

# **Expression der Galaktitol-Dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides* D und Herstellung von aktiven Mutationen zur Immobilisierung auf Goldelektroden**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften der

**Universität des Saarlandes**

angefertigt am

**Zentrum für Human- und Molekularbiologie (ZHMB)**

vorgelegt von

**Petra Kornberger**

Saarbrücken, im August 2009

Tag des Kolloquiums: 14. Dezember 2009

Dekan: PROF. DR. STEFAN DIEBELS

Prüfungsausschuss: PROF. DR. FRIEDRICH GIFFHORN (1. Berichterstatter)

PROF. DR. MANFRED J. SCHMITT (2. Berichterstatter)

PROF. DR. KARIN RÖMISCH (Vorsitzende)

DR. KATRIN KAUFMANN (Akademischer Beisitzer)

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden am Institut für Angewandte Mikrobiologie des Zentrums für Human- und Molekularbiologie (ZHMB) der Universität des Saarlandes durchgeführt und von der Europäischen Union im Rahmen des EU-Projektes ERUDESP (Development of Electrochemical Reactors Using Dehydrogenases for Enantiopure Synthon Preparations, 7<sup>th</sup> Framework Program of the European Commission, Contract Reference CP-FP 213487-2) gefördert.

## Während dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen

### Publikationen:

**Kornberger, P.;** Giffhorn, F. and Kohring, G.-W. (2009)

#### **Dehydrogenases, Electrochemical Co-Factor Regeneration**

Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB), John Wiley and Sons, Inc. (in press)

**Kornberger, P.;** Gajdzik, J.; Natter, H.; Wenz, G.; Giffhorn, F.; Kohring, G.-W. and Hempelmann, R. (2009)

#### **Modification of galactitol-dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D for immobilization on polycrystalline gold surfaces**

Langmuir (in revision)

### Publikation in Vorbereitung:

Carius, Y.; Christian, H.; Faust, A.; **Kornberger, P.;** Kohring, G.-W.; Giffhorn, F.; Scheidig, A.J.

#### **Crystal structures of the galactitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* in complex with its cofactor and bound substrates**

### Poster:

**Petra Kornberger,** Christof Schaum, Christian Zimmer, Friedrich Giffhorn, Gert-Wieland Kohring

#### **Characterization and Sequencing of an Aldolase from *Sphingobium herbicidovorans* FA3g**

VAAM-Jahrestagung, Osnabrück (2007)

**Petra Kornberger,** Christian Zimmer, Yvonne Carius, Axel J. Scheidig, Friedrich Giffhorn, Gert-W. Kohring

#### **Genetic Variants of Galactitol-Dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D for Structure Function Analyses**

European BioPerspectives, Köln (2007)

**Petra Kornberger**, Janine Gajdzik, Rolf Hempelmann, Friedrich Giffhorn, Gert-W. Kohring

**Modification of the Galactitol-Dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D for Immobilization on Gold Surfaces**

VAAM-Jahrestagung, Frankfurt (2008)

S. Gauer, **P. Kornberger**, A. Neuner, F. Giffhorn and G.-W. Kohring

**Heterologous Expression of an Aldolase from *Sphingobium herbicidovorans* FA3g and Establishment of a Photometric Test for Aldolase Activity**

VAAM-Jahrestagung, Frankfurt (2008)

J. Gajdzik, J. Lenz, H. Natter, **P. Kornberger**, G.W. Kohring, F. Giffhorn, R. Hempelmann

**Electroenzymtic reactions with GatDH, GatDH-Cyst and P2OxB1H on poly- and nanocrystalline gold and platinum electrodes**

12<sup>th</sup> International Conference on Electroanalysis, ESEAC, Prag (2008)

**Petra Kornberger**, Christian Zimmer, Friedrich Giffhorn, Gert-W. Kohring

**Modified Regulation Sequence is Responsible for Constitutive Expression of Galactitol-Dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides* D**

VAAM-Jahrestagung, Bochum (2009)

T. Klein, **P. Kornberger**, J. Gajdzik, H. Natter, R. Hempelmann, F. Giffhorn, G.W. Kohring

**D-Glucitol Dehydrogenase as a model protein for the electroenzymatic production of enantiopure building blocks**

VAAM-Jahrestagung, Bochum (2009)

**Öffentliche Vorträge:**

**P. Kornberger**, S. Gauer, J. Gajdzik, R. Hempelmann, F. Giffhorn, G.W. Kohring

**Modified galactitol-dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* for redox activity with electrochemical co-factor regeneration**

European BioPerspectives, Hannover (2008)

*Für Luise Krämer*

Du hast mich begleitet und

ich habe Dich begleitet.

# Danksagung

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Friedrich Giffhorn für die Überlassung des Themas und sein großes Engagement dafür, mir die Möglichkeit geben zu können, meine Dissertation in der Angewandten Mikrobiologie anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schmitt danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Herzlichen Dank an Dr. Gert-Wieland Kohring für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, die stets konstruktiven Diskussionen und seinen unermühtlichen Einsatz bei der Erstellung der Publikationen.

Ein großes Dankeschön an meine ehemaligen Betreuer Dr. Sabine Bastian und Dr. Christian Zimmer, die trotz der relativ großen, räumlichen Distanz nicht nur weiterhin für alle meine Fragen und Probleme ein offenes Ohr hatten und mich tatkräftig unterstützten, sondern mir vor allem auch freundschaftlich verbunden geblieben sind.

Vielen herzlichen Dank an Sabrina Gauer und Tobias Klein, die mit ihren F-Arbeiten einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben und natürlich auch für die schöne und tolle Zeit zusammen.

Meiner lieben und langjährigen Freundin Dr. Susanne Dorscheid danke ich für die vielen nützlichen Ratschläge und Diskussionen bei der Arbeit, die gute Verständigung und einfach viele Dinge, die ich nur mit ihr teilen kann.

Vielen Dank an meine liebe Freundin Martina Pitz, weil sie immer für mich da ist und ein ganz besonderer Mensch ist.

Nicole Jundel danke ich ganz besonders für ihre große Herzlichkeit, ihr stets aufmunterndes Lächeln und, dass sie so viel mehr ist, als einfach nur eine tolle Sekretärin.

Birgit Hasper, der besten TA der Welt, danke ich für ihre große Hilfe und Unterstützung bei meiner Arbeit und dafür, dass wir uns so gut verstehen.

Carmen Clemens möchte ich für die vielen netten Gespräche und die Beratung in allen gesundheitlichen Fragen (z.B. Yoga) danken.

Bei Herrn Klaus Witte möchte ich mich bedanken, dass er sein unerschöpfliches Wissen über Chromatographien stets bereitwillig mit mir geteilt hat, für meine vielen Fragen immer ein offenes Ohr hatte und für die lustigen Gespräche.

Allen ehemaligen Mitarbeitern/innen und Diplomanden/innen des Institutes für Angewandte Mikrobiologie danke ich für das angenehme, freundliche und lustige Arbeitsklima.

Frau Prof. Dr. Römisch und ihren Mitarbeitern/innen Gisela, Marie, Christina und Thomas danke ich für die gute, freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Schmitt möchte ich für die gute Kooperation und die vielen gemeinsamen Pizza-Bestellungen danken.

Herrn Dr. Klaus Hollemeyer danke ich für die Durchführungen aller in dieser Arbeit verwendeten MALDI-TOF-Analysen. Der ganzen Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Heinzle möchte ich darüber hinaus für die gute Zusammenarbeit danken.

Dr. Yvonne Carius und Herrn Prof. Dr. Scheidig danke ich für die Überlassung der Daten der Kristallstruktur der GatDH, die konstruktive Zusammenarbeit und die vielen nützlichen Diskussionen.

Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hempelmann, besonders Dr. Janine Gajdzik und Jennifer Lenz, danke ich für die Durchführung der CV-Messungen und ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wenz möchte ich mich für die Durchführung der SPR-Messungen bedanken.

Thomas Heinz danke ich für seine große Hilfe bei der Beantwortung aller meiner LaTeX-Fragen.

Von Herzen möchte ich den starken Frauen in meiner Familie danken, meiner lieben Oma Luise Kornberger (1915-2003), meiner lieben Oma Luise Krämer (1917-2008) und meiner lieben Mutter Luise Kornberger, die mich stets mit ihrer Liebe, ihrer Geborgenheit und ihrem Trost unterstützt haben und mir immer Vorbilder sein werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b>	<b>1</b>
1. Die Enzymklasse der Dehydrogenasen . . . . .	1
2. Anwendungspotential der Dehydrogenasen . . . . .	3
3. Regenerierungssysteme für Cosubstrate . . . . .	5
3.1. Enzymatische Cofaktor Regenerierung . . . . .	5
3.2. Elektrochemische Cofaktor Regenerierung . . . . .	8
3.3. Elektrochemische Charakterisierung anhand der cyclischen Voltammetrie . . . . .	11
4. Der Organismus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> . . . . .	13
5. Anwendungspotential der Galaktitol-Dehydrogenase . . . . .	14
6. Ziele dieser Arbeit . . . . .	17
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
1. Organismen, Stämme, Plasmide und Primer . . . . .	18
1.1. Organismen und Stämme . . . . .	18
1.2. Plasmide . . . . .	19
1.3. Primer . . . . .	21
2. Nährmedien . . . . .	22
2.1. Nährmedien für <i>Rhodobacter sphaeroides</i> . . . . .	22
2.2. Nährmedien für <i>E. coli</i> . . . . .	23
2.3. Nährböden . . . . .	24
3. Antibiotika und Lösungen . . . . .	24
4. Lagerung der Organismen und genveränderten Stämme . . . . .	25
5. Gentechnische Standardmethoden . . . . .	25
5.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> . . . . .	25
5.2. Isolierung von genomischer DNA aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> . . . . .	26
5.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> . . . . .	28
5.4. Restriktionsspaltung von DNA . . . . .	29
5.5. Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	30
5.6. Reisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen . . . . .	31

5.7.	Reinigung der DNA durch Fällung und Dialyse . . . . .	31
6.	Polymerasenkettenreaktion (PCR) . . . . .	32
6.1.	Nested-PCR . . . . .	33
6.2.	Colony-PCR . . . . .	34
6.3.	SiteFinding-PCR . . . . .	35
6.4.	KOD QuikChange-PCR . . . . .	39
6.5.	Reverse Transkription-PCR . . . . .	40
7.	Klonierung von PCR-Fragmenten . . . . .	42
7.1.	TOPO-TA-Klonierung . . . . .	42
7.2.	Ligation . . . . .	42
8.	Transformation . . . . .	43
8.1.	Herstellung elektrokompenter Zellen . . . . .	43
8.2.	Elektroporation . . . . .	43
9.	DNA-Sequenzierung . . . . .	44
9.1.	DNA-Sequenzanalyse nach Sanger et al. (1977) . . . . .	44
9.2.	TempliPhi-Reaktion . . . . .	45
9.3.	Auswertung der Sequenzdaten . . . . .	45
10.	Kultivierung und Expression . . . . .	46
10.1.	Anzucht auf Nährböden . . . . .	46
10.2.	Schüttelkultur im Rollrandröhrchen . . . . .	46
10.3.	Schüttelkultur im Erlenmeyer-Kolben . . . . .	47
10.4.	Fermentation . . . . .	47
10.4.1.	Anzucht im 10 l Bioreaktor . . . . .	47
10.4.2.	Anzucht im 2 l Bioreaktor . . . . .	47
11.	Zellernte und Herstellung zellfreier Extrakte . . . . .	48
11.1.	Zellernte . . . . .	48
11.2.	Zellaufschluss durch Ultraschall . . . . .	48
11.3.	Zellaufschluss mit Frenchpress . . . . .	48
12.	Proteinanreicherung . . . . .	48
12.1.	Anreicherung der nativen, heterolog exprimierten GatDH . . . . .	49
12.1.1.	Ammoniumsulfatfällung . . . . .	49
12.1.2.	Chromatographische Methoden . . . . .	49
12.1.3.	Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) . . . . .	50
12.1.4.	Gelfiltration . . . . .	50
12.2.	Anreicherung der C-terminal verkürzten GatDH . . . . .	51
12.2.1.	Anionenaustauschchromatographie (AAC) . . . . .	51
12.2.2.	Gelfiltration . . . . .	52

12.3.	Anreicherung der N-terminal His(6)-getagten Varianten . . . . .	53
12.3.1.	Affinitätschromatographie . . . . .	53
12.3.2.	Chromatographisches Umpuffern . . . . .	54
13.	Bestimmung der Enzymaktivität . . . . .	54
13.1.	Oxidationsreaktion von Alkoholen . . . . .	55
13.2.	Reduktionsreaktion von Ketonen . . . . .	56
13.3.	Berechnung der Volumenaktivität . . . . .	56
13.4.	Einfluss von Glutardialdehyd auf die Enzymaktivität . . . . .	57
13.5.	Test auf kompetitive Inhibitoren . . . . .	58
14.	Proteinchemische Analyse . . . . .	58
14.1.	Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) . . . . .	58
14.1.1.	Native PAGE . . . . .	58
14.1.2.	SDS-PAGE (Laemmli, 1970 [116]) . . . . .	59
14.1.3.	Coomassie-Proteinfärbung . . . . .	61
14.1.4.	Isoelektrische Fokussierung . . . . .	61
14.2.	Proteinbestimmung . . . . .	62
14.3.	Tryptischer Verdau . . . . .	63
14.3.1.	Direkter Verdau . . . . .	63
14.3.2.	Verdau in einem SDS-Gel . . . . .	63
14.4.	MALDI-TOF-MS/MS Massenspektrometrie . . . . .	64
<b>III.</b>	<b>Experimente und Ergebnisse</b>	<b>66</b>
1.	Anreicherung des unmodifizierten GatDH-Enzyms . . . . .	66
2.	Vergleichende Analyse der GatDH-Gen Sequenzumgebung in <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4 und D . . . . .	68
2.1.	Identifizierung unbekannter Sequenzabschnitte in <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D . . . . .	69
2.2.	Sequenzvergleich der Stämme Si4 und D . . . . .	75
2.3.	Homologievergleich mit anderen Regulatoren . . . . .	79
2.4.	Homologievergleich mit anderen Promotorsequenzen . . . . .	82
2.5.	Heterologe Expression verschiedener Sequenzvarianten zur Identifizierung regulatorischer Elemente . . . . .	84
2.5.1.	Expression des GatDH-Gens mit Vorsequenz . . . . .	84
2.5.2.	Coexpression des GntR-ähnlichen Proteins und der GatDH	88
2.5.3.	MALDI-TOF-MS/MS Analyse zur Proteinidentifizierung	91
2.5.4.	Coexpression des GntR-ähnlichen Proteins mit einem Aminosäureaustausch und der GatDH . . . . .	95

2.5.5.	Kultivierung der Varianten ohne IPTG-Induktion . . . . .	95
2.5.6.	Vergleich der Volumenaktivitäten der verschiedenen Sequenzvarianten aus <i>R. sphaeroides</i> Si4 und D . . . . .	96
2.6.	Zweistufige Reverse Transkriptase-PCR zur mRNA-Analyse . . . . .	100
3.	Gezielte Strukturveränderung am C-Terminus der Galaktitol-Dehydrogenase zur Untersuchung der Magnesiumionen-Abhängigkeit . . . . .	102
3.1.	Generierung von His(6)-getagten Varianten zur vereinfachten Anreicherung . . . . .	103
3.2.	Konstruktion der C-terminal verkürzten GatDH . . . . .	104
3.3.	Anreicherung der verkürzten GatDH251 . . . . .	106
3.3.1.	Chromatographische Trennmethoden . . . . .	107
3.3.2.	Dokumentation der Anreicherung auf einem SDS-Gel . . . . .	109
3.4.	Analyse der angereicherten GatDH251 . . . . .	110
3.4.1.	MALDI-TOF-Analyse zur Identifizierung der GatDH251 . . . . .	110
3.4.2.	Größenbestimmung der angereicherten GatDH251 . . . . .	113
3.4.3.	Kristallisation der verkürzten GatDH251 . . . . .	116
4.	Identifizierung kompetitiver Inhibitoren . . . . .	117
5.	Modifizierung der Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D zur vereinfachten Anreicherung und Immobilisierung . . . . .	118
5.1.	Immobilisierung der GatDH über das GA/BSA-System . . . . .	118
5.2.	Generierung von Cystein-getagten Varianten zur Immobilisierung auf Goldoberflächen . . . . .	120
5.3.	Vergleich der N-terminal modifizierten GatDH-Varianten . . . . .	123
5.4.	Anreicherung der His-getagten Varianten . . . . .	125
5.4.1.	Anreicherung der NHis-GatDH . . . . .	125
5.4.2.	Anreicherung der 2Cys-GatDH . . . . .	128
5.4.3.	Isoelektrische Fokussierung der NHis- und 2Cys-GatDH . . . . .	129
5.5.	Immobilisierung der 2Cys-GatDH auf einer polykristallinen Goldelektrode . . . . .	130
5.5.1.	Überprüfung der Adsorptionsfähigkeit durch SPR Spektroskopie . . . . .	130
5.5.2.	Überprüfung der Aktivität anhand Cyclischer Voltammetrie (CV) . . . . .	132

**IV. Diskussion** **135**

1.	Untersuchungen zur modifizierten GatDH-Genexpression in <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Stamm D gegenüber Stamm Si4 . . . . .	135
----	--	-----

1.1.	Möglicher Einfluss des GntR-Proteins auf die Expression . . . . .	137
1.2.	Konstitutive Expression der GatDH durch eine neue putative Promotorsequenz im Stamm D . . . . .	146
2.	Untersuchung der Magnesiumionen-Abhängigkeit der GatDH . . . . .	151
2.1.	Einfluss auf die Aktivität der GatDH . . . . .	154
2.2.	Einfluss auf die Struktur der GatDH . . . . .	155
2.3.	Inhibitor-Studie für die nicht-verkürzte GatDH . . . . .	157
3.	Gerichtete Modifizierung des GatDH-Enzyms . . . . .	157
3.1.	Anreicherung über einen Histidin-Tag . . . . .	160
3.2.	Immobilisierung über einen Cystein-Tag . . . . .	162
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>168</b>
<b>VI.</b>	<b>Abstract</b>	<b>169</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>170</b>
<b>VII.</b>	<b>Anhang</b>	<b>193</b>
1.	Verwendete Vektoren . . . . .	193
1.1.	Expressionsvektor pET24a(+) . . . . .	193
1.2.	pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup> -Vektor . . . . .	194
2.	DNA- und Proteinstandards . . . . .	195
2.1.	GeneRuler <sup>™</sup> 1kb DNA Leiter . . . . .	195
2.2.	HyperLadder <sup>™</sup> IV DNA Leiter . . . . .	195
2.3.	Dual Color Protein-Marker . . . . .	196
2.4.	Protein Leiter 10-200 kDa . . . . .	196
2.5.	Protein-Marker für isoelektrische Fokussierung . . . . .	197
3.	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	198
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>200</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>204</b>

# I. Einleitung

## 1. Die Enzymklasse der Dehydrogenasen

Die Dehydrogenasen gehören zur Enzymfamilie der Oxidoreduktasen (EC 1.-.-.-) (Abokitze and Hummel, 2003 [1]) und sind in allen Lebewesen gleichermaßen an essenziellen Reaktionsmechanismen des Metabolismus beteiligt. Oxidoreduktasen katalysieren Redoxreaktionen (Hummel, 1999 [82]), also die Übertragung von Elektronen, und werden in Oxidasen, Reduktasen, Oxygenasen und Dehydrogenasen unterteilt (Karlson et al., 1994 [99]). Mikroorganismen stellen aufgrund ihres vielfältigen Metabolismus eine vielversprechende Quelle für neue Dehydrogenasen dar, die relativ leicht zugänglich sind und Aktivitäten für ungewöhnliche Substrate, wie hydroxylierte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), aufweisen können (Habe and Omori, 2003 [63]). So zählen beispielsweise die sogenannten TOD- oder TOL-*Pathways*, an denen Dihydrodiol-Dehydrogenasen beteiligt sind, zu den meist untersuchten metabolischen Abbauwegen aromatischer Kohlenwasserstoffe durch aerobe Mikroorganismen (Lee et al., 1999 [118]; Zeyer et al., 1985 [239]; Gibson et al., 1975 [55]). Für die katalytische Reaktion benötigen die Dehydrogenasen entsprechende Cofaktoren als Elektronenakzeptor bzw. -donor. Anhand der verschiedenen Cosubstrate lassen sich die Oxidoreduktasen in drei Hauptklassen unterteilen, für die jeweils universelle Reaktionsgleichungen gelten (Reid and Fewson, 1994 [163]).

