pET-24d(+). Note also that *Sty* I is not unique in pET-24d(+).

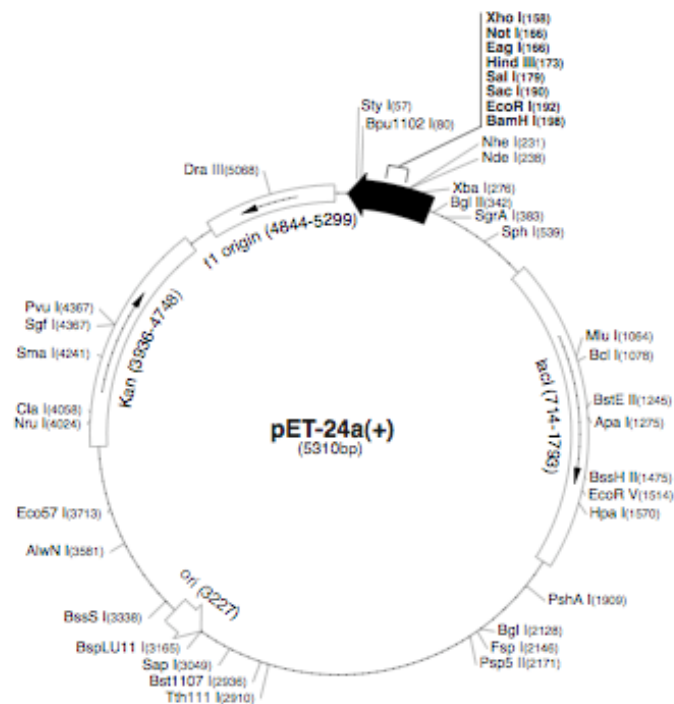


Abbildung 52: Vektorkarte von pET-24a(+) (Novagen)

### 1.3 Deletionsvektor pK18*mobsacB*

#### pK18*mobsacB*

Replicon pMB1

Size (Kb) 5.66

Purpose Mobilization and Counter Selection

Selectable Markers kan

Other Genes *oriT* (RP4), *sacB*, *lacZ $\alpha$*

Promoter Plac

Cloning Sites BamHI EcoRI HindIII PstI SalI SmaI SphI XbaI

Reference Gene 145, 69-73 (1994)

Source A. Schafer

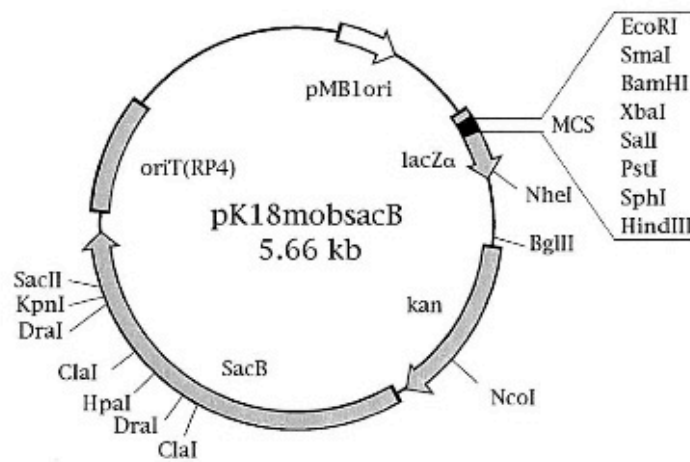


Abbildung 53: Vektorkarte von pK18*mobsacB* (A. Schäfer)