### 1. NAD(P)-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen (ADH)

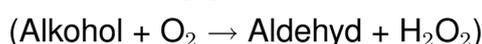


- Zink-unabhängige *short-chain* Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR)
- Zink-abhängige *medium-chain* Dehydrogenasen/Reduktasen (MDR)
- Eisen-aktivierte *long-chain* Dehydrogenasen/Reduktasen (LDR)

### 2. NAD(P)-unabhängige Alkohol-Dehydrogenasen



### 3. FAD-abhängige Alkohol-Oxidasen



NAD(P)-unabhängige Enzyme verwenden Pyrroloquinolin Quinone (PQQ) (de Vries et al., 1990 [36]), eine Hämgruppe in Verbindung mit PQQ, wie die Ethanol-Dehydrogenase aus *Acetobacter* spp. (Takemura et al., 1993 [212]; Tamaki et al., 1991 [213]), oder den Cofaktor F<sub>420</sub> (Bleicher and Winter, 1991 [18]) als Cosubstrat. Die Alkohol-Oxidase aus *Pichia pastoris* (Koutz et al., 1989 [113]) und *Candida boidinii* (Sakai and Tani, 1992 [174]) gehören zu den FAD-abhängigen Oxidasen, die essenzielle, irreversible Oxidationen von Alkoholen katalysieren und dabei die Elektronen auf molekularem Sauerstoff übertragen. Die NAD(P)-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) können anhand ihrer Metallionen-Abhängigkeit, struktureller und proteinbiochemischer Eigenschaften, wie die Größe ihrer Untereinheiten, in drei weitere Gruppen eingeteilt werden (Kavanagh et al., 2008 [104]; Hummel, 1997 [81]; Jörnvall et al., 1987 [93]; Jörnvall et al., 1981 [92]). Den Proteinen dieser drei Gruppen ist der sogenannte *Rossmann-fold* gemeinsam, eine paarige Dinukleotid-Cofaktor-Bindedomäne, welche aus parallelen  $\beta$ -Strängen besteht, die über  $\alpha$ -Helices verbunden sind (Kavanagh et al., 2008 [104]; Rao and Rossmann, 1973 [161]). Eine Alkohol-Dehydrogenase aus *Drosophila melanogaster* (Thatcher, 1980 [216]) und die Ribitol-Dehydrogenase aus *Klebsiella aerogenes* (Jörnvall et al., 1984 [91]) wurden als erste Mitglieder der *short-chain* Dehydrogenase/Reduktase (SDR) Familie (Jörnvall et al., 1995 [94]) beschrieben, die aus ca. 250 Aminosäureresten bestehen und GXXXGXXG als Dinukleotid-Bindemotiv aufweisen. Andere Beispiele für diese Gruppe sind die Mannitol-Dehydrogenase aus *Candida magnoliae* (Lee et al., 2003 [117]), die zur industriellen Herstellung des Hexitolzuckers Mannitol verwendet wird, die Galaktitol-Dehydrogenase (Kohring et al., 2003 [110]; Huwig et al., 1997 [83]; Schneider et al., 1995 [188]) und verschiedene weitere Polyol-Dehydrogenasen aus *Rhodobacter sphaeroides* mit vielen unterschiedlichen Anwendungspotentialen (Schäfer et al., 1997 [181]; Schauder et al., 1995 [179]; Kahle et al., 1992 [97]). Die *medium-chain* Dehydrogenasen/Reduktasen (MDR) besitzen ca. 350 Aminosäurereste pro Untereinheit und das GXGXXG Fingerprintmuster als Cofaktor Bindedomäne (Otte and Lengeler, 2001 [145]; Wierenga et al., 1983 [229]), wie z.B. für die Pferdeleber-Alkohol-Dehydrogenase (Bränden et al., 1975 [20]) und die Alkohol-Dehydrogenasen I-III aus *Saccharomyces cerevisiae* (Saliola et al., 1990 [176]) gezeigt wurde. Darüberhinaus existieren auch Enzyme wie die 1,5-Anhydro-D-Fruktose-Reduktase (AFR) aus *Sinorhizobium morelense* (Dambe et al., 2006 [33]; Kühn et al., 2006 [107]), die eine Ausnahmestellung zwischen den SDR und MDR einnehmen, da diese zwar von Metallionen unabhängig sind, aber mehr als 300 Aminosäurereste besitzen. Diese Enzyme gehören zur GFO/IDO/MocA-Familie (Kühn, 2004 [106]; Kanagasundaram and Scopes, 1992 [98]; Zachariou and Scopes, 1986 [237]). Der Name dieser Gruppe setzt sich aus der Glukose-Fruktose-

Oxidoreduktase (EC 1.1.99.28) und den Vertretern der Inositol-Dehydrogenasen IDH und MocA zusammen, die sich durch ihre Substrate *myo*-Inositol und Rhizopin (3-O-Methyl-scylo-insoamin) unterscheiden (Fry et al., 2001 [46]; Galbraith et al., 1998 [51]). Dagegen weisen die *long-chain* Dehydrogenasen/Reduktasen (LDR), wie die Glycerol-Dehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus* (Mallinder et al., 1992 [124]) und die ADH II aus *Zymomonas mobilis* (Conway and Ingram, 1989 [30]; Conway et al., 1987 [31]) kein einheitliches Fingerprintmotiv für ihr Cosubstrat auf. Generell bestehen die Untereinheiten aus ca. 385 Aminosäureresten, können aber auch eine Dimension von fast 900 Aminosäuren, wie im Falle der multifunktionalen ADHs aus *Escherichia coli* und *Clostridium acetobutylicum* erreichen (Youngleson et al., 1988 [236]).

Dehydrogenasen können zahlreiche Hydroxyl-, Keto-, oder Aldehydgruppen in Alkoholen, Polyolen, aliphatischen oder aromatischen Verbindungen oxidieren oder reduzieren. Ihr breites Substratspektrum und ihre hohe Enantioselektivität stellen daher ein großes biotechnologisches Potential für deren zunehmende Nutzung in industriellen Produktionsprozessen dar (Goldberg et al., 2007 Part I [56] and Part II [57]; Molinari, 2006 [136]; Hummel, 1999 [82]; Hummel, 1997 [81]).

## 2. Anwendungspotential der Dehydrogenasen

Die chemische Industrie entwickelt einen immer größer werdenden Bedarf an enzymatisch katalysierten Produktionsprozessen. Die Anzahl signifikanter Biotransformationen stieg daher von nur etwa zehn im Jahr 1960 auf über 130 im Jahr 2002 an, wobei Redoxkatalysatoren dabei einen Anteil von 30% einnehmen (Straathof et al., 2002 [205]). Obwohl enzymatische Redoxreaktionen im industriellen Maßstab aufgrund einer nur begrenzten Stabilität der Enzyme hinsichtlich hoher Substrat-, Produkt-, oder organischer Lösungsmittel-Konzentrationen sowie der Temperatur limitiert sind, gewinnt der Gebrauch von Dehydrogenasen an Stelle der konventionellen synthetischen Methoden zunehmend an Bedeutung (Molinari, 2006 [136]). Im Gegensatz zu vielen chemischen Reaktionen, benötigen sie nicht-toxische und korrosionsbeständige Bedingungen (Gavrilescu and Chisti, 2005 [53]). Milde enzymatische Reaktionsbedingungen vermeiden im Vergleich zur chemischen Synthese viele Probleme, wie Isomerisierung, Racemisierung und Umlagerungen, was die Enzyme in Kombination mit einem verringerten Bedarf an umweltschädlichen Einsatzstoffen zu attraktiven Katalysatoren für organische Synthesen macht (Kataoka et al., 2003 [103]; Hummel, 1997 [81]). Die wesentlichen Vorteile bestehen jedoch in der hohen Chemo-, Regio- und Enantioselektivität, im Besonderen für asymmetrische Synthesen (Molinari, 2006 [136]). Da kommerziell erwerbbar Enzyme jedoch oft eine begrenzte Langzeitstabilität, Sub-

stratspezifität und fehlende Aktivität in organischen Lösemitteln besitzen, gibt es einen beständigen Bedarf nach neuen Biokatalysatoren zu *screenen* oder bekannte Enzyme zu modifizieren (Hummel, 1997 [81]). Die Fortschritte in der genetischen Manipulation von Mikroorganismen ermöglichen außerdem eine effektive Klonierung und Expression von Enzymen aus relevanten metabolischen Stoffwechselwegen in einem Wirtorganismus, der zu einer Akkumulation von gewünschten Intermediaten oder Endprodukten, die für die Industrie interessant sind, fähig ist (Zeyer et al., 1985 [239]).

Die enzymatische Dehydrierung von Monosacchariden ist eine weitverbreitete Reaktion, da Mikroorganismen mit einer Reihe von verschiedenen Dehydrogenasen ausgestattet sind, die den Stoffwechselwegen für den Abbau von Zuckern, wie dem Entner-Doudoroff- oder dem Phosphoketolase-*Pathway*, angehören (Molinari, 2006 [136]). Die Glukose- und Gluconat-Dehydrogenase sind die Schlüsselenzyme des Pentosephosphatweges und wurden in industriellen Maßstäben und als Biosensoren verwendet (Molinari, 2006 [136]). Das bekannteste Beispiel für die Nutzung von Dehydrogenasen in der industriellen Anwendung ist die Reichstein-Grüssner-Synthese für die Produktion von L-Ascorbinsäure (Vitamin C) (Reichstein and Grüssner, 1934 [162]), welche in einer Gesamtmenge von circa 80.000 Tonnen pro Jahr hergestellt wird (Gavrilescu and Chisti, 2005 [53]). Sie zählt zu den ersten chemoenzymatischen Synthesen, die auf sechs chemischen Reaktionen und einer mikrobiologischen Transformation, der Oxidation von D-Sorbitol zu L-Sorbitol, katalysiert durch membrangebundene Dehydrogenasen, basiert (Molinari, 2006 [136]). Die Reinigung eines hergestellten Produktes spielt für den Kostenfaktor des gesamten Verfahrens eine große Rolle. Dieser Prozess kann durch ein Zurückhalten der Biokatalysatoren durch eine Membran vereinfacht werden und wurde bereits für verschiedene Anwendungen in sogenannten Enzym-Membran-Reaktoren (EMR) gezeigt (Lütz et al., 2006 [122]). Evonik (Degussa) verwendet diese Art von Reaktor für die Produktion von enantiomerenreinen Aminosäuren durch eine kinetische Auflösung von N-Acetylaminosäuren (Wöltinger et al., 2001 [231]). Eine Kombination aus Membran-assoziierten Reaktoren und Ganzzell-Biokatalysatoren wurde ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben (Chin-Joe et al., 2002 [26]; Haberland et al., 2002 [64]).

Präparative Umsätze erfordern nicht nur geeignete Enzyme und passende Reaktionstechniken, sondern auch besonders effiziente Regenerationssysteme für das jeweilige Cosubstrat (Hummel, 1999 [82]). Ein stöchiometrischer Einsatz, beispielsweise von NADH, ohne einen effektiven Recyclingvorgang ist für einen industriellen Umsatz viel zu teuer (Hummel, 1997 [81]). In den letzten Jahrzehnten wurden daher eine Reihe multipler Regenerationsprozesse entwickelt.

### 3. Regenerierungssysteme für Cosubstrate

In zellfreien Redoxprozessen muss ein effizientes ökonomisches System für eine kontinuierliche Regenerierung des Cosubstrates zur Verfügung stehen (Hummel, 1997 [81]). Die dafür notwendige Anzahl der Recyclingzyklen hängt dabei stark von dem Wert des chiralen Produkts ab. Generell sollte die gewählte Methode den Cofaktor jedoch 100 bis 100.000 mal regenerieren können (Wong and Whitesides, 1994 [232]). Über die letzten Jahrzehnte wurden zahlreiche Regenerierungsmethoden für Cofaktoren entwickelt, die entweder auf enzymatischen oder chemischen Systemen beruhen (Wichmann and Vasic-Racki, 2005 [227]; Chenault and Whitesides, 1987 [25]).

#### 3.1. Enzymatische Cofaktor Regenerierung

Man unterteilt die Systeme, bei denen die Cosubstrat Regenerierung ebenfalls über eine enzymatische Reaktion erfolgt, in Enzym-gekoppelte und Substrat-gekoppelte Cofaktor Recyclingmethoden (Peters, 1998 [152]). Bei der Enzym-gekoppelten Reaktion werden insgesamt zwei verschiedene Enzyme verwendet, eines für den eigentlichen Umsatz und ein anderes für die Cosubstrat Regenerierung. Das zweite Enzym sollte dabei unbedingt eine vom ersten Enzym genügend unterschiedliche Substratspezifität besitzen, um Beeinträchtigungen der Reaktion zu vermeiden. Der Regenerierungsprozess wird dabei meist durch kommerziell erhältliche Enzyme vorgenommen, wie beispielsweise die Laktat-Dehydrogenase (siehe Abbildung 1) für die *in situ* Regenerierung von  $\text{NAD}^+$  (Lee and Whitesides, 1985 [119]) und die Formiat-Dehydrogenase für das Recycling von  $\text{NADH}$  (Kragl et al., 1996 [114]; Schütte et al., 1976 [191]).

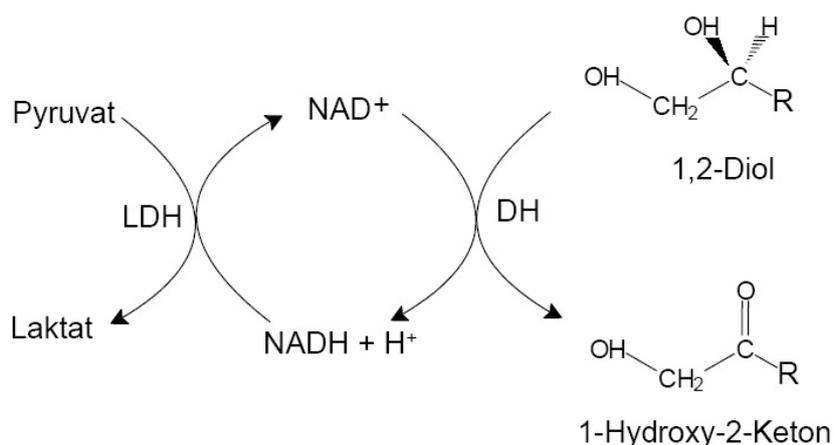


Abbildung 1.: Modellreaktion für eine Enzym-gekoppelte Dinukleotid Regenerierung, die Oxidation von  $\text{NADH}$  durch die Laktat-Dehydrogenase.

Grundsätzlich wird der Regenerierungsprozess der oxidierten Form durch eine ungünstige Thermodynamik und eine Produkt-Inhibierung behindert (Lee and Whitesides, 1986 [120]). Der Vorteil des Formiat-System liegt nicht nur an dem relativ kostengünstigen Formiat, sondern auch darin, dass dieses zu Kohlenstoffdioxid oxidiert wird (siehe Abbildung 2).

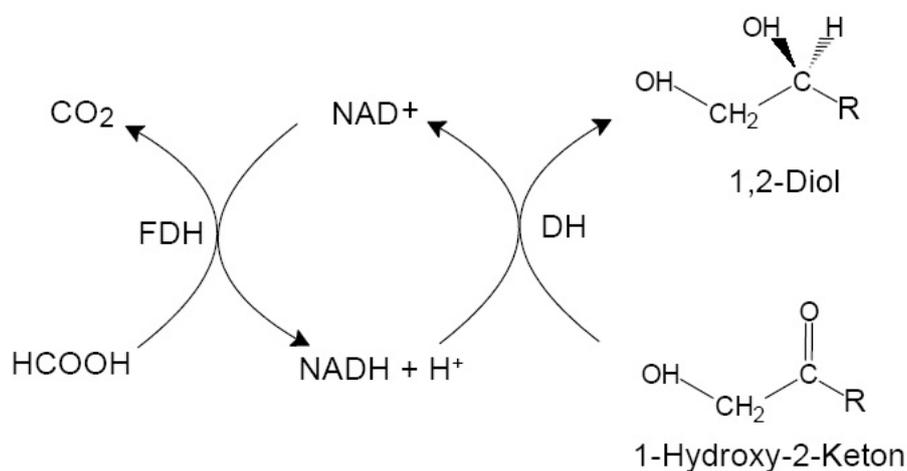


Abbildung 2.: Modellreaktion für eine Enzym-gekoppelte Dinukleotid Regenerierung, die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  durch die Formiat-Dehydrogenase.

Das entstandene Coprodukt entweicht dabei aus der Produktlösung und kann somit keine Endprodukt-Inhibierung auslösen. Das Reaktionsgleichgewicht wird zudem in Richtung des  $\text{CO}_2$  verschoben, was die Effizienz der Cofaktor Regenerierung steigert. Der größte Nachteil der Enzym-gekoppelten Regenerierungssysteme besteht grundsätzlich aus einer kompetitiven Hemmung durch das Substrat oder das Produkt (Kula et al., 1980 [115]). Zudem muss ein zweites Enzym verwendet werden, was zusätzliche Kosten verursacht und auf dessen Charakteristika, wie pH- und Temperaturoptimum, die eigentliche Reaktion abgestimmt werden muss (Peters, 1998 [152]). Vorteile sind dagegen, dass das Reaktionsgleichgewicht beeinflusst werden kann und hohe Umsatzraten von über 600.000 erreicht werden können (Schmidt et al., 1987 [183]). Jedoch ist es notwendig die Aktivitätsratio für jedes Enzym paar anzupassen, um weder einen Mangel noch einen Überschuss an Reduktionsäquivalenten zu erhalten (Peters, 1993 [151]).

Im Gegensatz zur Enzym-gekoppelten Reaktion, werden bei der Substrat-gekoppelten Regenerierung beide Reaktionen von einem einzigen Enzym durchgeführt (siehe Abbildung 3). Dabei dient das Zusatzsubstrat zur Cosubstrat Regenerierung, meist ein kostengünstiger Alkohol als Hydriddonor (siehe Abbildung 4) und wird in großen Mengen zugegeben, um das Reaktionsgleichgewicht in die gewünschte Position zu ver-

schieben (Wichmann and Vasic-Racki, 2005 [227]; Peters, 1998 [152]). Zum Beispiel kann eine ADH die Reduktion eines prochiralen Ketons zu einem chiralen Alkohol katalysieren und gleichzeitig das Cofaktor Recycling durch Oxidation eines der meist verwendeten Zusatzsubstrate 2-Propanol zu Aceton durchführen (Schroer et al., 2007 [190]; Findrik et al., 2005 [43]).

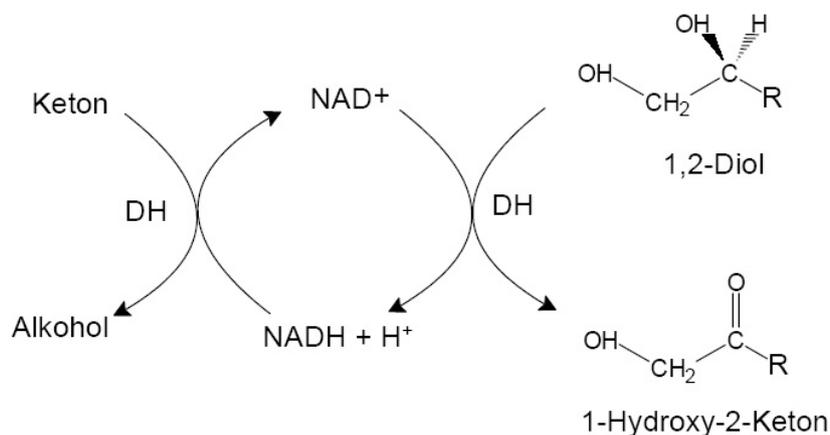


Abbildung 3.: Modellreaktion für eine Substrat-gekoppelte Dinukleotid Regenerierung, die Reduktion von NAD<sup>+</sup> durch Verwendung eines zweiten Hydroxylsubstrates.

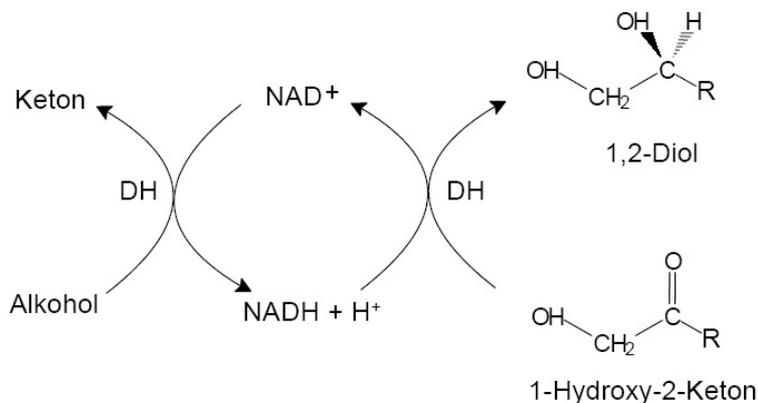


Abbildung 4.: Modellreaktion für eine Substrat-gekoppelte Dinukleotid Regenerierung, die Oxidation von NADH durch Verwendung eines zweiten Ketonsubstrates.

In kontinuierlichen Synthesen können dabei Ausbeuten von mehr als 80% und Umsatzraten von mehr als 10<sup>6</sup> erreicht werden, die die Produktivität eines vergleichbaren Enzym-gekoppelten Systems um das 2,5-fache steigern kann (Peters, 1998 [152]). Nachteile dieses Systems sind Probleme bei der Produktisolierung und eine Enzymhemmung anhand der hohen Konzentration des Zusatzsubstrates, sowie die Akkumulation von hoch reaktiven Carbonylspezies wie Acetaldehyd oder Cyclohexanon (Peters, 1998 [152]).

### 3.2. Elektrochemische Cofaktor Regenerierung

Die nicht-enzymatischen Methoden der Cofaktor Regenerierung lassen sich in chemische, elektrochemische und photochemische Methoden einteilen (Kornberger et al., 2009 [112]; Wichmann and Vasic-Racki, 2005 [227]; Peters, 1998 [152]). Eine kostengünstige, jedoch instabile chemische Methode für die Reduktion von  $\text{NAD(P)}^+$  ist beispielsweise die Verwendung von Natriumdithionit, welches allerdings eine sehr niedrige Umsatzrate besitzt und Enzyme reduktiv inaktivieren kann (Jones et al., 1972 [89]). Photochemische Methoden benötigen zur Cofaktor Oxidation sogenannte Photosensibilisatoren, wie Tris(bipyridin)ruthenium (II) (Mandler and Willner, 1984 [125]), Meso-Tetra-Methylpyridin-Porphyrinzink(II) (Mandler and Willner, 1986 [126]) oder Methyleneblau (Julliard and Lepetit, 1982 [95]). Steckhan et al., 1991 [200] und Ruppert et al., 1978 [171] entwickelten ein Recyclingsystem für  $\text{NAD(P)}\text{H}_2$  mit einem Rhodium-Bipyridin-Komplex als Redoxkatalysator und entweder einer Elektrode oder Formiat als Donor. Die größte Schwierigkeit besteht bei diesen Methoden in dem gleichzeitigen Transfer von zwei Elektronen, was eine Dimerbildung zur Folge hat. Deswegen werden Mediatoren wie Viologen oder Rhodiumkomplexe eingesetzt, jedoch lassen sich dadurch Probleme wie eine niedrige Stereoselektivität (Mandler and Willner, 1986 [126]), Inaktivierung des Coenzym (Hollmann and Schmid, 2004 [76]; Peters, 1998 [152]), Nebenreaktionen und niedrige Umsatzzaten (Chenault and Whitesides, 1987 [25]) nicht vermeiden.

Die elektrochemische Cofaktor Regenerierung stellt eine kostengünstigere Alternative zu den chemischen oder enzymatischen Methoden dar. In den letzten Jahrzehnten wurden viele elektroenzymatische Systeme für die Entwicklung von Biosensoren und elektrochemische Cofaktor Regenerierungsreaktionen für biotechnologische Produktionsprozesse untersucht (DevauxBasseguy et al., 1997 [35]; Bergel and DevauxBasseguy, 1996 [15]). Grundsätzlich ist dabei die Oxidation eines Cofaktors einfacher durchzuführen, als die Reduktion, da die Ansprüche an die Regioselektivität bei der Oxidationsreaktion geringer sind. Bei beiden Systemen lassen sich direkte Methode an der Elektrodenoberfläche und indirekte Methoden über Redoxmediator-Moleküle unterscheiden. Als Mediatoren werden Elektronentransfer-Katalysatoren oder allgemeiner als Vermittler von Reduktionsäquivalenten wie Elektronen und Hydride bezeichnet (Schröder, 2003 [189]). Eine direkte Oxidierung des Cosubstrates (siehe Abbildung 5) ist deswegen interessant, da keine zusätzlichen Enzyme, Substrate oder Mediatoren benötigt werden und die thermodynamische Triebkraft vom angelegten Elektrodenpotential bestimmt wird (Saidman and Bessone, 2000 [172]; Drakesmith and Gibson, 1988 [37]). Die Oxidierung von  $\text{NAD(P)}\text{H}$  an einer Anode wird allerdings erst bei hohen

Überspannungen erreicht und kann zur Oxidation anderer Substanzen wie Aldehyde, Phenole und Alkohole oder zu einer Inhibierung der Enzyme führen (Musameh et al., 2002 [140]; Tse and Kuwana [220]). Außerdem können in der Nähe der Elektrode Überoxidations- und Radikalfolgeprodukte vermehrt auftreten (Schröder, 2003 [189]).

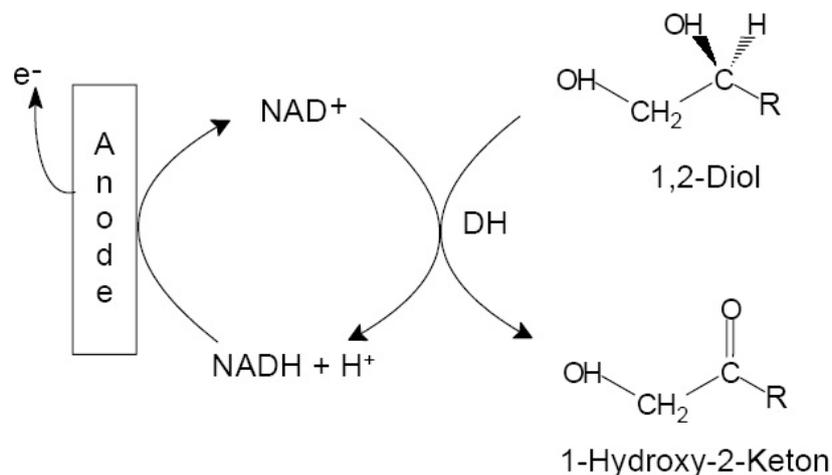


Abbildung 5.: Modellreaktion für eine direkte elektrochemische Dinukleotid Oxidation von NADH an der Anodenoberfläche.

Es lassen sich zwar enzymatische Synthesen mit dieser Methode durchführen, jedoch können diese nicht auf einen größeren Maßstab übertragen oder für analytische Zwecke genutzt werden (Fassoune et al., 1990 [40]). Bei der indirekten Oxidation (siehe Abbildung 6) werden Redoxmediator-Moleküle eingesetzt, die entweder in Lösung oder an die Elektrodenoberfläche immobilisiert sind (Hollmann and Schmid, 2004 [76]; Gorton and Dominguez, 2002 [59]).

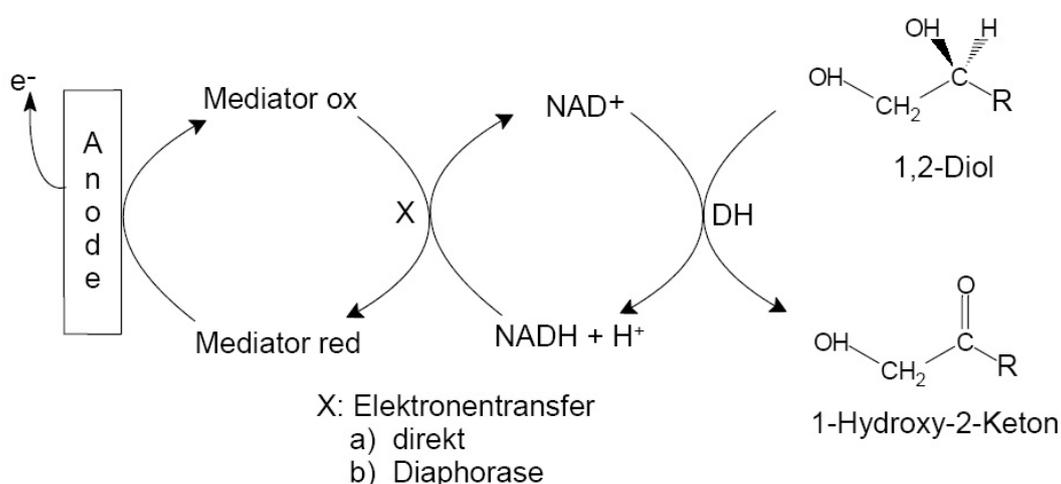


Abbildung 6.: Modellreaktion für eine elektrochemische Dinukleotid Oxidation von NADH mittels eines Mediators an der Anodenoberfläche.

Der Mediator dient zur Herabsetzung der Überspannung und wird nach der Elektroenaufnahme von dem reduzierten Cosubstrat selber wieder an der Anode recycelt (Gajdzik, 2007 [49]). Als Mediatoren eignen sich verschiedenartige Substanzen, die auf das jeweilige System abgestimmt werden müssen. Beispielsweise wurden in enzymfreien Ansätzen eine Reihe von Azinen (Karyakin et al., 1999 [102]), wie die Farbstoffe Methylenblau, Azur A, Meldola Blau und Toluidine Blau O (Persson and Gorton, 1990 [150]) als Mediatoren eingesetzt. Besonders effiziente Mediatoren stellen Moleküle dar, die gleichzeitig aus aromatischen Hydroxylaminen und Nitrosogruppen bestehen. Diese werden *in situ* aus einem 2-Nitro-9-fluorenol durch elektrochemische Reduktion gewonnen und bilden das reversible Redoxpaar NHOH/NO (Mano and Kuhn, 2001 [128] und 1999 [127]). Die Sorbitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides*, die die Transformation von D-Sorbitol zu Fruktose katalysiert, wurde zusammen mit einem solchen Mediator, dem (4-Carboxy-2,5,7-Trinitrofluorenylidene)-malon-nitrile (CTFM), in einem System mit einer erfolgreichen elektrochemischen  $\text{NAD}^+$  Regenerierung eingesetzt (Gajdzik et al., 2007 [50]).

Der Cofaktor 1,4-NADH ist verhältnismäßig teuer, lässt sich aber auf direktem Wege über die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  an einer Kathode (siehe Abbildung 7) regenerieren (Burnett and Underwood, 1965 [23]). Diese Reaktion führt jedoch zur Bildung inaktiver Reduktionsäquivalente wie 1,6-NADH-Isomeren (Jaegfeldt, 1981 [87]) oder 4,4'-Dimeren (Gorton, 2002 [58]) und benötigt zudem hohe Überspannungen.

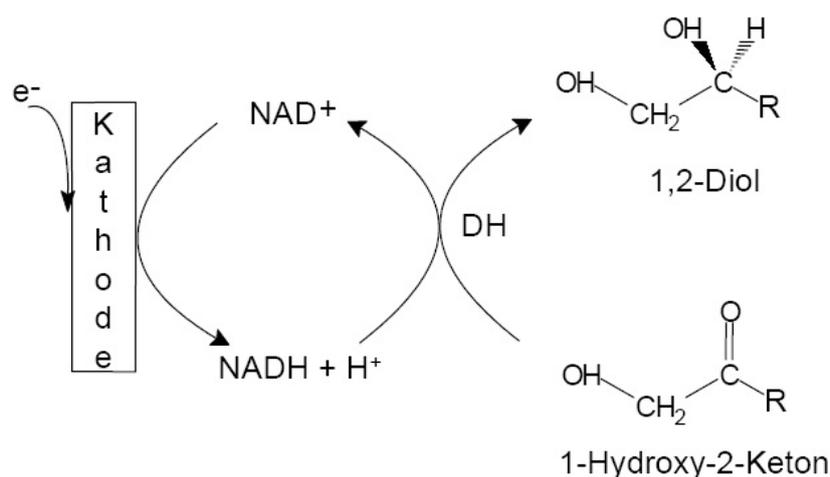


Abbildung 7.: Modellreaktion für eine direkte elektrochemische Dinukleotid Reduktion von  $\text{NAD}^+$  an der Kathodenoberfläche.

Aufgrund der Probleme, die bei einer direkten reduktiven Regenerierung eines Cosubstrates auftraten, wurden von Steckhan, 1994 [199] verschiedene Anforderungen

an passende Mediatoren für indirekte Regenerationssysteme, wie die gleichzeitige Übertragung von zwei Elektronen oder Hydridionen lediglich an den Cofaktor und eine Aktivierung bei weniger negativen Potentialen als  $-0.9\text{ V}$ , gestellt (siehe Abbildung 8). Salimi et al., 2009 [175] konnten für verschiedene Rutheniumkomplexe in Nanotubes aus Kohlenstoff eine effiziente Elektroreduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  demonstrieren. Auch Methylviologene wurden erfolgreich in Systemen eingesetzt, die entweder Diaphorasen, Lipoamid-Dehydrogenasen, Ferredoxin-Reduktasen oder sogenannte AMAPORs (*artificial mediator accepting pyridine nucleotide oxidoreductases*) enthalten und den Elektronenfluss von dem von der Elektrode reduzierten Methylviologen zum  $\text{NAD}^+$  ermöglichen (Voivodov et al., 1995 [222]; Fry et al., 1994 [45]).

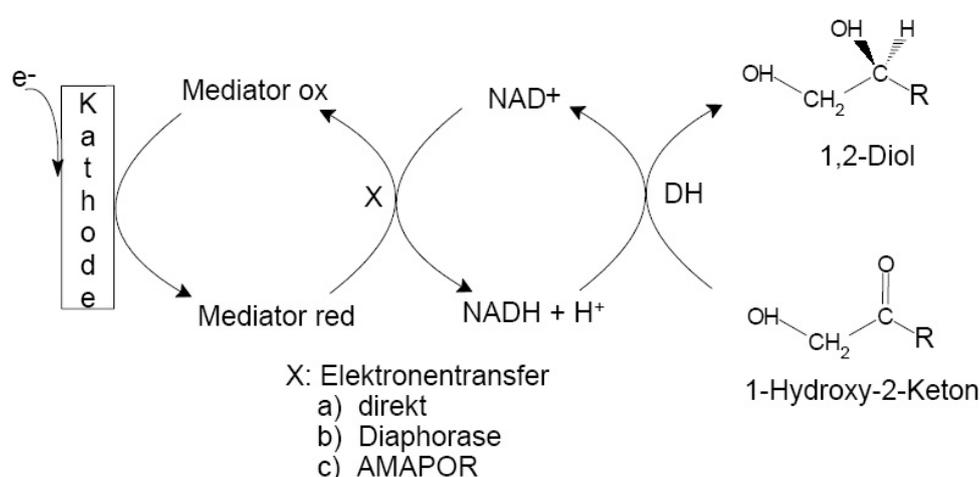


Abbildung 8.: Modellreaktion für eine elektrochemische Dinukleotid Reduktion von  $\text{NAD}^+$  mittels eines Mediators an der Kathodenoberfläche.

### 3.3. Elektrochemische Charakterisierung anhand der cyclischen Voltammetrie

Mit Hilfe der Cyclovoltammetrie (CV) ist es möglich, thermodynamische und kinetische Parameter von heterogenen Elektronentransfer-Reaktionen zu messen (Schröder, 2003 [189]). Dabei ist es sogar möglich, katalytische Reaktionen von enzymatischen Umsätzen mittels der CV zu beobachten und die Geschwindigkeitskonstanten zu ermitteln (Antiochia et al., 2001 [7]). Zur Durchführung einer CV-Messung wird eine sogenannte Drei-Elektrodenanordnung (siehe Abbildung 9), bestehend aus einer Arbeitselektrode (AE) mit definierter Oberfläche (z.B. Gold), einer Gegenelektrode (G) (meist ein Platindraht) und einer Bezugselektrode (R) benötigt (Schröder, 2003 [189]). An die Arbeitselektrode wird dabei ausgehend von einem Anfangspotential  $E_i$  ein sich

zeitlich linear änderndes Potential  $E(t)$  angelegt, das nach Erreichen des Umkehrpotentials  $E(\lambda)$  mit gleicher Vorschubgeschwindigkeit (ca.  $1 \text{ mV s}^{-1}$  bis zu mehreren  $10 \text{ kV s}^{-1}$ ) zum Ausgangspotential zurückgeführt wird (Schröder, 2003 [189]). Der Aufbau der CV-Messung umfasst neben einer elektrochemischen Zelle einen Potentiostat und einen Funktionsgenerator, der die Dreiecksspannung der zeitlichen Potentialänderung der Arbeitselektrode vorgibt. Für ein reversibles Redoxpaar, bei dem nur ein Elektron übertragen wird, erhält man dann beispielsweise ein CV, wie es in Abbildung 10 schematisch dargestellt ist.

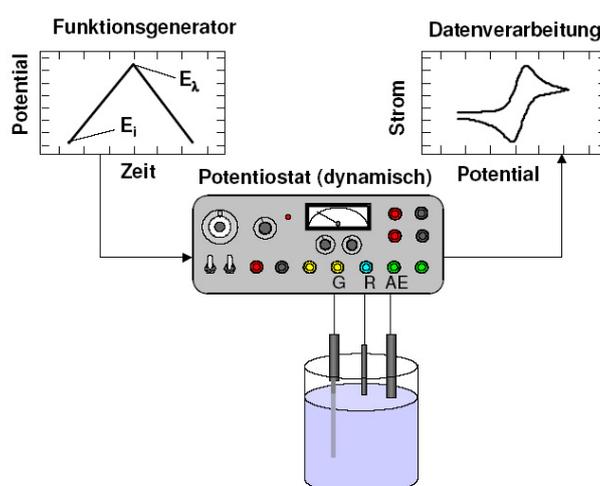


Abbildung 9.: Apparativer Aufbau für cyclovoltammetrische Messungen. Abbildung aus Schröder, 2003 [189].

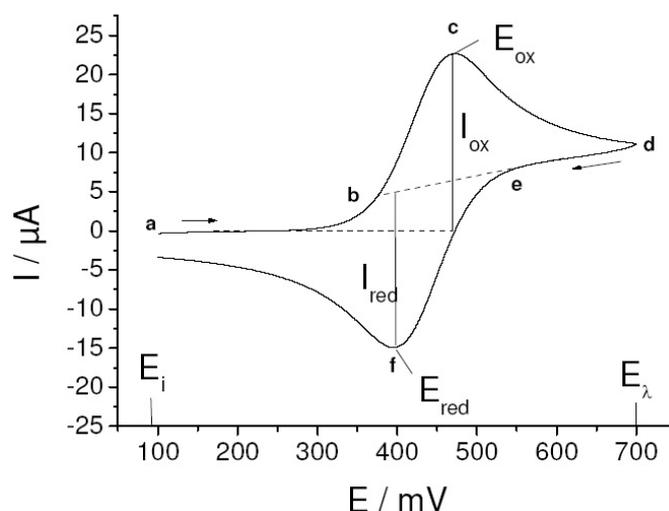


Abbildung 10.: Allgemeiner Aufbau eines Cyclovoltammogramms. Abbildung aus Schröder, 2003 [189].

Bei dem resultierenden CV wird dabei eine Messgröße (Stromstärke) in Abhängigkeit von einem angelegten Potential untersucht (Gajdzik, 2007 [49]). Sobald das Potential zur Oxidation eines Substrates ausreicht, steigt der Strom an, bis nach dem Erreichen eines anodischen Peakmaximums ( $E_{ox}$ ) die Konzentration des oxidierten Substrates an der Elektrodenoberfläche wieder abnimmt. Der Strom fällt mit sinkender Konzentration wieder ab und die Polarisierung der Arbeitselektrode kehrt sich um. Die nun erfolgende Reduktion des Substrates zeigt sich schließlich in einer abnehmenden Stromstärke bis zu einem negativen kathodischen Peak bei 400 mV ( $E_{red}$ ).