## 2 Protein- und DNA-Standards

### 2.1 Prestained Protein Ladder 10-170 kDa

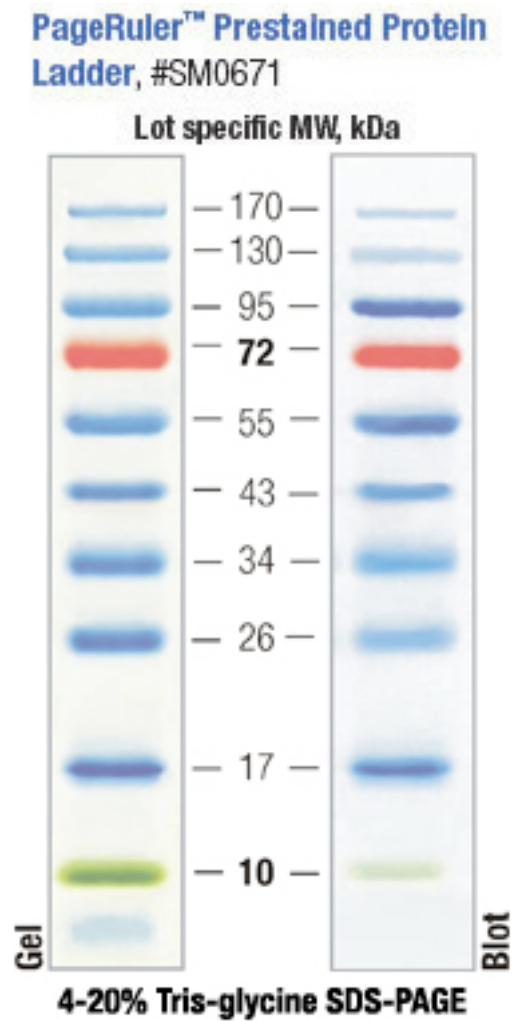


Abbildung 54: Protein-Marker Protein Ladder 10-170 kDa (Fermentas)

## 2.2 Protein-Marker für die isoelektrische Fokussierung

### Schematic representation of marker bands in various pH fractions

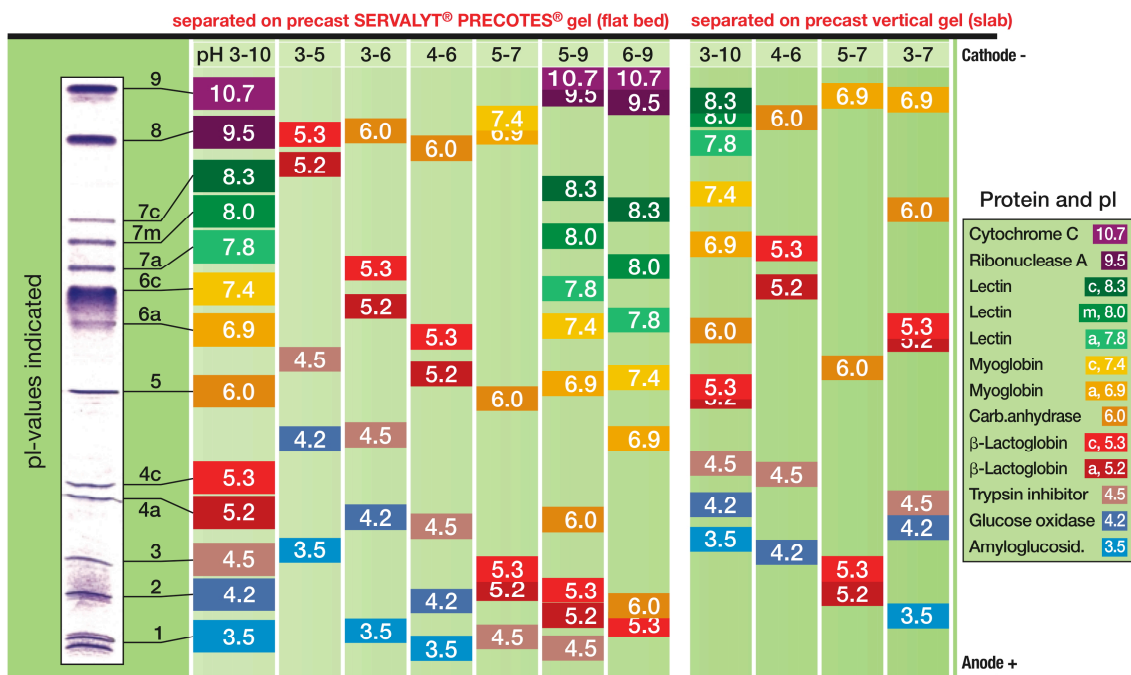


Abbildung 55: Protein-Marker Servalyt® Precotes® 3-10 für die isoelektrische Fokussierung (Serva)

## 2.3 GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

### GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

#### IMPROVEMENTS

1. Three reference bands: 6000, 3000 and 1000 bp.
2. Amounts of DNA per band equalized for easier quantification.

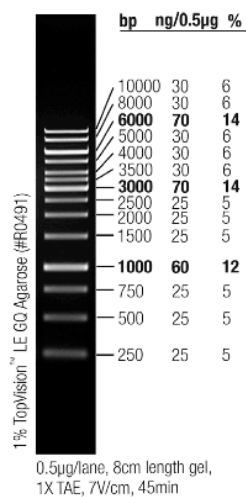


Abbildung 56: GeneRuler™ 1 kb DNA Leiter

## 2.4 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

### GeneRuler™ 100bp DNA Ladder

#### IMPROVEMENTS

1. Amounts of DNA per band equalized for easier quantification.
2. 80 bp band is removed.
3. 1031 bp fragment replaced by 1000 bp.

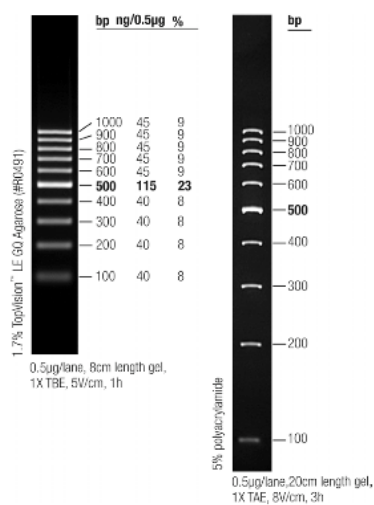


Abbildung 57: GeneRuler™ 100 bp DNA Leiter

### 3 MALDI-TOF Spektrum der AF-Reduktase

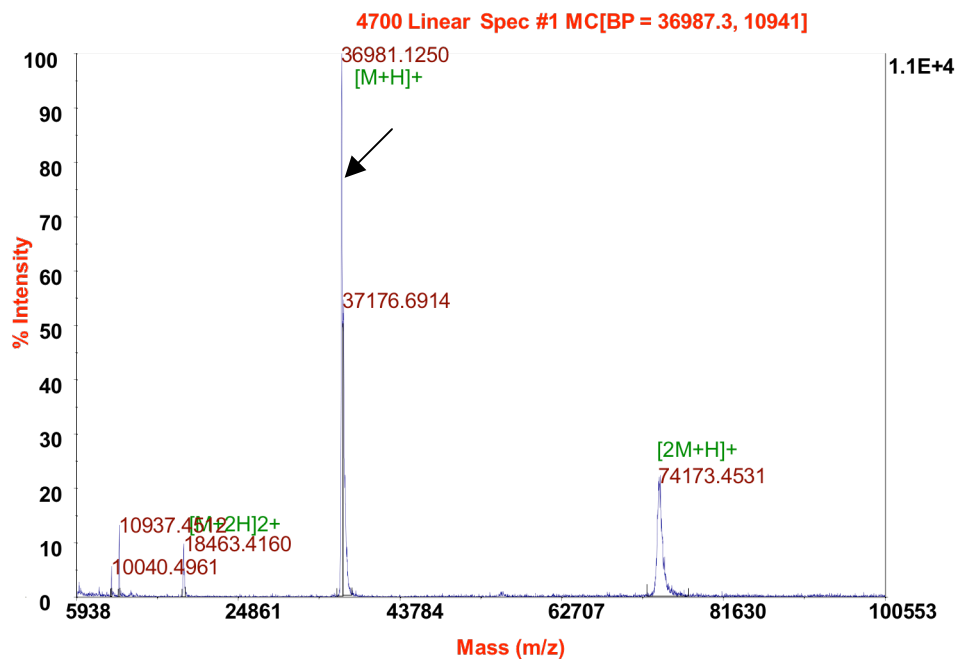
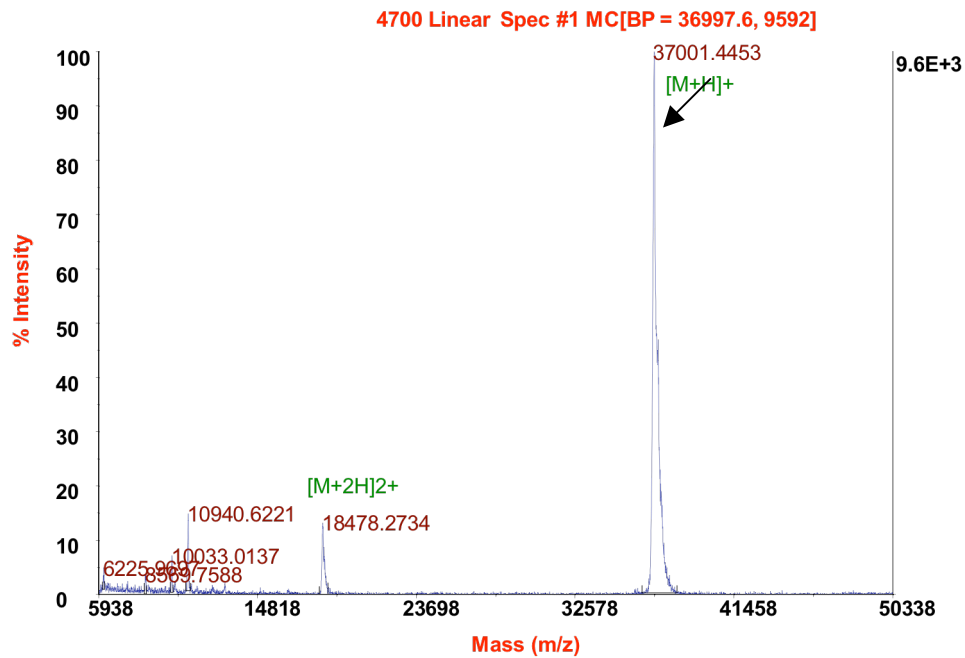


Abbildung 58: MALDI-TOF MS-Spektrum der rekombinanten AF-Reduktase aus *Sinorhizobium meliloti* 1021