## 4. Der Organismus *Rhodobacter sphaeroides*

*Rhodobacter sphaeroides* gehört zu den Purpur-Eubakterien, genauer zu den photosynthetischen, schwefelfreien  $\alpha$ -3-Proteobakterien, und ist fähig unter phototrophen, lithotrophen und heterotrophen Bedingungen zu wachsen (Zhou et al., 2003 [240]; van Niel, 1944 [221]). Je nach Sauerstoffangebot kann der Organismus aerob oder anaerob in Anwesenheit von Licht, durch die Verwendung externen Elektronenakzeptoren wie Wasserstoff oder reduzierten organischen Verbindungen wachsen. Der Organismus besitzt eine typische Gram-negative Morphologie und bildet bei anaerobem Metabolismus intracytoplasmatische Membranausstülpungen mit photosynthetischen Membrankomplexen aus (Kiley and Kaplan, 1988 [108]). Natürliche Standorte sind flache, stehende Gewässer wie Seen und Teiche, in denen eine rasche Zersetzung organischer Materialien stattfindet (Stein, 1998 [201]). Als einer der metabolisch vielfältigsten Mikroorganismen kann er eine Vielzahl von Verbindungen, wie organische Säuren, Zucker, Polyole, Methanol und das toxische Formaldehyd oxidieren (Zhou et al., 2003 [240]; Barber and Donohue, 1998 [11]; Imhoff et al., 1984 [84]; Pfenig and Trüper, 1971 [154]). Ebenso kann er organische oder anorganische Verbindungen wie Thymine, Sulfate und giftige Metalloxide reduzieren (Moore and Kaplan, 1992 [137]). *Rhodobacter sphaeroides* diente aufgrund seiner metabolischen Vielfalt als idealer Modellorganismus für eine Reihe von Untersuchungen beispielsweise über das Photosynthesesystem, Membranbiosynthesen und den Zellwandaufbau (Zhou et al., 2003 [240]).

In dem Stamm *Rhodobacter sphaeroides* Si4 wurden bereits mehrere Polyol-Dehydrogenasen, eine dimere Sorbitol-, eine monomere Mannitol- und eine dimere Ribitol-Dehydrogenase identifiziert und beschrieben (Kahle et al., 1992 [97]; Schneider and Giffhorn, 1989 [186]). Der Organismus ist aufgrund dieser Dehydrogenasen dazu in der Lage verschiedene Substrate wie D-Mannitol, D-Glucitol, D-Arabitol, Ribitol und

Xylitol zu metabolisieren. Durch ein Chemostatenexperiment wurde ein neuer Galaktitol-metabolisierender Mutationsstamm des Organismus, *Rhodobacter sphaeroides* D, isoliert und aus diesem eine neue, bisher unbekannte, konstitutiv exprimierte Galaktitol-Dehydrogenase isoliert und charakterisiert (Schneider et al., 1995 [188]). Das Gen der Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) konnte anhand von Homologievergleichen zum sequenzierten *type strain 2.4.1* ebenfalls wie die anderen bekannten Polyol-Dehydrogenasen des Organismus, auf dem Hauptchromosom 1 identifiziert werden (Zimmer, 2006 [242]). Dabei ist das GatDH-Gen an einer anderen Position, etwa 800 kbp entfernt von dem bereits genauer untersuchten *smo*-Operon (Stein et al., 1997 [202]) lokalisiert. Der Organismus *Rhodobacter sphaeroides* ist überhaupt das erste Bakterium, bei dem zwei unterschiedliche Chromosomen nachgewiesen werden konnten (Suwanto and Kaplan, 1989 [209]), wobei viele Gene als Duplikate auf beiden Chromosomen liegen und strukturell gleich sind, jedoch meist unterschiedlich reguliert werden (Choudhary et al., 1997 [27]; Suwanto and Kaplan, 1992 [210]).

## 5. Anwendungspotential der Galaktitol-Dehydrogenase

Wie bereits in Kapitel 2 allgemein für Dehydrogenasen angesprochen, wächst in der pharmazeutischen und agrochemischen Industrie der Trend durch enantioselektive organische Synthesen enantiomerenreine Produkte herzustellen. Alkoholdehydrogenasen (E.C.1.1.1.1), auch als Keto-Reduktasen bezeichnet, repräsentieren eine wichtige Gruppe von Biokatalysatoren aufgrund ihrer Fähigkeit prochirale Carbonylverbindungen stereospezifisch zu reduzieren (Abokitse and Hummel, 2003 [1]). Sie können so für eine effiziente und selektive Synthese optisch aktiver Alkohole genutzt werden (Patel, 1997 [148]; Hilborn et al., 2001 [74]). Diese Produkte sind von hohem ökonomischen Wert, da sie sich als Nahrungszusätze oder chirale Verbindungen in der Synthese von Medikamenten und Feinchemikalien einsetzen lassen (Goldberg et al., 2007 [56]; Hummel, 1997 [81]). Die verschiedenen Enantiomere der bioaktiven chiralen Moleküle weisen jedoch auch meist verschiedene biologische Aktivitäten auf, wobei oft nur eines der Enantiomere die gewünschte Aktivität besitzt, während das andere entweder gar keinen Effekt hat oder sogar schädlich sein kann (Gavrilescu and Chisti, 2005 [53]). So beruhte die Aktivität des bereits in den fünfziger Jahren entwickelten Herbizids Mecoprop ausschließlich auf dem (R)- und nicht dem (S)-Enantiomer (Matell, 1953 [130]). Ein besonders folgenschweres Beispiel zeigte das unter dem Namen Contergan im Jahr 1956 auf den deutschen Markt gebrachte, racemische Schlafmittel Thalidomid (Mujagic et al., 2002 [139]). Chemisch handelt es sich dabei um das  $\alpha$ -N-Phthalimidglutarimid, wobei das L-Isomer eine teratogene Wirkung auf die

Entwicklung von noch ungeborenen Föten besaß und nur das R-Isomer die sedative Wirkung zeigte (Quilitz, 1999 [159]). Dies führte schließlich zu der Regelung, dass alle chiralen Enantiomere komplett charakterisiert werden müssen (Breuer et al., 2004 [19]). Methoden, die zum Erhalt optisch reiner Verbindungen führen, sind Enantiomertrennung von racemischen Gemischen, Ableitung aus natürlichen Substanzen und asymmetrische Synthesen (Wada et al., 2004 [224]). Die Biokatalysatoren können dabei als isolierte Enzyme oder als Ganzzell-Katalysatoren eingesetzt werden (Schroer et al., 2007 [190]). Die Mehrheit der für die Synthese von chiralen Alkoholen verwendeten Enzymen bilden (S)-Alkohole, wie die (S)-ADH aus *Rhodococcus erythropolis*, aber auch (R)-spezifische Alkohol-Dehydrogenasen aus *Lactobacillus*-Stämmen wurden beschrieben und charakterisiert (Hummel, 1997 [81]; Hummel, 1990 [80]). Die Vorteile der Biotransformation von Carbonylverbindungen mit Hilfe von Enzymen an Stelle von Chemikalien sind mildere Reaktionsbedingungen und eine höhere Regio- und Stereoselektivität (Hosono et al., 1990 [77]). Außerdem sind die Produkte aus biotechnischen Produktionen meist reiner, womit aufwendige Aufarbeitungen und Reinigungsmethoden entfallen (Festel et al., 2004 [41]).

Die Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) wurde aufgrund ihrer Fähigkeit Galaktit zu L-Tagatose zu oxidieren (siehe Abbildung 11A) im Mutationsstamm *Rhodobacter sphaeroides* D isoliert und charakterisiert (Schneider et al., 1995 [185]). Die NAD<sup>+</sup>/NADH-abhängige GatDH kann darüber hinaus eine Vielzahl von prochiralen Hydroxyketonen stereoselektiv reduzieren, bzw. Polyolverbindungen oxidieren (siehe Abbildung 11B). Bei kurzkettigen Diolen wird dabei bevorzugt das S-Enantiomer gebildet, was die Nutzung der GatDH für eine asymmetrische Synthese enantiomerenreiner Alkohole interessant macht. Alternativ ließe sich auch in einem racemischen Gemisch durch die hohe Stereoselektivität nur das S-Enantiomer oxidieren, wodurch eine Isolierung des R-Enantiomers möglich wäre (Kohring et al., 2003 [110]). Die Kristallstruktur der GatDH wurde von Scheidig und Carius (Veröffentlichung in Vorbereitung) aufgeklärt und zeigte eine Tetramerstruktur aus vier identischen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von je 26,4 kDa. Der N-Terminus der Monomere ist dabei jeweils an der Peripherie des Proteins lokalisiert, während der C-Terminus an der Komplexbildung zweier Magnesiumionen beteiligt ist. Für das homotetramere Protein ließ sich daher eine strenge Abhängigkeit der Aktivität von dem Vorhandensein zweiwertiger Kationen, wie Magnesium, nachweisen (Schneider et al., 1995 [188]; Jäkel, 1994 [88]). Dagegen inhibieren Zink- oder Eisensulfate die Aktivität der GatDH.

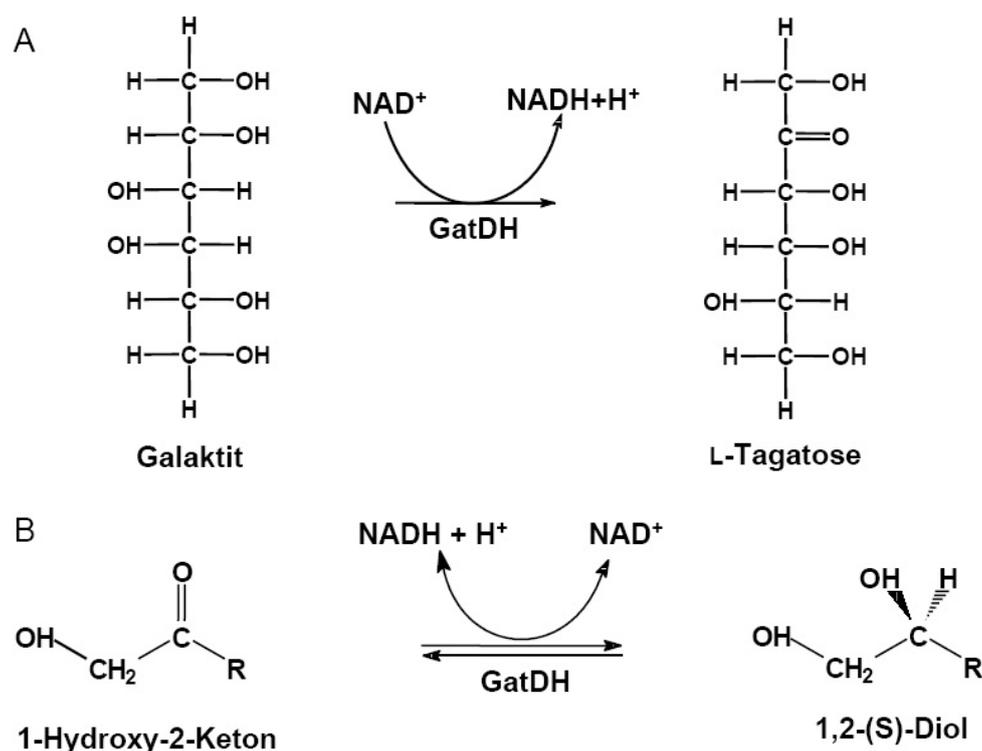


Abbildung 11.: Redoxreaktionen der Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH). A: Dehydrogenierung des Zuckeralkohols Galaktit zur L-Tagatose unter Verbrauch von  $\text{NAD}^+$ . B: Die Hydrogenierung kurzkettiger, aliphatischer 1-Hydroxy-Ketone führt zur Bildung von s-Diolen.

Das aus 254 Aminosäureresten pro Unterheit bestehende Enzym konnte der Familie der Zink-unabhängigen *short-chain* Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) zugeordnet werden und wies das für diese Gruppe typische N-terminale Cosubstrat Bindemotiv GXXXGXXG (GAGSGIG) auf. Ebenso konnte das charakteristische Motiv des aktiven Zentrums YXXXK (YMASKG) (Nidetzky et al., 1996 [142]) und das am aktiven Zentrum beteiligte, hochkonservierte Serin 144 nachgewiesen werden (Zimmer, 2006 [242]). Carius, 2009 [24] konnte die Bindung des Substrates 1,2-(s)-Pentandiol durch die Serine 144 und 146, Asparagin 151 und über das N-Atom des Cosubstrates  $\text{NAD}^+$  zeigen. In der entsprechenden R-Konfiguration wäre eine Stabilisierung des Substrates nicht möglich, was somit die enantioselektive Umsetzung der kurzkettigen 1,2-(s)-Dirole erklärt. Zudem konnte von Jung, 2008 [96] gezeigt werden, dass die GatDH Substrate nicht nur an der 2'-Position oxidieren bzw. reduzieren kann, sondern zusätzlich auch an der 1'-Position. Die Positionen der Aminosäurereste im aktiven Zentrum und des  $\text{NAD}^+$  ändern sich kaum, was die GatDH zu einem relativ starren Molekül macht (Carius, 2009 [24]). Die potenziellen aromatischen und aliphatischen Substrate (Jung, 2008 [96]) liegen dagegen in einem großen Hohlraum, wobei sich die Substrat-Bindeschleife, die von der Aminosäure 195 bis zur Aminosäure 205 reicht,

der Größe des Substrates beim Eindiffundieren, sowie beim Ausdiffundieren des Produktes gut anpassen kann (Carius, 2009 [24]). Diese Eigenschaft erklärt das breite Substratspektrum der GatDH, welches das Enzym zu einem interessanten Biokatalysator für die industrielle Anwendung macht.

## 6. Ziele dieser Arbeit

Grundlage dieser Arbeit war der Mutationsstamm *Rhodobacter sphaeroides* D, der aufgrund des Selektionsdruckes in einer Chemostatenanzucht aus dem Parentalstamm *Rhodobacter sphaeroides* Si4 entstanden war (Schneider et al., 1995 [188]; Schneider, 1990 [185]). Es konnte anschließend nachgewiesen werden, dass die in diesem Stamm neu auftretende Galaktitol-Dehydrogenase-Aktivität nicht durch Veränderung eines der bereits klassifizierten Proteine des Organismus, sondern durch die Aktivierung eines kryptischen Gens entstanden war (Zimmer, 2006 [242]). In dieser Arbeit sollte daher zunächst untersucht werden, auf welchen Mutationen bzw. Sequenzveränderungen diese Genaktivierung beruht. Dabei sollte sowohl der mögliche Einfluss eines potenziellen Regulatorproteins, als auch die Entstehung neuer genetischer Regulationselemente in der unmittelbaren Sequenzumgebung des GatDH-Gens, wie Promotoren und ribosomale Bindestellen, näher betrachtet werden. In früheren Arbeiten wurde eine Abhängigkeit der GatDH-Aktivität von Magnesiumionen gezeigt (Schneider et al., 1995 [188]; Jäkel, 1994 [88]). Um zu klären, ob diese Abhängigkeit mit dem Zusammenhalt bzw. der richtigen Konformation der homotetrameren Untereinheiten im Zusammenhang steht, oder doch lediglich für die Aktivität des Enzyms notwendig ist, sollte eine Enzymvariante hergestellt werden, die nicht mehr dazu in der Lage war die Magnesiumionen zu komplexieren. Eine Kristallisation dieser Variante sollte dabei die Rolle der Magnesiumionen für die Struktur bzw. Funktionalität der GatDH besser verständlich machen. Schließlich sollte durch die Herstellung verschiedener Enzymvarianten, die auf eine Verwendung in einem elektroenzymatischen Bioreaktor optimiert wurden, die Anwendbarkeit der GatDH für die industrielle Produktion von Feinchemikalien gezeigt werden.

## II. Material und Methoden

### 1. Organismen, Stämme, Plasmide und Primer

#### 1.1. Organismen und Stämme

In dieser Arbeit wurden verschiedene Stämme des Organismus *Rhodobacter sphaeroides* zur Analyse der Galaktitol-Dehydrogenase-Expression kultiviert (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1.: Organismen zur Untersuchung auf Galaktitol-Dehydrogenase-Aktivität und der Sequenzumgebung des GatDH-Gens.

Organismus	Bezugsquelle
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	DSM 158, DSMZ, Braunschweig
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4	abteilungseigene Stammsammlung
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> D	abteilungseigene Stammsammlung

Zur Sequenzierung eines Genabschnitts wurde der Klonierungsstamm Top 10 One Shot verwendet. Zur Expression der jeweiligen Konstrukte diente ein *Escherichia coli* BL21(DE3)-Stamm (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2.: In den Experimenten eingesetzte Stämme zur Zwischenklonierung und Expression.

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Top 10 One Shot ( <i>E. coli</i> )	F <sup>-</sup> , mcrA, D (mrr-hsdRMS-mcrBC), F80lacZD M15, DlacX74, recA1, deoR, araD139, D(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (STr <sup>R</sup> )endA, nupG	Zwischenklonierung	Invitrogen, Karlsruhe
BL21-Gold(DE3) ( <i>E. coli</i> )	F <sup>-</sup> ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> gal λ(DE3) endA HTe	Expression	Stratagene, Waldbronn
BL21(DE3) ( <i>E. coli</i> )	F <sup>-</sup> dcm ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal λ(DE3)	Expression	Stratagene, Waldbronn

## 1.2. Plasmide

Für die Klonierung der Gensequenzen wurden je nach Verwendungszweck zwei verschiedene Ausgangsplasmide benutzt (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3.: In den Experimenten eingesetzte Ausgangsplasmide und ihr Verwendungszweck.

Vektor/ Plasmid	kb	Eigenschaften	Verwendungszweck	Quelle
pCRII-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>	Zwischenklonierung	Invitrogen, Karlsruhe
pET24a(+)	5,31	Expressionsvektor für <i>E.coli</i> , Kan <sup>r</sup>	Expression	Novagen, Darmstadt

Um bestimmte Gensequenzen zu sequenzieren oder die Klonierung in den Expressionsvektor zu erleichtern, wurden manche Konstrukte in den pCRII-TOPO-Vektor zwischenkloniert (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4.: Zur Zwischenklonierung und Sequenzierung mit Hilfe des TOPO-TA-Klonierungskits (Invitrogen, Karlsruhe) konstruierte pCRII-TOPO-Plasmide.

Plasmidbezeichnung [pCRII-TOPO-]	integrierte Amplifikate
D-GntR+GatDH	GntR-ähnliches Protein und Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D mit kompletter Zwischensequenz
D-GntR-VS-GatDH	GntR-ähnliches Protein, Teil der Galaktitol-Dehydrogenase und komplette Zwischensequenz aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D
D-SiteFinding-1,4kb	1,4 kb-Fragment aus SiteFinding-PCR von <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D
D-SiteFinding-1,0kb	1,0 kb-Fragment aus SiteFinding-PCR von <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D
nestedGDH-D	Galaktitol-Dehydrogenase und flankierende Sequenzen aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D, aus abteilungseigener Stammsammlung
nestedGDH-Si4	Galaktitol-Dehydrogenase und flankierende Sequenzen aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4, aus abteilungseigener Stammsammlung
Si4-GntR+GatDH	GntR-ähnliches Protein und Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4 mit kompletter Zwischensequenz
Si4-GntR-VS-GatDH	GntR-ähnliches Protein, Teil der Galaktitol-Dehydrogenase und komplette Zwischensequenz aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4

Zur heterologen Expression der Konstrukte wurden diese in den pET24a(+)-Vektor kloniert (vgl. Tabelle 5).

Tabelle 5.: Expressionsvektor pET24a(+) (Novagen, Darmstadt) mit den integrierten Genen.