#### 4 Lineweaver-Burk-Diagramme von der AF-Reduktase aus *S. meliloti* 1021

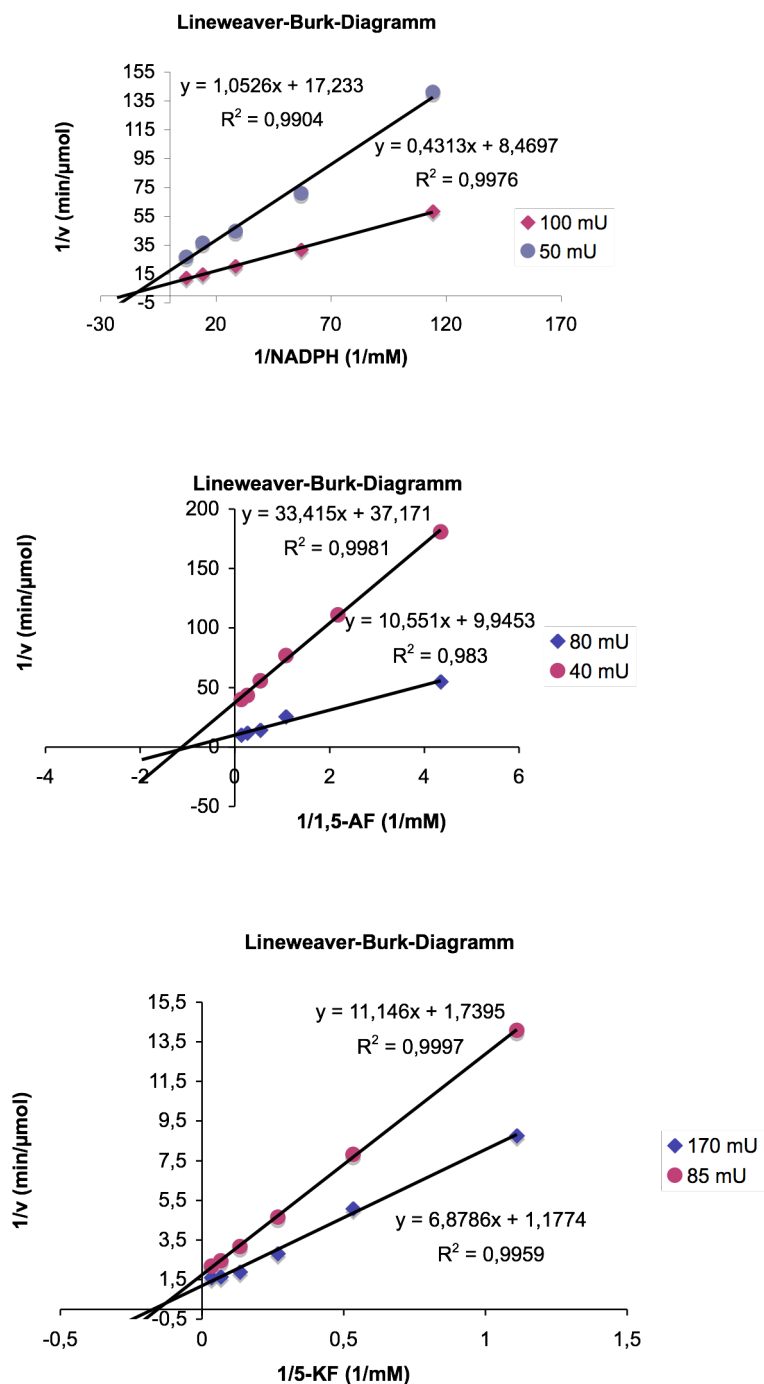
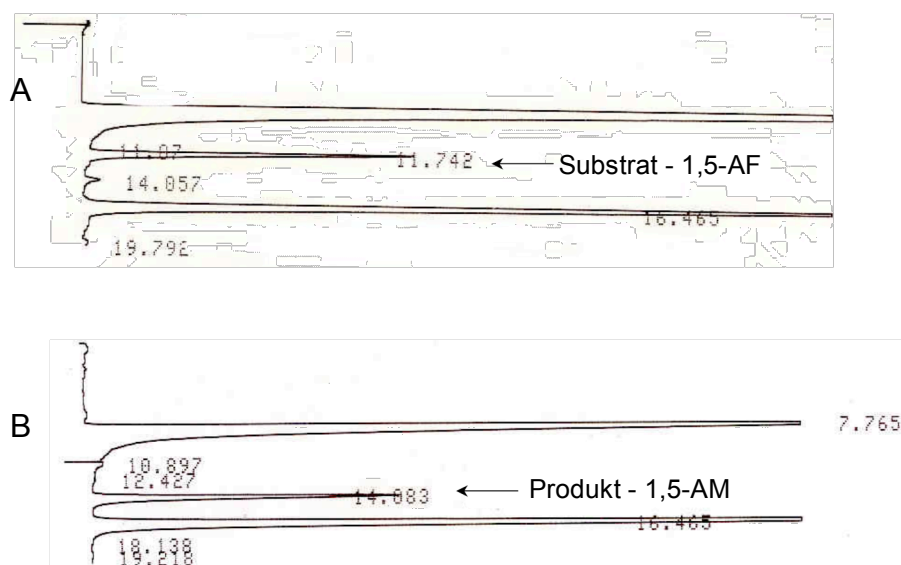


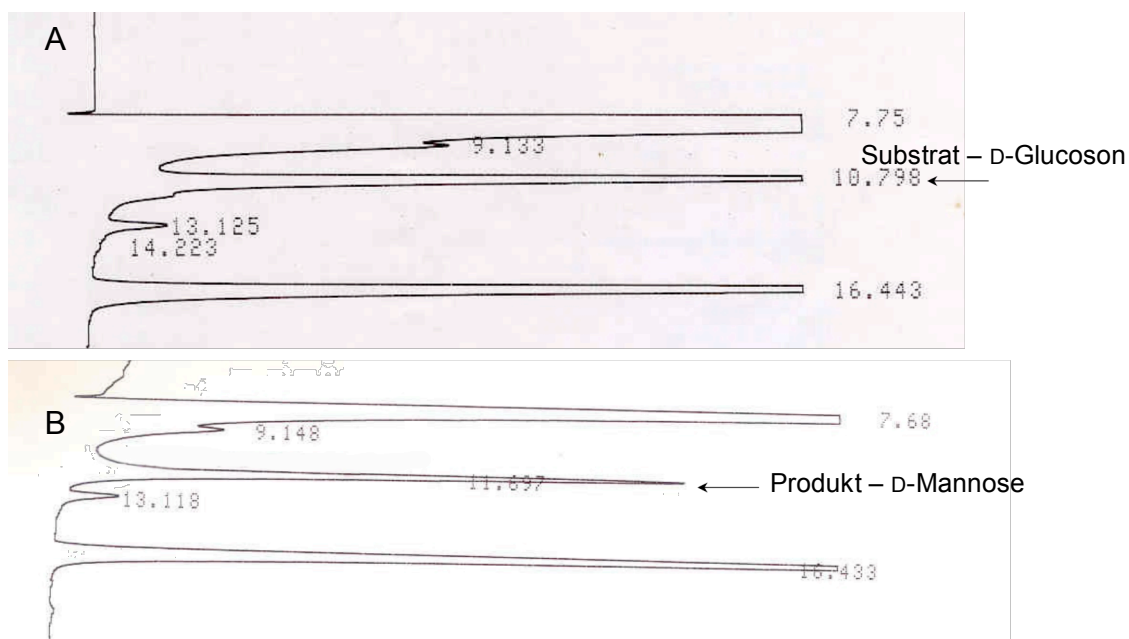
Abbildung 59: Lineweaver-Burk-Diagramme von der AF-Reduktase aus *S. meliloti* 1021 für die NADPH, 1,5-AF und 5-KF