<b>Plasmidbezeichnung [pET24a(+)-]</b>	<b>integrierte Amplifikate</b>
2Cys-GatDH	N-terminal mit zwei Cysteinen modifizierte und His(6)-getagte Galaktitol-Dehydrogenase
3Cys-GatDH	N-terminal mit drei Cysteinen modifizierte und His(6)-getagte Galaktitol-Dehydrogenase
4Cys-GatDH	N-terminal mit vier Cysteinen modifizierte und His(6)-getagte Galaktitol-Dehydrogenase
5Cys-GatDH	N-terminal mit fünf Cysteinen modifizierte und His(6)-getagte Galaktitol-Dehydrogenase
D-GntR+GatDH	GntR-ähnliches Protein und Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D mit kompletter Zwischensequenz
D-L26PGntR+GatDH	GntR-ähnliches Protein mit Aminosäureaustausch Leucin gegen Prolin an Position 26 und Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D mit kompletter Zwischensequenz
D-VS+GatDH	Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D mit Sequenzstück vor GatDH-Gen
GatDH251	C-terminal um drei Aminosäuren verkürzte Galaktitol-Dehydrogenase
nGDH(D)	wildtyp-Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D, aus abteilungseigener Stammsammlung
NHis-GatDH	N-terminal His(6)-getagte Galaktitol-Dehydrogenase
Si4-GntR+GatDH	GntR-ähnliches Protein und Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4 mit kompletter Zwischensequenz
Si4-P26LGntR+GatDH	GntR-ähnliches Protein mit Aminosäureaustausch Prolin gegen Leucin an Position 26 und Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4 mit kompletter Zwischensequenz
Si4-VS+GatDH	Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4 mit Sequenzstück vor GatDH-Gen

### 1.3. Primer

Für die Amplifizierung bestimmter Sequenzabschnitte zur Herstellung verschiedener Konstrukte wurden aus der Nukleotidsequenz spezifische Primer abgeleitet (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6.: In den Experimenten eingesetzte Primer (Sigma-Aldrich, München). T(m) = melting temperature = Schmelztemperatur.

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5' → 3')	T <sub>m</sub> °C
2GDH- <i>NdeI</i> -Cys(5)/His	52	AGGAGATATACATATGTGCTGCTGCTGCT-GCCACCACCACCACCACGAC	84,4
D_gntR-GatDH-f	21	GCGAAATCCGGCGATTGGCTC	64,3
D_Quik-GntR_t77c-f	27	GAGGATCCGAGCCCGCTCTGGGTGCAG	73,7
D_Quik-GntR_t77c-r	27	CTGCACCCAGAGCGGGCTCGGATCCTC	73,7
GatDH-GSP2	24	TCATCGCCTCCGCATCCGTCACGT	69,8
GatDH-GSP3	24	CGCGAAGGCCGGCAGATTTTCGAG	71,2
GDH- <i>Bam</i> HI-r	41	CAGAATTCGGATCCTCACCAGACCGTGTA-CCGCCATCGAC	79,8
GDH-f	23	ATGGACTACAGGACGGTTTTTCG	56,1
GDH- <i>Hind</i> III-r	41	CCAAATTC AAGCTTTCACCAGACCGTGTA-ACCGCCATCGAC	78,4
GDH-HIS(6)- <i>Bam</i> HI	51	GGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC-CAGACCGTGTAACCGCCATCGAC	88,3
GDH- <i>NdeI</i> -Cys(2)/His	43	AGGAGATATACATATGTGCTGCCACCACCAC-CACCACCACGAC	82,9
GDH- <i>NdeI</i> -Cys(3)/His	43	AGGAGATATACATATGTGCTGCTGCCACCAC-CACCACCACCAC	84,6
GDH- <i>NdeI</i> -Cys(4)/His	56	AGGAGATATACATATGTGCTGCTGCTGCCA-CCACCACCACCACCACGACTACAGGA	84,3
GDH- <i>NdeI</i> -f	34	AATTCGCCCATATGGACTACAGGACGGTTT-TTCG	71,0
GDH-r	27	TCACCAGACCGTGTAACCGCCATCGAC	68,9
GDH-RACE-inner	26	GAATTGACGAGGATCGAGACCGGCGC	69,6
GntR-f	22	ATGGAAGACGGCGACAGCGCCG	68,7
GntR-r	25	TTAATGTGCGTCCGTTGCGACGTGG	67,9
M13reverseCS(-49)	24	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	61,0
M13universalCS(-43)	23	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT	62,4
<i>NdeI</i> _gntR-GatDH-f	31	AAAACATATGGAAGACGGCGACAGCGC-CGA	73,4
nGDH-A3-251/ <i>Bam</i> HI	41	CGTTCATCGCCTCAGGATCCTCAGTAACC-GCCATCGACCGC	82,7
nGDH-A3- <i>NdeI</i> /His	58	GGAGGAAGACATATGCACCACCACCACCAC-CACGACTACAGGACGGTTTTTCGTCTCG	86,1
pET-gene-f	25	CGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCT	67,9
pET-gene-r	27	CCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGC	68,0
RT-GatDH-nested-r	22	CAGATCGCTCATCTCGTTCATC	53,8
RT-GntR-nested-r	16	GGGCCGCTGGAGGTTT	52,9

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5'→3')	T <sub>m</sub> °C
SFP1	20	CACGACACGCTACTCAACAC	48,7
SFP2	24	ACTCAACACACCACCTCGCACAGC	62,1
Si4_Quik-GntR_c77t-f	27	GAGGATCCGAGCCTGCTCTGGGTGCAG	70,8
Si4_Quik-GntR_c77t-r	27	CTGCACCCAGAGCAGGCTCGGATCCTC	70,8
Sitefinder1	63	CACGACACGCTACTCAACACACCACCTCG- CACAGCGTCCTCAAGCGGCCGCNNNNN- GCCT	93,0
XbaI-ES-GatDH-f	36	CTGGGAAGGATCTAGACGATCCTCGGGA- GGAACCTT	73,4

## 2. Nährmedien

Zur Sterilisation wurden alle Medien und Lösungen unmittelbar nach dem Ansetzen bei 121°C für 20 Minuten autoklaviert. Nicht autoklavierbare Zusätze, wie zum Beispiel Antibiotika, wurden mit Hilfe eines Sterilfilters (0,2 µm Porengröße, Minisart, Sartorius, Göttingen) sterilisiert. Nach dem Autoklavieren und anschließendem Abkühlen wurden den Medien die entsprechenden Lösungen zugegeben. Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich alle Angaben auf 1 Liter deionisiertes Wasser.

### 2.1. Nährmedien für *Rhodobacter sphaeroides*

#### Mineral-Vitamin-Medium: pH 7,0

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,00 g
NH <sub>4</sub> Cl	1,00 g
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,40 g
NaCl	0,40 g
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,05 g
Spurenelementlösung SL4 (10-fach)	1,00 ml
Vitaminlösung (10-fach)	1,00 ml

#### Kohlenstoffquelle:

Zur quantitativen Anzucht der verschiedenen *Rhodobacter*-Stämme wurde 20 mM Maltat als Kohlenstoff- und Energiequelle eingesetzt. Für die Reinheitskontrolle wurden 10 mM Galactitol als einziges Substrat verwendet, da nur der Stamm D in der Lage ist Galactitol zu metabolisieren.

Spurenelementlösung SL4 (10-fach) (Pfennig und Lippert, 1966 [155])

FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	2,00 g
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,10 g
MnCl <sub>2</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,03 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,30 g
CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,20 g
EDTA	5,00 g
CuCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g
NiCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,02 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,30 g

Vitaminlösung (10-fach) (Rode and Giffhorn, 1983 [167]; Pfennig, 1964 [153])

Biotin	2,0 mg
Nicotinsäure	20,0 mg
Thiamin	10,0 mg
Pantothensäure	5,0 mg
Pyridoxamin	50,0 mg
Cyanocobalamin	20,0 mg
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	ad 100 ml

**NB-Medium (Nutrient Broth): pH 7,0**

Fleischextrakt	3,0 g
Pepton aus Fleisch	5,0 g

**2.2. Nährmedien für *E. coli*****LB-Medium (Luria-Bertani) (Sambrook et al., 1989 [177]): pH 7,0**

Trypton	10,0 g
NaCl	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Glukose (optional)	1,0 g

**Komplex-Medium: pH 7,0**

Trypton	17,0 g
NaCl	5,0 g
Pepton aus Soja	3,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 g
Glukose	2,5 g

Die Glukose-Lösung wurde getrennt autoklaviert und erst nach dem Autoklavieren dem Medium steril zugegeben.

**SOC-Medium: pH 7,0**

Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,5 g
MgCl <sub>2</sub>	2,0 g
MgSO <sub>4</sub>	2,5 g
KCl	0,2 g
Glukose	4,0 g

**2.3. Nährböden**

Für die Herstellung der Nährböden wurden den verwendeten Nährmedien 1,6% (w/v) Agar zugefügt. Nach Rühren des autoklavierten und abgekühlten Mediums wurde pro Agarplatte etwa 25 ml Medium in eine Petrischale gegossen.

**3. Antibiotika und Lösungen**

Den autoklavierten Medien wurden nach dem Abkühlen die sterilfiltrierten Lösungen wie Antibiotika oder IPTG steril zugesetzt. Auf die gegossenen Agarplatten wurde 30 min vor dem Ausplattieren der Organismen die entsprechende Lösung, wie beispielsweise X-Gal für eine blau/weiß-Selektion, ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C getrocknet.

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

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

## 4. Lagerung der Organismen und genveränderten Stämme

Zur dauerhaften Lagerung der verschiedenen *Rhodobacter sphaeroides*- und der Insert-tragenden *E. coli*-Stämme bei  $-70^{\circ}\text{C}$  wurden Glycerinkulturen angelegt. Das Glycerin verhindert, dass sich innerhalb der Zellen Kristalle ausbilden, die die Zellen zerreißen und somit zerstören.

### Stammhaltung *Rhodobacter sphaeroides*:

Die einzelnen Kolonien wurden jeweils mit einer sterilen Pipettenspitze von den MV- oder NB-Agarplatten in je 5 ml MV-Medium überimpft und über Nacht bei  $28^{\circ}\text{C}$  und 146 rpm auf dem Schüttler (RC-406, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Danach wurden  $500\ \mu\text{l}$  einer 87%igen sterilen Glycerinlösung zu je  $500\ \mu\text{l}$  der Übernachtskultur gegeben. Nach gutem Durchmischen wurden die Kulturen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### Stammhaltung *E. coli*:

Die einzelnen Kolonien wurden jeweils mit einer sterilen Pipettenspitze von den  $\text{LB}_{Kan}$ -Agarplatten in je 5 ml  $\text{LB}_{Kan}$ -Flüssigmedium überimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 220 rpm auf dem Schüttler (Multitron, Infors, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Danach wurden  $500\ \mu\text{l}$  einer 87%igen sterilen Glycerinlösung zu je  $500\ \mu\text{l}$  der Übernachtskultur gegeben. Nach gutem Durchmischen wurden die Kulturen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 5. Gentechnische Standardmethoden

### 5.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus *Rhodobacter sphaeroides*

Für die Gesamt-RNA-Isolierung aus den *R. sphaeroides*-Stämmen Si4 und D wurde das Biozym *MasterPure<sup>TM</sup> Complete DNA and RNA Purification Kit* (Biozym, Hessisch Oldendorf) verwendet. Die benötigten Puffer und Lösungen waren als Bestandteile des Kits vorhanden.

Für den Zellaufschluss wurden zunächst 2,0 ml einer Übernachtskultur pelletiert. Danach wurden  $300\ \mu\text{l}$  Cell Lysis Solution mit  $1,0\ \mu\text{l}$  Proteinase K zugegeben, kräftig gemischt und bei  $65^{\circ}\text{C}$ - $70^{\circ}\text{C}$  für 15 min inkubiert. Dabei wurde die Probe alle 5 min geschüttelt und anschließend für 3-5 min auf Eis abgekühlt. Zur Isolierung der Gesamt-

RNA wurden 150  $\mu\text{l}$  MPC Protein Precipitation Reagent zugegeben und die Probe für 10 s kräftig durchmischt. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g pelletiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Es wurden 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol zugegeben und 30-40 mal invertiert, bevor die Probe 10 min bei 12.000 x g und 4°C abzentrifugiert wurde. Danach wurde das Isopropanol vorsichtig abgenommen. Es wurden 5,0  $\mu\text{l}$  RNase-freie DNaseI in 195  $\mu\text{l}$  1x DNase-Puffer verdünnt, das Pellet in den 200  $\mu\text{l}$  DNaseI-Lösung resuspendiert und bei 37°C auf dem Schüttler 30 min inkubiert. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  2x T und C Lysis Solution zugegeben und für 5 s geschüttelt. Zur Probe wurden 200  $\mu\text{l}$  MPC Protein Precipitation Reagent zugegeben und wiederum für 10 s gevortext. Nach einer 3-5 min Inkubation auf Eis wurden die Zellreste für 10 min bei 12.000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand mit der RNA wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol zugegeben. Nach 30-40-maligem Invertieren wurde die RNA bei 12.000 x g und 4°C für 10 min pelletiert. Das Isopropanol wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet 2x mit 75% Ethanol gewaschen. Die RNA wurde schließlich in 10-35  $\mu\text{l}$  TE-Puffer aufgenommen und zum Schutz der RNA vor Degradation 1,0  $\mu\text{l}$  ScriptGuard<sup>TM</sup> RNase Inhibitor zugegeben. Nicht direkt verwendete RNA wurde aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Puffer und Lösungen:

### DEPC-Wasser

H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> + 500  $\mu\text{l}$  DEPC

4 h rühren, 2x autoklavieren

### TE-Puffer: pH 7,5

Tris HCl 10 mM

EDTA 1 mM in H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>

## 5.2. Isolierung von genomischer DNA aus *Rhodobacter sphaeroides*

Genomische DNA wurde aus den *R. sphaeroides*-Stämmen Si4 und D isoliert. Dazu wurden die Zellen in 200 ml NB-Medium bei 28°C bis zu einer OD<sub>600</sub>= 1 wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann 15 min bei 5.000 x g und 4°C in 50 ml Falcons sedimentiert und das Pellet in 12,5 ml L1-Lösung durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurde die Probe mit 2,5 ml L1-Lösung mit 10 mg/ml Lysozym (sterilfiltriert)

vermischt und 1 h bei 37°C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Danach wurden 1,5 ml 10%ige SDS-Lösung zugegeben und vorsichtig durch Kippen gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 65°C im Wasserbad unter gelegentlichem Kippen wurden 5 ml Kaliumacetat-Lösung hinzugefügt und die Probe mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurde 20 min bei 5.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Der klare Überstand (DNA-haltig) wurde mit einem halben Volumen PCI-Lösung (25:24:1, Roth, Karlsruhe) versetzt und vorsichtig gemischt. Das Chloroform diente zur Phasentrennung, der Isopropylalkohol verhinderte eine Schaumbildung. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 12.000 x g wurden die letzten beiden Schritte so oft wiederholt, bis kein ausgefallenes Protein mehr in der Interphase zu erkennen war. Der klare Überstand wurde in ein 50 ml Falcon überführt, mit 1,5x Vol. Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Die Fällung mit Isopropanol sorgte dabei für das Entfernen des PCIs aus der Lösung. Nach einer einstündigen Sedimentation bei 5.500 x g und 4°C wurde 2x mit 70% Ethanol gewaschen. Der Waschschrift mit Ethanol sorgte für die Beseitigung des Kaliumacetats, das im Gegensatz zur DNA als Salz in Lösung ging und sich somit entfernen ließ. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die DNA in einem sterilen Eppendorfgefäß bei 60°C 5 min trocknen gelassen. Die DNA wurde schließlich in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> gelöst und bei 4°C gelagert.

Alternativ wurde zur Isolierung der Bakterien Gesamt-DNA das *INSTANT Bacteria DNA* Kit von Analytik Jena (Jena) genau nach Anleitung des Herstellers verwendet.

Puffer und Lösungen:

### L1-Lösung: pH 8,0

Tris	25 mmol	Saccharose	300 mmol
EDTA	25 mmol		
in 400 ml H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>		in 600 ml H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	

Die Saccharose wird von der restlichen L1-Lösung getrennt autoklaviert und erst nach dem Autoklavieren zugesetzt. Die Saccharose dient zur osmotischen Stabilisierung. Die L1-Lösung enthält außerdem EDTA, ein Komplexbildner, der für die Funktion von Enzymen -beispielsweise der DNase- wichtige Metallionen wie Magnesium abfängt und somit deren Einfluss verhindert. Der Lösung wird in einem späteren Schritt Lysozym zugesetzt, um die bakterielle Zellwand zu zerstören.

### 10 %ige SDS-Lösung

SDS 10% (w/v)

Die SDS-Lösung dient der Destabilisierung der Zellmembran und zur Denaturierung vorhandener Proteine.

### Kaliumacetat-Lösung

KAc (5 M) 60,0 ml  
Eisessig 11,5 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> 28,5 ml

Aufgrund seiner positiven Ladung bindet Kalium an die DNA und erleichtert somit die Fällung der Proteine.

## 5.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde in Form einer Kombination aus alkalischer Lyse (Sambrook et al., 1989 [177]; Birnboim, 1983 [17]) und einer Phenol/Chloroform-Extraktion angewandt. Die in LB<sub>Kan</sub>-Medium kultivierten Übernachtskulturen sollten aufgrund der herrschenden Selektionsbedingungen den rekombinanten Vektor enthalten. Die Zellmembran wird durch den Komplexbildner und Ionenfänger EDTA (L1) und NaOH (L2) destabilisiert. Das ebenfalls in Lösung L2 vorhandene anionische Detergenz SDS zerstört die Membran und denaturiert gleichzeitig die in der Zelle vorhandenen Proteine und genomische DNA. Da die Plasmid-DNA in einer *supercoiled*-Konformation vorliegt, wird diese, im Gegensatz zur genomischen DNA, nicht durch das alkalische Milieu zerstört. Die in Lösung L1 vorhandene RNase sorgt für die Eliminierung von RNA. Kaliumacetat (L3) fällt schließlich die denaturierten Proteine aus. Der Phenol-Chloroform (PCIA)-Schritt dient der kompletten Reinigung der Plasmid-DNA von Proteinen. Dies ist durch die Bildung zweier Phasen möglich, indem sich die Plasmid-DNA in der oberen wässrigen Phase löst, wohingegen die noch vorhandenen Proteine in der unteren organischen Phase verbleiben. Das Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch reinigt die Lösung von Phenol. Die Fällung mit Isopropanol und das Waschen mit Ethanol entfernen das PCIA schließlich ganz.

Von einer Übernachtskultur wurden 1,5 ml für 5 min bei 5.000 x g sedimentiert und das Pellet anschließend in 0,3 ml Destabilisierungspuffer L1 gut durchgemischt. Danach wurden 0,3 ml Denaturierungspuffer L2 zugegeben, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,3 ml Präzipitationspuffer L3

wurde wiederum mehrmals invertiert und der Niederschlag 15 min bei 12.000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfggefäß gegeben und mit 0,45 ml PCI-Lösung (25:24:1, Roth, Karlsruhe) extrahiert, gemischt und zur Phasentrennung 10 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, mit 0,45 ml CIA (24:1) extrahiert, gemischt und erneut zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 0,75 ml Isoopropanol gemischt und 30 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde 2x mit 0,5 ml 70% Ethanol gewaschen und das Pellet anschließend 5 min bei 60°C getrocknet. Die DNA wurde letztlich in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> gelöst und bei -20°C gelagert.

Alternativ wurde zur Isolierung der Plasmid-DNA das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II von Peqlab (Erlangen) nach den Herstellerangaben verwendet.

Puffer und Lösungen:

#### **Destabilisierungspuffer L1: pH 8,0**

RNase A	200 $\mu$ g/mg
Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM

#### **Denaturierungspuffer L2: pH 8,0**

NaOH	200 mM
SDS	1,0% (w/v)

#### **Präzipitationspuffer L3: pH 5,5**

Kaliumacetat	5,0 M
--------------	-------

### **5.4. Restriktionsspaltung von DNA**

Zur hydrolytischen Spaltung doppelsträngiger DNA aus PCR-Produkten oder Plasmiden wurden FastDigest<sup>®</sup> Restriktionsendonukleasen von Fermentas (St. Leon-Rot) bzw. *DpnI* von Stratagene (Waldbronn) bezogen (siehe Tabelle 8). Die Enzyme wurden entsprechend der Herstellerangaben verwendet, die Pfeile zwischen den Basen geben die Schnittstelle an.

Tabelle 8.: Verwendete Restriktionsenzyme.

Enzym	Schnittstelle (5' → 3')	Firma
<i>Bam</i> HI	G↓GATCC	Fermentas
<i>Dpn</i> I	GATC	Stratagene
<i>Hind</i> III	A↓AGCTT	Fermentas
<i>Nde</i> I	CA↓TATG	Fermentas

Tabelle 9.: Zusammensetzung der FastDigest™ Restriktionsansätze für Plasmid-/Vektor-DNA und PCR-Produkt (Insert).

	Plasmid/Vektor	PCR-Produkt/Insert
DNA	4,0 $\mu$ l	20,0 $\mu$ l
Universal Puffer	4,0 $\mu$ l	4,0 $\mu$ l
Enzym 1	1,0 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l
Enzym 2	1,0 $\mu$ l	1,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	ad 40,0 $\mu$ l	ad 60,0 $\mu$ l

Die Inkubationszeit für die FastDigest™ Reaktionen (vgl. Tabelle 9) betrug jeweils 5 min, die der Restriktionsspaltung mit 1,0  $\mu$ l *Dpn*I 1 h und 30 min. *Dpn*I wurde bei *Quikchange*-Reaktionen verwendet (siehe Kapitel 6.4) und direkt dem 50,0  $\mu$ l PCR-Produkt zugefügt. Alle Ansätze wurden bei 37°C inkubiert. Durch einen Doppelverdau des Inserts und des Vektors mit den gleichen Restriktionsenzymen wird eine korrekte Ligation (vgl. Kapitel 7.2) gewährleistet, da die Fragmente komplementäre Überhänge besitzen und der Einbau des Inserts in den Vektor gerichtet erfolgen kann.

## 5.5. Agarose-Gelelektrophorese

Genomische DNA, PCR-Amplifikate sowie Restriktionsansätze können durch Anlegen eines elektrischen Feldes (BlueMarine 100-2-Elektrophoresekammer, Serva, Heidelberg) in Agarosegelen (ca. 40 ml, 7 x 10 cm) nach ihrer Größe aufgetrennt werden (Adkins and Burmeister, 1996 [2]). Dabei wandert die negativ geladene, lineare, doppelsträngige DNA im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Je größer dabei die Anzahl der Basenpaare, desto geringer ist die zurückgelegte Laufstrecke. Aufgetragen wurden jeweils 5  $\mu$ l DNA-Probe, welche zuvor mit 1  $\mu$ l 6x Ladepuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzen wurde. Als Größenstandards wurden je nach erwarteter Fragmentgröße 5  $\mu$ l *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder* (Fermentas) bzw. *HyperLadder™ IV* (Bioline, Luckenwalde) eingesetzt. Die Auftrennung fand ca. 45 min bei 100 V statt. Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel 15 min lang im Ethidiumbromidbad (0,5  $\mu$ g/ml) gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in GC-Basenpaare des DNA-Doppel-

strangs und macht somit die einzelnen Fragmente im Gel mittels UV-Detektion bei 312 nm (Geldokumentationssystem EASY, Herolab, Wiesloch) sichtbar. Fragmente, die zusätzlich auf einem Transilluminator (Bachofer, Reutlingen) ausgeschnitten und anschließend reisoliert werden sollten (vgl. Kapitel 5.6), wurden zuvor 5-10 min im Wasserbad entfärbt.

Puffer und Lösungen:

### **TBE-Puffer (10x): pH 8,0**

Tris	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	25,0 mM

## **5.6. Reisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Amplifikate, Inserts und Vektoren, die nach Restriktion zur Reinigung von Enzymen und Salzen reisoliert werden sollten, wurden bei einer relativ niedrigen Spannung von 70 V getrennt, um eine möglichst genaue Auftrennung zu erreichen. Nach dem Wiegen der Gelstücke wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe des *MinElute Gel Extraction Kit* (Quiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben wieder aus dem Gel isoliert. Das Kit liefert ein Protokoll zum Extrahieren und Reinigen von DNA-Fragmenten zwischen 70 bp und 4 kbp aus Standard Agarosegelen zu hoch endkonzentrierter DNA.

## **5.7. Reinigung der DNA durch Fällung und Dialyse**

Nach Ligation von Vektor und Insert (vgl. Kapitel 7.2) wurde eine Fällung zur Reinigung der DNA von Salzen und Inaktivierung von Proteinen durchgeführt. Die Fällung wurde in Form einer Phenolisierung und einer Ethanol-, Lithiumchlorid-Fällung vorgenommen.

Zur Phenolisierung wurde das gleiche Volumen an Phenol/Chloroform zugegeben, kräftig gemischt und 10 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und zur Ethanol-Fällung zunächst mit 1/10x Volumen 4 M LiCl versetzt. Nach Zugabe von 2,5x Volumen 98% EtOH (-20°C) wurde die DNA 45 min bei -20°C gefällt und anschließend 30 min bei 12.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde dann 2x mit 70% EtOH gewaschen und danach 10 min bei 60°C getrocknet. Die DNA wurde schließlich in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>millipore</sub> aufgenommen.

Alternativ zur Fällung wurde der Ligationsansatz auf einem Dialyseplättchen (0,025  $\mu\text{m}$  VSWP MF<sup>TM</sup>-Membran Filter, Millipore, Schwalbach) gegen sterile 10%ige Glycerin-Lösung 1 h 30 min bei RT dialysiert.

## 6. Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) wird zur selektiven und exponentiellen Amplifizierung gewünschter DNA-Sequenzen eingesetzt. Spezifisch abgeleitete Primer dienen als Oligonukleotide und flankieren die DNA-Sequenz, die in jedem Zyklus verdoppelt wird (Saiki et al., 1988 [173]). Die optimale Annealing-Temperatur der Primer lässt sich mit folgender Formel berechnen (von Ahsen et al., 2001 [223]; Meinkoth and Wahl, 1984 [132]):

$$T_m = 4 \times (C+G) + 2 \times (A+T) [^\circ\text{C}]$$

Die PCR-Reaktion lässt sich insgesamt in drei Abschnitte gliedern:

1. Denaturierung: Die doppelsträngige DNA wird in einem Schmelzschritt bei 95°C in zwei Einzelstränge aufgetrennt.
2. Annealing: Die spezifisch ausgewählten Primer lagern sich bei einer auf sie abgestimmten Temperatur an die DNA-Einzelstränge an.
3. Elongation: Die DNA-Polymerase synthetisiert die komplementären DNA-Doppelstränge.

In den Experimenten wurde jeweils eine der folgenden drei DNA-Polymerasen: *Taq*-, *FideliTaq*<sup>TM</sup>-, oder Proofstart<sup>TM</sup>-Polymerase verwendet. Jede dieser Polymerasen besitzt eigene Charakteristika und Vorteile. Die *Taq*-Polymerase (Axon, Kaiserslautern) fügt Adenin-Überhänge an das PCR-Produkt an, was bei einer anschließenden TOPO TA-Klonierung (vgl. Kapitel 7.1) notwendig ist. Die Vorzüge der ursprünglich aus einer hyperthermophilen *Pyrococcus* Spezies isolierten Proofstart<sup>TM</sup>-Polymerase (Qiagen, Hilden) bestehen in einer 3'→5' Korrekturlesefunktion, einer hohen Arbeitsgeschwindigkeit und Hitzestabilität, sowie einer geringen Fehlerrate. Die *FideliTaq*<sup>TM</sup> DNA Polymerase (usb corporation, Staufen) verbindet die Fähigkeit einer hoch qualitativen *Taq*-Polymerase mit einer höchst genauen, thermostabilen Polymerase mit Proofreading-Funktion. Sie erhöht die Genauigkeit der Amplifikation gegenüber der *Taq*-Polymerase um das Drei- bis Sechsfache und erlaubt eine Amplifikation von längeren Produkten. Für die drei Polymerasen wurden standardisierte Reaktionsansätze (vgl. Tabelle 10)

und PCR-Programme (vgl. Tabelle 11) verwendet.

Tabelle 10.: PCR-Ansätze für die verschiedenen DNA-Polymerasen. Die Template-Konzentrationen lagen zwischen 0,1 und 1,0  $\mu\text{g}$  DNA. Der Reaktionsansatz wird vor dem Start der Reaktion gut gemischt und abzentrifugiert.

	<b>Taq</b>	<b>FideliTaq™</b>	<b>Proofstart™</b>
10x Puffer	3,0 $\mu\text{l}$	3,0 $\mu\text{l}$	5,0 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub>	1,8 $\mu\text{l}$	-	-
dNTP-Mix	0,7 $\mu\text{l}$	0,7 $\mu\text{l}$	1,5 $\mu\text{l}$
DMSO	3,0 $\mu\text{l}$	3,0 $\mu\text{l}$	-
5 x Q-Solution	-	-	10,0 $\mu\text{l}$
Template	1,6 $\mu\text{l}$	1,6 $\mu\text{l}$	2,0 $\mu\text{l}$
Primer- <i>forward</i>	0,5 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$	1,2 $\mu\text{l}$
Primer- <i>reverse</i>	0,5 $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$	1,2 $\mu\text{l}$
Polymerase	0,3 $\mu\text{l}$	0,3 $\mu\text{l}$	1,0 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	18,6 $\mu\text{l}$	20,4 $\mu\text{l}$	28,1 $\mu\text{l}$

Tabelle 11.: PCR-Programm für die verschiedenen DNA-Polymerasen. Die Annealing-Temperatur (X) muss jeweils dem Primerpaar angepasst werden und liegt 5°C unterhalb der Schmelztemperatur des kürzesten Primers. Die Elongationszeit (Y) hängt von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der Geschwindigkeit der Polymerase ab. Die PCR-Phasen 2. Denaturierung bis 4. Elongation wurden je nach Templatekonzentration in verschiedenen langen Zyklen wiederholt.

PCR-Schritt	<b>Taq</b>		<b>FideliTaq™</b>		<b>Proofstart™</b>	
	Temp. [°C]	Dauer [min]	Temp. [°C]	Dauer [min]	Temp. [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	95	5	95	5	95	5
2. Denaturierung	95	0,5	95	0,5	94	1
3. Annealing	X	0,5	X	0,5	X	0,5
4. Elongation	72	Y	68	Y	72	Y
5. Finale Elongation	72	7	68	5	72	10

Alle PCR-Reaktionen wurden im TGradient-Cycler (Whatman Biometra®), Göttingen) oder im MyCycler™ *thermal cycler* (Bio-Rad, München) durchgeführt. Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 5.5) überprüft.

## 6.1. Nested-PCR

Die sogenannte "verschachtelte" PCR bietet die Möglichkeit, die Spezifität und Sensitivität einer normalen PCR noch zu erhöhen. Diese Methode lässt sich in zwei Schritte gliedern. Im ersten Teil werden genflankierende Primer eingesetzt und die Anzahl der Zyklen niedrig gewählt. Bei erfolgreicher Amplifikation wird 1,0  $\mu\text{l}$  des ersten PCR-Produktes als Template für die zweite PCR eingesetzt. Als zweites werden genspezi-

fische Primer verwendet, die innerhalb des ersten Amplifikates binden und somit ungewünschte Nebenprodukte vermeiden. Dieses zweite Primerpaar eignet sich außerdem zum Anfügen gewünschter Restriktionsschnittstellen an das Amplifikat. Alternativ kann auf einen zweiten inneren Primer verzichtet und stattdessen erneut der passende Außenprimer verwendet werden (halbnested-PCR). Die Nested-PCR wurde zur spezifischen Amplifikation von Gensequenzen aus genomischer DNA eingesetzt, dabei wurde die *FideliTaq*<sup>TM</sup>- oder die Proofstart<sup>TM</sup>-Polymerase verwendet.

## 6.2. Colony-PCR

Mit Hilfe der Colony-PCR lassen sich *E. coli*-Klone auf Vorhandensein, Größe und Orientierung eines rekombinanten Inserts überprüfen. Das Verfahren liegt der Methode von Güssow und Clackson, 1989 [62] zu Grunde und dabei kann eine große Anzahl von Kolonien schnell und kostengünstig auf das richtige Insert untersucht werden. Es werden das Insert flankierende Primer eingesetzt, welche innerhalb der vektoreigenen Sequenz binden und somit das Insert vollständig und noch einen Teil des Vektors amplifizieren. Zur Überprüfung der Orientierung des Inserts kann statt eines vektorbindenden ein insertspezifischer Primer verwendet werden. Es wird ein Mastermix erstellt, dieser gut durchmischt und zu je 5,0  $\mu$ l in PCR-Tubes verteilt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wird ein Teil einer Kolonie von der Agarplatte entnommen, in das PCR-Tube eingetaucht und mehrmals schnell auf- und abpipettiert. Die Scherkräfte zerstören die Zellwände der Bakterien und das in dem Mastermix enthaltene DMSO macht zusätzlich die Membranen durchlässig. Von den gepickten Kolonien wird eine Masterplatte angelegt.

Je nach Klonierung wurden zwei verschiedene Ansätze verwendet (siehe Tabelle 12). Durch eine blau/weiß-Selektion vorausgewählte weiße Kolonien wurden mit Hilfe der M13-Primer auf eine erfolgreiche TOPO-TA-Klonierung untersucht (vgl. Kapitel 7.1). Dagegen wurden für die in den Expressionsvektor pET24a(+) einklonierten Sequenzen (vgl. Kapitel 7.2) die pET-Primer verwendet. Die PCR-Fragmente wurden durch die jeweils im Vektor bindenden Primer bei den M13-Primern um 233 bp und bei den pET-Primern um 126 bp verlängert. Ein Standardansatz wurde für jeweils zehn Reaktionen optimiert und ließ sich für die benötigte Anzahl zu untersuchender Kolonien hochrechnen (siehe Tabelle 12). Die PCR-Reaktion wurde entsprechend der Tabelle 11 auf die *Taq*-Polymerase abgestimmt gewählt. Das Ergebnis wurde anschließend auf einem Agarosegel überprüft (vgl. Kapitel 5.5) und die Klone mit gewünschter Fragmentlänge weiter untersucht.

Tabelle 12.: Colony-PCR-Mastermixe für je zehn Reaktionen. Die Annealing-Temperatur für die M13-Primer betrug 65°C, für die pET-Primer 62°C, die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des Inserts. Die pET-Primer wurden auch in Kombination mit genspezifischen Gegenprimern eingesetzt, um die Orientierung des Inserts im Vektor zu überprüfen.

	M13	pET
10 x Puffer	6,0 $\mu$ l	6,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	3,6 $\mu$ l	3,6 $\mu$ l
dNTP-Mix	1,2 $\mu$ l	1,2 $\mu$ l
DMSO	4,8 $\mu$ l	2,4 $\mu$ l
M13uni	1,1 $\mu$ l	1,1 $\mu$ l
M13rev	1,1 $\mu$ l	1,1 $\mu$ l
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	41,8 $\mu$ l	44,2 $\mu$ l
Endvolumen	60,0 $\mu$ l	60,0 $\mu$ l

### 6.3. SiteFinding-PCR

Die SiteFinding-PCR, basierend auf der Arbeit von Tan et al. 2005 [214], stellt eine neue PCR-Methode für das sogenannte Gen- oder Chromosom-*Walking* dar. Mit dieser einfachen und kostengünstigen Methode lassen sich, ausgehend von bereits bekannten Sequenzen, aus angrenzenden unbekanntem Bereichen relativ große DNA Fragmente zeitsparend und effizient amplifizieren. Das Prinzip der SiteFinding-PCR ist in Abbildung 12 dargestellt.

Als Template für die Reaktion dient genomische doppelsträngige DNA, die verschiedene Ziel- und Nicht-Zielsequenzen (blaue Bereiche) aufweist (1). Hier findet das sogenannte *Priming* statt. Die SiteFinding-Reaktion beruht darauf, dass der SiteFinder zunächst bei einer niedrigen Temperatur an die Zielsequenz bindet und die *Taq*-Polymerase Zielmoleküle unterschiedlicher Länge erzeugen kann (2). Die Vermehrung unspezifischer Amplifikate aus doppelsträngigen SiteFinder-Sequenzen wird durch Ausbildung einer *stem-loop*-Struktur unterdrückt (3). Dagegen werden die Zielmoleküle mittels Nested-PCR exponentiell mit den genspezifischen (GSP1-3) und den aus dem SiteFinder abgeleitete SiteFinder-Primern (SFP1 + SFP2) amplifiziert. Am 3'-Ende des SiteFinders befindet sich eine unspezifische NNNNNN-Folge und eine spezifische Nukleotidsequenz aus den vier Basen GCCT/GC, die zur Bindung der komplementären Sequenzen auf der genomischen DNA und damit zur Initiation der SiteFinding-Reaktion benötigt werden (siehe Abbildung 13).



Klonierung durchgeführt wurde (vgl. Kapitel 7.1). Je nach Klonierung werden die Kolonien mit passenden gen- oder vektorspezifischen Primern in einer Colony-PCR auf das Insert getestet und die positiven Klone sequenziert.

Mit Hilfe dieser PCR-Methode sollte der Sequenzbereich *upstream* des GatDH-Gens in den *R. sphaeroides*-Stämmen Si4 und D vergleichend untersucht werden. Als Ausgangsmaterial für die PCR diente die genomische DNA von Stamm D, die *FideliTaq*<sup>TM</sup> wurde als Polymerase für alle Reaktionen unter Berücksichtigung des passenden PCR-Ansatzschemas und Programms (vgl. Tabelle 10 und 11) verwendet. Der SiteFinder-Ansatz enthielt als einzigen Primer den SiteFinder-1 (vgl. Tabelle 13). Da sich dieser unspezifisch an die genomische DNA anlagert, wurde eine sehr niedrige Annealing-Temperatur gewählt (vgl. Tabelle 14). Durch das sogenannte *ramping* wurde die Annealing-Temperatur in einer gewünschten Geschwindigkeit auf die Elongations-Temperatur hochgeheizt.

Tabelle 13.: SiteFinding-Ansatz, die Reaktion wird vor der PCR mit dem SiteFinder *geprimed*.

10 x Puffer <i>FideliTaq</i> <sup>TM</sup>	2,0 $\mu$ l
dNTP-Mix (2,5 mM)	2,0 $\mu$ l
SiteFinder-1	0,4 $\mu$ l
Template	1,0 $\mu$ l
<i>FideliTaq</i> <sup>TM</sup>	0,3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	14,3 $\mu$ l
	<hr/> 20,0 $\mu$ l

Tabelle 14.: Ein-Zyklus-PCR-Programm für die SiteFinder-Reaktion mit niedriger Annealing-Temperatur. Von Schritt 3 zu Schritt 4 wurde ein *ramping* von 0,3°C/s durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	92	2
2. Denaturierung	95	1
3. Annealing	25	1
4. Elongation	68	7
5. Finale Elongation	68	10

Nach der SiteFinder-Reaktion wurden zur Amplifikation der unbekannt Sequenzen zwei Nested-Reaktionen (vgl. Kapitel 6.1) in Form einer Touchdown-PCR durchgeführt. Bei dieser PCR wird die Spezifität der Primer-Bindung durch zyklusweise Annäherung der Annealing-Temperatur an die errechnete Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Primers erhöht. Wenn die Annealing-Temperatur über der zu erwarteten  $T_m$  gewählt wird, binden die Primer ausschließlich und damit hochspezifisch an die DNA. So werden

Primer-Dimere und Artefakte verringert und es vermehrt sich vorzugsweise das gewünschte Amplikon. Bei Tan et al. ist kein Annealing-Schritt angegeben.

Für die erste Nested-Reaktion wurden der SiteFinding-Primer SFP1 und der genspezifische Primer GDH-RACE-inner verwendet (vgl. Tabelle 15). Der 5,0  $\mu\text{l}$ -Ansatz wurde zu der fertigen SiteFinding-Reaktion gegeben, gemischt und die Reaktion gestartet. Von der ersten Nested-Reaktion wurde anschließend eine 1:100 Verdünnung mit Wasser angesetzt und davon 1,0  $\mu\text{l}$  als Template für die zweite Nested-PCR eingesetzt (vgl. Tabelle 16). Die zweite Reaktion wurde zweimal angesetzt, dabei wurde der zweite SiteFinding-Primer SFP2 jeweils mit einem der beiden, aus der GatDH-Sequenz abgeleiteten, Primer GatDH-GSP2 oder -GSP3 kombiniert. Im Gegensatz zu den Ansätzen von Tan et al. wurde den Nested-Reaktionen wegen des relativ hohen GC-Gehaltes der Zielsequenz noch zusätzlich DMSO zugesetzt. Für alle Touchdown-PCR-Reaktionen wurde das gleiche Programm verwendet (vgl. Tabelle 17), die Annealing-Temperaturen wurden an die jeweiligen Primerpaare angepasst.

Tabelle 15.: Nested-PCR-Ansatz 1. Der Ansatz wird zur fertigen SiteFinding-Reaktion zugegeben.

10 x Puffer <i>FideliTaq</i> <sup>TM</sup>	1,0 $\mu\text{l}$
DMSO	2,0 $\mu\text{l}$
SFP1	0,5 $\mu\text{l}$
GDH-RACE-inner	0,5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	1,0 $\mu\text{l}$
	<hr/>
	5,0 $\mu\text{l}$

Tabelle 16.: Nested-PCR-Ansatz 2. Als Template dient der Ansatz der Nested 1-Reaktion. Die Reaktion wird zweimal angesetzt, wobei einmal der GatDH-GSP2- und einmal der -GSP3-Primer eingesetzt wird.