## 5 HPLC Daten zu



**Abbildung 60: Produktidentifizierung des 1,5-Umsatzes mittels HPLC**

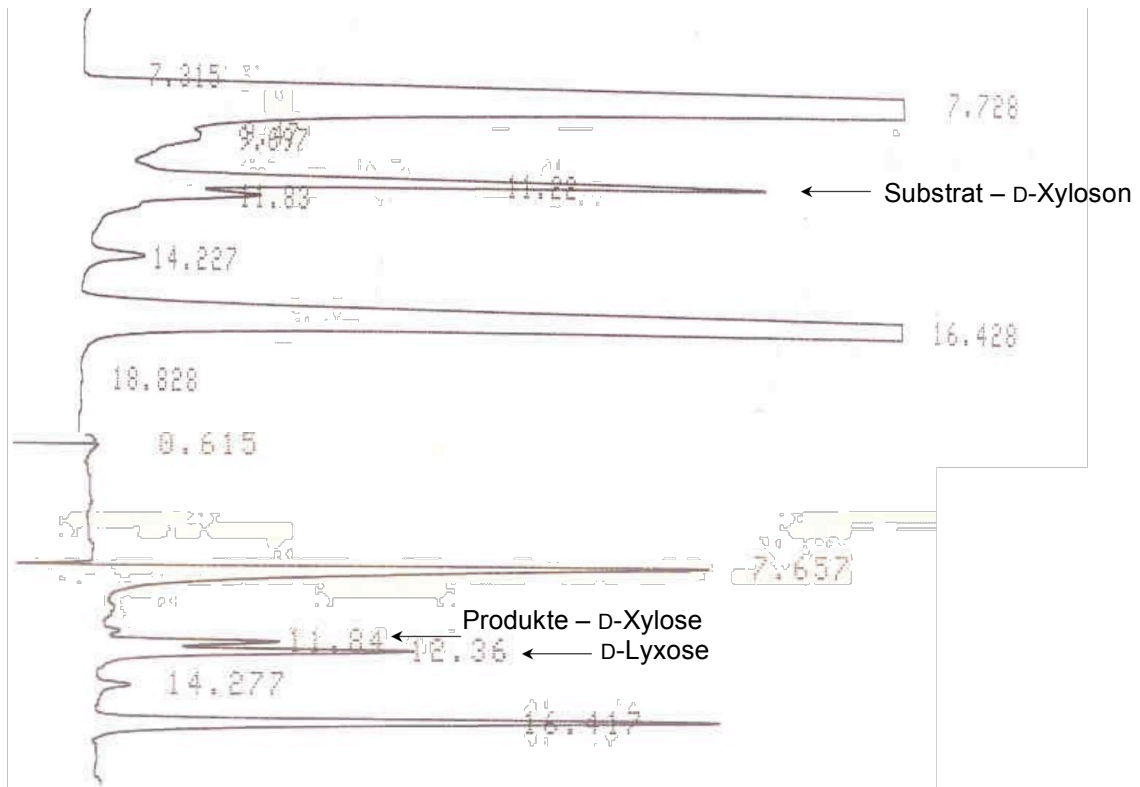
A –  $t_0$ ; B –  $t=75$  min



**Abbildung 61: Produktidentifizierung des D-Glucoson-Umsatzes mittels HPLC**

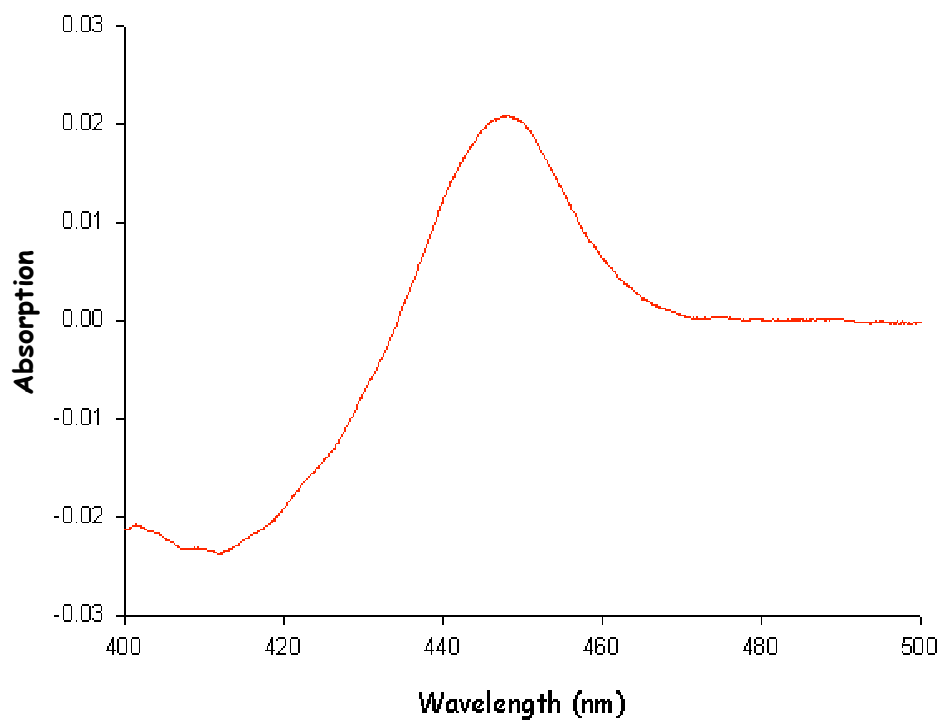
A –  $t_0$ ; B –  $t=216$  min





**Abbildung 62: Produktidentifizierung des D-Xyloson-Umsatzes mittels HPLC**  
A –  $t_0$ ; B –  $t=45$  min

## 6 COD-Spektrum der Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub>



**Abbildung 63: Aufnahme des CO-Differenz-Spektrums der Monooxygenase MO1812-(His)<sub>6</sub>**

## IX Abkürzungsverzeichnis

$\Delta$	Differenz, Deletion
$\Delta E$	Extinktionsdifferenz
Abb.	Abbildung
1,5-AF	1,5-Anhydro-D-fructose
AF-Reduktase	1,5-Anhydro-D-fructose- Reduktase
1,5-AG	1,5-Anhydro-D-glucitol
1,5-AM	1,5-Anhydro-D-mannitol
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäurerest
Asp	Spezifische Aktivität [U/mg]
AU (a.u.)	Absorptionseinheiten
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BisTris	2,2-Bis-(hydroxymethyl)-2, 2',2''-nitrilotriethanol
BSA	Rinderserumalbumin
Bzgl.	Bezüglich
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
C-Terminus	Carboxylterminus
cv	Column volume
CYP(R)	Cytochrom P450 (Reduktase)
Da	Dalton
dATP	Desoxyadensintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
deion.	Deionisiert
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	deionisiertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	Millipore-Wasser
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease

EC	Enzyme Commission
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
f	forward
Fa.	Firma
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavin-Mononukleotid
GFOR	Glucose-Fructose-Oxidoreduktase
His <sub>6</sub>	Poly(6)-Histidin-Rest
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
Ibs	Inclusion bodies