10 x Puffer <i>FideliTaq</i> <sup>TM</sup>	5,0 $\mu\text{l}$
DMSO	3,0 $\mu\text{l}$
dNTP-Mix (2,5 mM)	1,2 $\mu\text{l}$
SFP2	0,8 $\mu\text{l}$
GatDH-GSP2/-GSP3	0,8 $\mu\text{l}$
Template (Nested 1, 1:100)	1,0 $\mu\text{l}$
<i>FideliTaq</i> <sup>TM</sup>	0,3 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	37,9 $\mu\text{l}$
	<hr/>
	50,0 $\mu\text{l}$

Tabelle 17.: PCR-Programm für die Nested-Reaktionen in Form einer Touchdown-PCR. Bei X1 wird die Schmelztemperatur des Primers mit der niedrigeren Schmelztemperatur des Paares gewählt. Die Schritte 2 bis 4 werden in 5 Zyklen wiederholt. Für X2 wird eine um  $-5^{\circ}\text{C}$  niedrigere von der zuvor gewählten Annealing-Temperatur eingestellt. Die Schritte 5 bis 7 werden in 25 Zyklen wiederholt.

PCR-Schritt	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Dauer [min]
1. Denaturierung	94	1
2. Denaturierung	95	10 s
3. Annealing	X1	0,5
4. Elongation	68	6
5. Denaturierung	95	10 s
6. Annealing	X2	0,5
7. Elongation	68	6
8. Finale Elongation	72	5

Die entstandenen Amplifikate wurden schließlich auf einem 1,4%igen Agarosegel überprüft (vgl. Kapitel 5.5). Die Spezifität der Amplifikate wurde anhand der verschiedenen Fragmentlängen beurteilt, welche mit der Distanz zwischen den genspezifischen Primern GatDH-GSP2 und -GSP3 konform sein mussten. Abweichend zu Tan et al. 2005 [214] wurden die gewünschten Amplifikate anschließend aus den Agarosegelen ausgeschnitten, reisoliert (vgl. Kapitel 5.6) und danach eine TOPO-Klonierung durchgeführt (vgl. Kapitel 7.1). Das *Screening* erfolgte anhand der blau/weiß-Selektion und einer Colony-PCR mit den vektorspezifischen M13-Primern (vgl. Kapitel 6.2). Positive Klone wurden sequenziert.

#### 6.4. KOD QuikChange-PCR

Mit Hilfe der *KOD Hot Start* DNA Polymerase (Toyobo, Merck, Darmstadt) lässt sich eine ortsgerichtete Mutagenese, also ein gezielter *in vitro*-Austausch einzelner Basen bzw. Aminosäuren, durchführen. Als Template wird die zu verändernde Plasmid-DNA -der inserttragende Expressionsvektor- und zwei synthetische Oligonukleotidprimer, die die gewünschte Mutationen enthalten, eingesetzt. Die *KOD Hot Start* DNA Polymerase repliziert beide Plasmidstränge, wobei diesen durch Verbindung mit den Primern die Mutationen eingefügt werden. Vorteil dieser Methode ist, dass in fast allen *E. coli*-Stämmen die parentale DNA methyliert ist. Durch Zugabe von  $1,0\ \mu\text{l}$  *DpnI* zu dem gesamten Ansatz und Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 1 h und 30 min lässt sich die nicht-mutierte methylierte und hemimethylierte DNA selektiv abbauen, so dass nach Dialyse des Ansatzes (vgl. Kapitel 5.7) die Expressionsstämme nur mit den austauschtragenden Plasmiden transformiert (vgl. Kapitel 8) werden.

Als DNA-Templates dienten die beiden Plasmide pET24a(+)-Si4-GntR+GatDH und pET24a(+)-D-GntR+GatDH, denen mit Hilfe der Primer Si4\_Quik-GntR\_c77t-f/-r bzw. D\_Quik-GntR\_t77c-f/-r eine Punktmutation innerhalb des GntR-Gens eingefügt wurde. Folgender Ansatz (siehe Tabelle 18) und Programm (vgl. Tabelle 19) wurden für die KOD QuikChange-PCR verwendet.

Tabelle 18.: Reaktionsansatz für die KOD QuikChange-PCR.

10 x Puffer <i>KOD Hot Start</i>	5,0 $\mu$ l
dNTP-Mix (2,0 mM)	5,0 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub> (1,5 mM)	3,0 $\mu$ l
Primer forward	3,0 $\mu$ l
Primer reverse	3,0 $\mu$ l
Template (20-50 ng)	1,0 $\mu$ l
<i>KOD Hot Start</i> DNA Polymerase	2,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	28,0 $\mu$ l
	50,0 $\mu$ l

Tabelle 19.: PCR-Programm für die KOD QuikChange-PCR. Die Schritte 2 bis 4 wurden 25 mal wiederholt.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	95	2
2. Denaturierung	95	0,5
3. Annealing	55	1
4. Elongation	70	3

## 6.5. Reverse Transkription-PCR

Die Reverse Transkription (RT) wird dazu verwendet, mRNA-Moleküle in komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA) umzuschreiben. Dabei macht man sich meist die retroviralen Reversen Transkriptasen, RNA-abhängige DNA-Polymerasen, des Avian-Myeloblastosevirus (AMV) oder des murinen Moloney Leukämievirus (MMLV) (Roth et al., 1985 [170]) zunutze. Die während der Reversen Transkription synthetisierte cDNA kann in einer nachfolgenden PCR zur quantitativen und qualitativen Analyse der Genexpression eingesetzt werden.

Zur vergleichenden Expressionsanalyse des GatDH- bzw. GntR-Gens in *R. sphaeroides* Stamm D gegenüber Stamm Si4 wurde eine *Two-Step* RT-PCR durchgeführt, wobei Reverse Transkription und PCR in zwei getrennten Reaktionen stattfanden, um jeweils die optimalen Reaktionsbedingungen zu gewährleisten und alle Ansätze gleich-

zeitig analysieren zu können. Als Templates für die RT-Reaktionen beider Stämme diente jeweils die RNA aus der Gesamt-RNA Isolierung (vgl. Kapitel 5.1). Um eine Verunreinigung der RNA mit möglicherweise noch nach der Isolierung vorhandener DNA auszuschließen, wurde den 10,0  $\mu\text{l}$  RNA-Aliquots zunächst jeweils 2,0  $\mu\text{l}$  DNaseI zugegeben und die Ansätze 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNaseI wurden die Ansätze anschließend 15 min bei 94°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Da nicht nur das Vorhandensein der mRNAs der beiden Gene untersucht werden sollte, sondern auch, ob beide Gene möglicherweise auf einer gemeinsamen mRNA transkribiert werden, wurden für die RT-Reaktion zwei sequenzspezifische Primer verwendet (RT-GatDH-nested-r und RT-GntR-nested-r). Um für die RT-Reaktion störende Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen, wurden Ansätze aus jeweils 1,0  $\mu\text{l}$  der beiden Primer, 5,0  $\mu\text{l}$  der entsprechenden RNA und 8,0  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> 2 min bei 94°C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Für die Erststrangsynthese diente das *Access RT-PCR System* (Promega, Mannheim), welches eine AMV Reverse Transkriptase des Avian-Myeloblastosevirus verwendet. Für die verschiedenen Ansätze (vgl. Tabelle 20) wurden Mastermixe erstellt und in 35,0  $\mu\text{l}$  Endvolumen den vorinkubierten RNA-Primer-Ansätzen zugegeben. Die RT-Reaktion fand 1 h bei 45°C statt, danach wurde sogleich die AMV-RT 2 min bei 94°C inaktiviert und die Ansätze auf 4°C abgekühlt. Zur Vermehrung der cDNA bzw. Sekundärstrangsynthese wurde die *FideliTaq<sup>TM</sup>* und das dazu passende PCR-Programm (vgl. Kapitel 6) in 50 sich wiederholenden Zyklen verwendet. Als Template diente jeweils 1,0  $\mu\text{l}$  aus der RT-Reaktion bzw. 1,0  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA als Positivkontrolle und zur Analyse auf die GatDH- bzw. und/oder die GntR-Sequenz wurden die Primer GatDH-f, GatDH-r, GntR-f, GntR-r in verschiedenen Kombinationen eingesetzt.

Tabelle 20.: Ansatz zur Erststrangsynthese für die RT-PCR. Für mehrere Reaktionen wurden Mastermixe erstellt. RT+, normaler RT-Ansatz mit AMV-RT; RT-, Negativansatz mit DEPC-Wasser statt AMV-RT zur Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen.

	RT+	RT-
Nuklease-freies Wasser	21,0 $\mu\text{l}$	21,0 $\mu\text{l}$
AMV Reaktionspuffer	10,0 $\mu\text{l}$	10,0 $\mu\text{l}$
dNTP Mix	1,0 $\mu\text{l}$	1,0 $\mu\text{l}$
25 mM MgSO <sub>4</sub>	2,0 $\mu\text{l}$	2,0 $\mu\text{l}$
AMV RT	1,0 $\mu\text{l}$	-
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	-	1,0 $\mu\text{l}$
Endvolumen	35,0 $\mu\text{l}$	35,0 $\mu\text{l}$

Als Kontrollen dienten pro Stamm RT-Ansätze ohne Reverse Transkriptase (Kontrolle auf DNA-Verunreinigungen), ein kompletter Ansatz ohne RNA (Kontrolle auf Kontamination aller verwendeter Substanzen), sowie PCR-Ansätze mit Plasmid-DNA als Tem-

plate als Positivkontrolle für die normale PCR-Reaktion. Das Ergebnis aller Reaktionen wurden auf einem Agarosegel überprüft (vgl. Kapitel 5.5).

## 7. Klonierung von PCR-Fragmenten

### 7.1. TOPO-TA-Klonierung

Das TOPO-TA-Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, Karlsruhe) eignet sich für eine schnelle und effiziente Klonierung, mit einer TA-Überhänge synthetisierenden *Taq*-Polymerase amplifizierter PCR-Fragmente, ohne Verwendung einer Ligase.

#### Ansatz:

PCR-Produkt	4,0 $\mu$ l
Salz-Lösung	1,0 $\mu$ l
TOPO <sup>®</sup> II-Vektor	1,0 $\mu$ l

Der Reaktionsansatz wurde jeweils komplett zu den Top 10 One Shot *E.coli*-Zellen gegeben. Die Transformation erfolgte durch einen 30 s Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Danach wurden 250  $\mu$ l SOC-Medium zugegeben und die Zellen auf dem Schüttler bei 220 rpm (Multitron, Infors, Bottmingen, Schweiz) und 37°C inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden mit der im Protokoll maximal angegebenen Dauer durchgeführt. Die Zellen wurden auf mit X-Gal vorbehandelten LB<sub>Kan</sub>-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion der inserttragenden Klone erfolgte anhand eines blau/weiß-Screenings. Der TOPO<sup>®</sup>II-Vektor verfügt über ein *lacZ*-Gen, wobei das Insert genau in den codierenden Bereich dieses Gens kloniert und dadurch die  $\beta$ -Galaktosidase deaktiviert wird. Rekombinante Zellen sind somit nicht mehr in der Lage, das Lactoseanalogon X-Gal abzubauen und erscheinen als weiße Kolonien,  $\beta$ -Galaktosidase exprimierende Zellen bilden dagegen ein blaues Reaktionsprodukt. Die weißen Kolonien wurden mittels Colony-PCR (vgl. Kapitel 6.2) auf das gewünschte Insert untersucht.

### 7.2. Ligation

Die Ligation wurde zur Konstruktion rekombinanter Plasmide unter Verwendung einer T4-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) durchgeführt. Ligasen können einzelsträngige DNA-Ketten miteinander verknüpfen und Einzelstrangbrüche schließen. Das zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaute Vektorplasmid bzw. Insert wurde in den Verhältnissen 1:3, 1:5 oder 1:7 gemischt und in einem 20  $\mu$ l Ansatz ligiert.

### Ansatz:

Vektor-Insert-Gemisch (1:3, 1:5, 1:7)	10,0 $\mu$ l
10 x T4-Ligationspuffer	2,0 $\mu$ l
T4-Ligase	2,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	6,0 $\mu$ l

Der Ansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und vor der Elektroporation (vgl. Kapitel 8.2) von Salzen gereinigt (vgl. Kapitel 5.7).

## 8. Transformation

### 8.1. Herstellung elektrokompenter Zellen

Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen (Hanahan, 1983 [68]) wurde dem LB-Medium Tetracyclin zugesetzt, da der Stamm BL21-Gold(DE3) ein Resistenz-Gen für dieses Antibiotikum besaß. Ein Schüttelkolben mit 400 ml LB-Medium wurde mit 1/100 Volumen einer frischen Übernachtskultur angeimpft und die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,4 - 0,5 bei 37°C und 220 rpm (Multitron, Infors, Bottmingen, Schweiz) wachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei 4.000 x g und 4 °C sedimentiert und das Pellet zweimal in 300 ml sterilem, eiskaltem Millipore-Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 20 ml einer eiskalten 10%igen Glycerin-Lösung resuspendiert, sedimentiert und das Pellet in 2 ml einer eiskalten 10%igen Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden in 50  $\mu$ l Aliquots aufgeteilt und bei -70°C gelagert. Die Präparation der Zellen wurde so durchgeführt, dass der Zelltitel etwa  $3 \times 10^{10}$  Zellen pro Milliliter betrug.

### 8.2. Elektroporation

Die Fähigkeit individuelle Plasmid-DNA Moleküle in eine Zelle durch Transformation einzubringen, ist für den rasanten Fortschritt in der Plasmidbiologie und für die Entwicklung von DNA Klonierungsmethoden von zentraler Bedeutung (Yoshida and Sato, 2009 [235]; Shivarova et al., 1983 [195]). Die Transformation von *E. coli* mit einer Plasmid-DNA durch Elektroporation wurde erstmals von Fiedler und Wirth, 1988 [42] beschrieben.

Mittels Elektroporation (Gene Pulser<sup>TM</sup>/Pulse Controller, Bio-Rad, München) wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21-Gold(DE3) mit den rekombinanten Expressionsplasmiden transformiert (Hanahan et al., 1991 [69]). Die Zellen werden dabei in ei-

nem elektrischen Feld kurzen elektrischen Pulsen hoher Feldstärke ausgesetzt. In der Zellmembran entstehen während dieser Intervalle Poren, durch die die gewünschten Plasmide in die Zelle eindringen können.

Die Zellen, der Ligationsansatz und eine Elektroporationsküvette (Peqlab, Erlangen) wurden auf Eis vorgekühlt, bevor der komplette Ligationsansatz zu 50  $\mu\text{l}$  elektrokompenten Zellen gegeben wurde. Der Transformationsansatz wurde anschließend in die Elektroporationsküvetten pipettiert. Die Elektroporation fand unter den Bedingungen: 400  $\Omega$ , 25  $\mu\text{F}$  und 2,5 kV statt, danach erfolgte eine sofortige Zugabe von 1 ml SOC-Medium zur Regeneration der Zellen. Diese wurden in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und 1 h bei 37°C auf dem Schüttler (Multitron, HT Infors, Bottmingen, Schweiz) regeneriert. Der Transformationsansatz wurde dann in verschiedenen Volumina auf mehreren LB<sub>Kan</sub>-Platten ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Heraeus, Hanau) wurden die gewachsenen Kolonien mittels Colony-PCR (vgl. Kapitel 6.2) auf das Expressionskonstrukt untersucht.

## 9. DNA-Sequenzierung

Alle zu sequenzierende Plasmide und PCR-Fragmente wurden an GATC Biotech AG (Konstanz) geschickt. Als Primer wurden die dort vorrätigen Standardprimer für den TOPO<sup>®</sup> II-Vektor bzw. das pET24a(+)-Plasmid verwendet. Alternativ wurden genspezifische Primer mitversendet oder sequenzspezifische Primer bei GATC synthetisiert.

### 9.1. DNA-Sequenzanalyse nach Sanger et al. (1977)

Das Kettenabbruchverfahren nach Sanger (1977 [178]) beruht auf der Verwendung von Didesoxynucleosiden, Derivate der Desoxynucleosidtriphosphate, denen die 3'-Hydroxygruppe fehlt. Die zu sequenzierende DNA wird *in vitro* mit Hilfe einer DNA-Polymerase, spezifischen Oligonukleotid-Primern und der vier Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, und dTTP) in getrennten Reaktionsmischen synthetisiert. Vorhandene Didesoxynucleosidtriphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, und ddTTP) werden ebenfalls zufällig in die wachsende DNA-Kette eingebaut, da diesen Nucleosiden jedoch die 3'-OH-Gruppe fehlt, kann keine Phosphodiesterbindung zwischen Desoxyribose und Nucleosidmonophosphat gebildet werden. Die Addition des nächsten Nucleosids ist somit blockiert und die Verlängerung der Kette kann an diesem Punkt nicht fortgesetzt werden. In den Reaktionsgemischen werden somit eine Reihe von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge produziert, die zu der zu sequenzierenden

DNA komplementär sind und jeweils mit einer der vier verschiedenen Basen enden. Die Produkte werden auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die verwendeten Primer sind gelabelt, d.h. sie sind radioaktiv oder fluoreszenzmarkiert und können daher im Gel detektiert werden. Die Sequenz des Stranges kann nun bestimmt werden, indem von unten nach oben und über alle Spuren die Banden der Reihe nach gelesen werden (Alberts, 2005 [3]).

## 9.2. TempliPhi-Reaktion

Zur Verbesserung der Sequenzierung wurde das *TempliPhi DNA Amplification Kit* (GE Healthcare, Freiburg) eingesetzt. Bei dieser Reaktion binden willkürliche Hexamer-Primer an verschiedene Stellen des zirkulären DNA-Templates. Die Phi29-DNA-Polymerase verlängert jeden dieser Primer. Wenn die Polymerase einen *downstream*-verlängerten Primer erreicht, findet eine Strangverdrängungssynthese statt. Der abgelöste Strang wird zum Einzelstrang und ist somit für die Anlagerung weiterer Hexamer-Primer verfügbar. Der Prozess läuft weiter und führt zu einer exponentiellen, isothermischen Amplifikation.

Zu einem Teil einer Kolonie wurden je 5  $\mu\text{l}$  Probenpuffer gegeben. Die Denaturierung der Probe fand durch Erhitzen auf 95 °C für 3 min statt, danach wurde auf 4°C abgekühlt. Es wurde für jede Probe ein sogenannter TempliPhi-Premix aus 5  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer und 0,2  $\mu\text{l}$  Enzymmix erstellt und davon jeweils 5  $\mu\text{l}$  zu der gekühlten, denaturierten Probe gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 30°C für 18 h, danach wurden die Enzyme bei 65°C für 10 min inaktiviert und auf 4°C abgekühlt. Viskose Proben wurden zusätzlich mit 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$  verdünnt, gut gemischt und 5 - 10 min bei 60°C inkubiert.

## 9.3. Auswertung der Sequenzdaten

Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des PC-Programmes *Contig-Express*, gehörend zu *Vektor NTI* (Informax 9.0 bzw. 10.0 Advance, Invitrogen, Karlsruhe). Über die Suchmaskenfunktion *blastn* für Nucleotide bzw. *blastp* für Aminosäuren (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) wurden die ausgewerteten Sequenzdaten über den BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997 [4]) mit den hinterlegten Sequenzen der NCBI (*National Center for Biotechnological Information*)-Datenbank abgeglichen.