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IP, pI	isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropylthiogalactosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
KOH	Kaliumhydroxid
mAU	Milliabsorption Unit
MS	Massenspektrometrie
MW	molecular weight
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (phosphat)(oxidiert)
NBT	4-Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
n. b.	nicht bestimmt
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgel-elektrophorese

v	Volumen
PBS	Phosphate buffered saline
PCIA	Phenol-Chloroform-Isoamyl- alkohol
PCR	Polymerase chain reaction
PdR	Putidaredoxin-Reduktase
Pdx	Putidaredoxin
r oder rev	reversed (Primer am 3'-5'-Strang)
rDNA	ribosomale DNA
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-bufferd-saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N'N'N',N'-Tetramethylethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TOF	time of flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Amino-Methan
U	Unit [µmol/min]
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
v	Volumen
vgl.	Vergleiche
Vis	visible (UV/Vis-Spektren)
z.B.	zum Beispiel

## Lebenslauf

<u>Geburtsdatum und Ort</u>	03.11.1980 in Skwierzyna, Polen
<b>09.1987-06.1994</b>	Grundschule Nr. 2, Krosno Odrzanskie, Polen
<b>09.1994-1995</b>	Grundschule Nr. 7, Zielona Gora, Polen
<b>09.1995-06.1999</b>	Lyceum Nr. 4 in Zielona Gora, Polen (gleich gymnasiale Oberstufe)
<b>05.1999</b>	Allgemeine Hochschulreife
<b>10.1999-05.2004</b>	Studium an der Universität Stettin (Uniwersytet Szczecinski, Szczecin, Polen)  Akademischer Grad - Diplom-Biologin
<b>10.2004-09.2008</b>	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität des Saarlandes, ZHMB, Institut für Angewandte Mikrobiologie
<b>ab 10. 2004</b>	Promotion am Institut für Angewandte Mikrobiologie an der Universität des Saarlandes

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.