## 10. Kultivierung und Expression

Kulturen der *Rhodobacter sphaeroides* Stämme Si4, D und 2.4.1 wurden zum Test auf Galaktitol-Dehydrogenase-Aktivität auf verschiedenen C-Quellen angezogen. Die heterologe Expression des nativen GatDH-Gens, verschiedener Enzymvarianten der GatDH, sowie mit dem GatDH-Gen im Genom zusammenhängender Gensequenzen, erfolgte zur Aktivitätsbestimmung bzw. Anreicherung von Protein in *E. coli*-Stämmen. Die beiden Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21-Gold(DE3) verfügen in ihrem Chromosom neben dem *LacI*-Repressor über ein integriertes Fragment des Bacteriophagen  $\lambda$  (DE3), welches für die T7 RNA-Polymerase kodiert. Die *E. coli*-Zellen wurden mit rekombinanten Plasmiden transformiert, wobei der verwendete Expressionsvektor pET24a(+) über den für die T7 RNA-Polymerase spezifischen T7-Promotor und ebenfalls über den *LacI*-Repressor verfügt. Vor der Zugabe von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid) wird die Transkription der T7 RNA-Polymerase und somit auch des *Target*-Gens durch den *Lac*-Repressor verhindert. Die Expression wird induziert, indem zugefügtes IPTG an *LacI* bindet und die nun von der Wirtszelle translatierte T7 RNA-Polymerase selektiv an den T7 Promotor bindet und somit auch die Transkription des rekombinanten Zielgens katalysieren kann. Durch die Spezifität und starke Aktivität der T7 RNA-Polymerase werden nach der Induktion fast alle Zellreserven zur Expression des einklonierten Gens verwendet.

### 10.1. Anzucht auf Nährböden

Zur Vereinzelung von Klonen sowie zur Reinheitskontrolle der Stämme wurden die Organismen auf den entsprechenden Agarböden ausgestrichen. Die Kultivierung von *Rhodobacter sphaeroides* erfolgte entweder auf MV-Agar mit der gewählten C-Quelle oder auf NB-Agarplatten bei 28°C über 1-2 Tage. *E. coli* wurde auf LB<sub>Kan</sub>-Agarplatten im Brutschrank bei 37°C über Nacht kultiviert.

### 10.2. Schüttelkultur im Rollrandröhrchen

Einzelkolonien oder 5  $\mu$ l einer Glycerinkultur wurden als Vorkultur in 5 ml Medium in einem Rollrandröhrchen bei 28°C auf dem Schüttler (146 rpm, RC-406, Infors AG, Bottmingen, Schweiz) angezogen. Für *Rhodobacter*-Stämme wurde MV-Medium, für *E. coli*-Kulturen Komplexmedium verwendet. Zur Plasmidpräparation oder zur Herstellung von Glycerinkulturen angezogene *E. coli*-Kolonien wurden in 5 ml LB<sub>Kan</sub>-Medium bei 37°C auf dem Schüttler (220 rpm, Multitron, HT Infors) inkubiert.

### 10.3. Schüttelkultur im Erlenmeyer-Kolben

Die Anzucht im Erlenmeyer-Kolben erfolgte für alle Organismen und Stämme bei 28°C und 146 rpm auf dem Rotationsschüttler (RC-406, Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Kleinere Kulturen (20 ml bei *Rhodobacter sphaeroides* bzw. 25 ml bei *E. coli*) dienten außer als Testkulturen auch als Vorkulturen zum Beimpfen größerer Schüttelkulturen (100 ml bei *Rhodobacter sphaeroides* bzw. 250 ml bei *E. coli*), oder zu einer anschließenden DNA- bzw. RNA-Isolierung. Je nach Größe des verwendeten Bioreaktors wurde entweder eine 100 ml (2 l Bioreaktor) oder eine 250 ml *E. coli*-Vorkultur (10 l Bioreaktor) angezogen. Expressionsstämme wurden bis zu einer  $OD_{600} = 0,8$  angezogen, danach erfolgte die Induktion durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) und eine weitere Kultivierungszeit von 18 h bis maximal 20 h.

### 10.4. Fermentation

#### 10.4.1. Anzucht im 10 l Bioreaktor

Die Inokulation des mit 8 l kanamycinhaltigen Komplexmedium gefüllten Bioreaktors (Biostat, Braun Biotech/Sartorius, Göttingen) erfolgte durch Zugabe einer 250 ml ü. N. *E. coli*-Kultur. Die weitere Fermentation wurde ungerregelt bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 10.4.2. Anzucht im 2 l Bioreaktor

Zur Fermentation im Minifors 2 l Fermenter (Infors, Bottmingen, Schweiz) wurde eine 100 ml Vorkultur aus kanamycinhaltigem Komplexmedium ü. N. bei 28°C auf dem Schüttler (146 rpm, RC-406, Infors AG) inkubiert. Das Animpfen des mit 1,5 l kanamycinhaltigem Komplexmedium gefüllten Bioreaktors erfolgte durch Abflammen der Kultur und einer verschließbaren Öffnung am Fermenter. Die Fermentation erfolgte unter Konstanthaltung der Temperatur bei 26°C, und eines pH-Wertes von 7,0 bei einer Rührgeschwindigkeit von 300 rpm. Bei Bedarf wurde automatisch ein Antischaummittel (Poly-1,2-Propandiol) zugepumpt. Der pH-Wert wurde durch geregelte Zugabe von 1 M Salzsäure und 1 M Natriumhydroxid eingestellt.

## 11. Zellernte und Herstellung zellfreier Extrakte

### 11.1. Zellernte

Nach der entsprechenden Wachstumsphase bzw. einer Induktionszeit von 18 h bei *E. coli*-Kulturen erfolgte die Zellernte der in den Erlenmeyerkolben gewachsenen Zellen. Die Zellsuspensionen wurden je nach Volumen entweder in Zentrifugenbecher oder in 50 ml-Falcons überführt und 15 min bei 5.500 x g und 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend im jeweiligen 20 mM BisTris-Arbeitspuffer (siehe Kapitel 12) gewaschen, danach erneut im gleichen Puffer resuspendiert (6 ml Puffer pro g Pellet Feuchtgewicht) und direkt nach Zugabe einer Spatelspitze DNase I aufgeschlossen.

### 11.2. Zellaufschluss durch Ultraschall

Die geernteten und in Arbeitspuffer resuspendierten Zellen wurden mittels einer Ultraschallsonde aufgeschlossen. Das Ultraschallgerät (MSE Soniprep 150, Curtin Matheson Scientific Inc., Houston, TX, USA) erzeugt mechanische Schwingungen, die zu einer Zerstörung der Zellwände und Membranen führt. Die aufzuschließenden Zellen wurden unter Kühlung im Eisbad mit einer gerätespezifischen Leistung von 20-22 microns für 6 x 1 min für *Rhodobacter sphaeroides*-Zellen oder 6 x 15 s für *E. coli*-Zellen beschallt. Auf jede Beschallungsphase folgte eine doppelt so lange andauernde Abkühlungsphase, um die Probe zu kühlen. Nach dem Aufschluss wurden die Zellsuspensionen zu je 1,0  $\mu$ l in Eppendorfgefäße aliquotiert und die Zelltrümmer 30 min bei 12.000 x g und 4°C abzentrifugiert.

### 11.3. Zellaufschluss mit Frenchpress

Alternativ wurden die im Arbeitspuffer resuspendierten Zellen in einer auf 4°C gekühlten Frenchpress-Apparatur (French<sup>®</sup> Pressure Cell Press, Polytec GmbH, Waldbronn) aufgeschlossen. Dabei wurde die Zellsuspension insgesamt dreimal einem Druck von 120 MPa ausgesetzt und anschließend die Zelltrümmer 30 min bei 12.000 x g und 4°C abzentrifugiert.

## 12. Proteinanreicherung

Je nach Enzymvariante wurden zur Anreicherung der Galaktitol-Dehydrogenase unterschiedliche Methoden angewandt. Alle Anreicherungsstrategien nehmen als Ausgangs-

punkt den zellfreien Rohextrakt, welcher nach dem Zellaufschluss gewonnen wurde (vgl. Kapitel 11). Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich alle Puffer und Lösungen auf 1 Liter deionisiertes Wasser.

## 12.1. Anreicherung der nativen, heterolog exprimierten GatDH

Das native Enzym, d. h. die Galaktitol-Dehydrogenase ohne N- oder C-terminale Modifizierungen, wurde aus dem rekombinanten Stamm *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid pET24a(+)-nGDH angereichert.

### Arbeitspuffer: pH 6,5

BisTris 20 mM  
MgCl<sub>2</sub> 1 mM

#### 12.1.1. Ammoniumsulfatfällung

Dem zellfreien Rohextrakt wurde langsam unter Rühren im Eisbad gemahlene Ammoniumsulfat zugegeben, so dass insgesamt eine Sättigung von 30% (164 g/l) erreicht wurde. Die Lösung wurde unter fortlaufendem, langsamen Rühren über Nacht bei 7°C inkubiert. Anschließend wurden die durch das Ammoniumsalz denaturierten Proteine 1 h 30 min bei 14.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand mit dem angereicherten Protein wurde für die anschließende Chromatographie verwendet.

#### 12.1.2. Chromatographische Methoden

Mit dem Begriff *Chromatographie* lassen sich verschiedene physikalisch-chemische Trennverfahren für die analytische und präparative Auftrennung von Proteinen zusammenfassen. Entscheidend für die Proteintrennung sind dabei Größe, Ladung, hydrophobe Eigenschaften oder spezifische Affinitäten. Der Grad der Reinigung eines Proteins lässt sich durch Kombination mehrerer chromatographischer Methoden erhöhen. Anhand eines UV-Detektors konnte bei den mittels des FPLC-Systems Äkta™ Purifier 100 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) angereicherten Proben die Elution der Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt werden. Mit Hilfe der Software UNICORN™ (GE Healthcare) ließen sich standardisierte Läufe programmieren und exakte Puffergradienten zwischen den beiden Pumpen A und B gesteuert mischen. Die Säulenpuffer wurden jeweils frisch angesetzt, über Nitrocellulosefilter (0,2 µm, Sartorius, Göttingen) filtriert und entgast. Die chromatographischen Auftrennungen wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 12.1.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Die HIC beruht auf der Wechselwirkung zwischen den hydrophoben Resten der Proteinoberfläche und dem apolaren Material der stationären Phase der Säule. Salze können die Hydrathülle eines Proteins auflösen und somit die im Innern des Proteins lokalisierten hydrophoben Seitenketten frei geben. Dabei absorbiert das Protein umso leichter an die Säulenmatrix, je hydrophober die Oberfläche dessen Außenseite beschaffen ist. Die über Van-der-Waals-Kräfte gebundenen Proteine werden anschließend mit einem absteigenden Salzgradienten eluiert. Proteine mit wenigen apolaren Gruppen eluieren zuerst.

Die Interaktionschromatographie wurde an der XK 16/20 Säule (GE Healthcare, 10 cm Höhe, Phenylsepharose HP) durchgeführt. Vor dem Auftragen der Probe wurde die Säule 1 h mit dem Bindungspuffer mit einer Flussrate von 10 ml/min äquilibriert. Die Probe nach Ammoniumsulfatfällung wurde komplett auf die Säule aufgetragen. Die Auftragsgeschwindigkeit sowie die Flussrate des gesamten Laufs betrug 10 ml/min. Nicht gebundene Bestandteile wurden zunächst durch einen Waschschrift von der Säule entfernt. Der absteigende lineare Ammoniumsulfat-Gradient von 30% auf 0% Ammoniumsulfat wurde durch den Bindungs- und Elutionspuffer als Laufmittelgemisch eingestellt. Das Eluat wurde in Reagenzgläsern zu je 10 ml gesammelt und auf Galaktitol-Dehydrogenase-Aktivität getestet (vgl. Kapitel 13.1). Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und auf 35 ml Endvolumen eingeeengt (Amiconkammer, Membranfilter: 10.000 Da MWCO, Millipore, Schwalbach).

#### Bindungspuffer: pH 6,5

BisTris	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30%

#### Elutionspuffer: pH 6,5

BisTris	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

### 12.1.4. Gelfiltration

Bei einer Gelfiltration werden Proteine anhand ihrer unterschiedlichen Größe getrennt. Die Methode basiert auf einer unterschiedlichen Permeation der Moleküle in ein poröses Säulenmaterial bekannter Porengröße. Kleine Proteine können die Poren passieren

und erfahren dadurch eine verzögerte Elutionsgeschwindigkeit. Große Proteine haben demzufolge eine kürzere Retentionszeit.

Als Säule wurde eine Sephacryl F300 HR (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) Kranich-Säule (1000 mm x 50 mm mit Temperiermantel) verwendet. Die eingeeengte Probe nach der HIC wurde mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/min auf die mit Arbeitspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen und mit diesem Puffer eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt.

## 12.2. Anreicherung der C-terminal verkürzten GatDH

Die Anreicherung der C-terminal um drei Aminosäuren verkürzten Galaktitol-Dehydrogenase zeigte sich, aufgrund der Tendenz der Variante schnell auszufallen bzw. bis zu 100% in *Inclusion bodies* vorzuliegen, als schwierig. Daher wurden verschiedene Strategien verfolgt, wobei nur diejenige vorgestellt wird, die sich schließlich bewährte. Die Anreicherung erfolgte aus dem rekombinanten *E. coli* BL21-Gold(DE3) Plasmid pET24a(+)-GatDH251.

### Arbeitspuffer: pH 7,0

BisTris 20 mM

### 12.2.1. Anionenaustauschchromatographie (AAC)

Die Ionenaustauschchromatographie basiert auf der Trennung von Proteingemischen aufgrund ihrer unterschiedlichen Oberflächenladung. Die Gesamtladung ist abhängig von dem isoelektrischen Punkt (pI) eines Proteins und wird von dem pH-Wert des Puffers beeinflusst. Beim Anionenaustausch muss der pH-Wert des Puffers höher sein als der pI des anzureichernden Proteins. Die Wechselwirkung entsteht dann zwischen dem positiv geladenen Säulenmaterial und der negativen Ladung der Proteinseitenketten. Je stärker die negative Gesamtladung der Proteine, desto stärker die Bindung und verzögerter die Elution. Durch stetiges Erhöhen der Salzkonzentration im Puffer, also um die Bindung konkurrierender negativ geladener Ionen (z.B. Chloridionen bei NaCl), werden die an der Säulenmatrix haftenden Proteine zunehmend verdrängt. Bei Kationenaustauschern verhält es sich umgekehrt.

Die AAC fand an einer Sepharose Q-Säule mit einem Säulenvolumen von 30 ml statt. Der Rohextrakt wurde nach dem Aufschluss und einer zweistündigen Zentrifugation

bei 18.000 x g und 4°C auf pH 7,5 titriert (pH-Meter Typ CG820, Schott, Mainz). Vor dem Auftragen (Flussrate: 2 ml/min) auf die mit Bindungspuffer äquilibrierte Säule wurde der Rohextrakt sterilfiltriert (0,45 µm, Minisart, Sartorius, Göttingen). Der Rohextrakt (45 ml) wurde auf zwei Läufe aufgeteilt. Nicht-gebundene Moleküle wurden mit vier Säulenvolumen (SV) Bindungspuffer mit einer Flussrate von 2 ml/min von der Säule gespült. Die gebundenen Proteine wurden mit einer Flussrate von 4 ml/min durch Beimischen des Elutionspuffers zunächst über einen steigenden Salzgradienten von 0% auf 80% NaCl über 15 SV eluiert. Danach erfolgte zur Elution aller restlichen gebundenen Moleküle ein Stufengradient über 5 SV von 80% auf 100%. Mangels Aktivität der Variante konnte hier kein Enzymtest durchgeführt werden und die Fraktionen (8 ml) wurden stattdessen mittels einer SDS-PAGE getestet (vgl. Kapitel 14.1.2). Die positiven Fraktionen wurden besonders langsam und schonend zunächst über eine Amiconkammer (Membranfilter: 5.000 Da MWCO, Millipore, Schwalbach) bis einem Volumen von maximal 5 ml eingengt. Das weitere Einengen der Probe bis zu dem gewünschten Probenvolumen von 0,5 ml erfolgte anschließend mit einer Filtrationsseinheit (Vivaspin 2 ml, Membran: 5.000 Da, Vivascience<sup>®</sup>, Hannover) durch mehrmalige Zentrifugation bei 2.500 x g und 4°C.

### **Bindungspuffer: pH 7,5**

BisTris 20 mM

### **Elutionsspuffer: pH 7,5**

BisTris 20 mM  
NaCl 1000 mM

### **12.2.2. Gelfiltration**

Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mit einer Superdex S200-Säule, der Trennbereich des Materials lag zwischen einer molekularen Masse von ca. 10.000 - 600.000 Da. Vor dem Auftragen der Probe über eine Probenschleife (0,5 ml) wurde die Säule mit einem Säulenvolumen (25 ml) Laufpuffer äquilibriert. Die Elution wurde wie die zuvor erwähnten Schritte des Programmes mit einer Flussrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Fraktionen wurden als 0,75 ml Proben in Mikrotiterplatten gesammelt und per SDS-PAGE (vgl. Kapitel 14.1.2) untersucht.

**Laufpuffer: pH 7,5**

BisTris 20 mM  
NaCl 250 mM

**12.3. Anreicherung der N-terminal His(6)-getagten Varianten**

Zur schnelleren und effizienteren Anreicherung des Galaktitol-Dehydrogenase-Enzyms wurde das Protein N-terminal mit einem His(6)-Tag modifiziert. Die zur Elektroenzymatik hergestellten Cystein-Varianten tragen die zusätzlichen Cysteinreste ebenfalls vor dem N-terminal angebrachten His(6)-Tag, über den auch diese Varianten angereichert wurden. Bei allen Expressionstämmen handelte es sich um *E. coli* BL21-Gold(DE3)-Zellen mit den jeweiligen Plasmiden mit N-terminalem His(6)-Tag: pET24a(+)-NHis-GatDH beziehungsweise den zusätzlichen, unterschiedlich langen Cystein-Tags: pET24a(+)-(2-5)Cys-GatDH.

**Arbeitspuffer: pH 6,5**

BisTris 20 mM  
Imidazol 20 mM

**12.3.1. Affinitätschromatographie**

Die Affinitätschromatographie erfolgte an *Fast Flow* Nickel-Sepharose als Säulenmaterial. Dieses besteht aus stark verknüpften Agarose-Perlen, die Nickelionen sind als Liganden über den Chelatbildner Nitrilo-Tri-Essigsäure (NTA) an eine Matrix immobilisiert. Histidine können reversibel mit den Metallionen komplexieren. Diese Eigenschaft macht man durch Fusionskonstrukte aus exponierten His(6)-Tags zunutze, um die gewünschten Proteine über die somit gesteigerte Affinität an die Säule zu binden. Andere Proteine des Extraktes können weniger stark binden und werden durch Zugabe geringer Mengen Imidazol im Arbeits- und Bindungspuffer zusätzlich an der Komplexierung gehemmt.

Vor dem Auftragen (Flussrate: 2 ml/min) auf die mit Bindungspuffer äquilibrierte 5 ml HisTrap-Crude-FF-Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) wurde der Rohextrakt sterilfiltriert (0,45  $\mu$ m, Minisart, Sartorius, Göttingen). Der Rohextrakt wurde abhängig vom Proteingehalt auf mehrere Läufe aufgeteilt (4 - 7 ml RE/Lauf). Vor Elution der gebundenen Proteine mittels Imidazol in 2 ml Fraktionen, wurde die Säule mit Bindungspuffer gespült (Flussrate jeweils 5 ml/min). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und

umgepuffert.

### **Bindungspuffer: pH 6,5**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	30 mM

### **Elutionspuffer: pH 6,5**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM

### **12.3.2. Chromatographisches Umpuffern**

Da sich die Aktivität der Galaktitol-Dehydrogenase in dem Elutionspuffer der Affinitätschromatographie stetig verringerte, wurde die Probe nach Durchführung dieses Anreicherungsschrittes sofort umgepuffert, um das störende Imidazol zu entfernen. Der Elutionspuffer der verwendeten *Desalting*-Säule, der auch den Lagerungspuffer für die angereicherten His-getagten Varianten darstellt, enthielt eine erhöhte BisTris-Konzentration sowie 100 mM Kochsalz. Somit wurde das Enzym beim Pufferwechsel stabil gehalten. Die Säule, bei der es sich im Prinzip um eine Größenausschlusschromatographie handelt, wurde mit einer Flussrate von 5 ml/min beladen. Das Ausgangsvolumen wurde durch diesen Schritt vergrößert. Die Probe ließ sich nach Bedarf mittels Amiconkammer oder Filtrationseinheit wieder aufkonzentrieren.

### **Elutionspuffer: pH 6,5**

BisTris	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

## **13. Bestimmung der Enzymaktivität**

Die Galaktitol-Dehydrogenase besitzt ein breites Substratspektrum und katalysiert die gegenseitige Umsetzung verschiedener, mehrwehrtiger, aliphatischer Alkohole in die korrespondierenden Ketone. Die Assays zu den jeweiligen Oxidations- bzw. Reduktionsreaktionen werden in den folgenden Abschnitten behandelt.

Die Messungen wurden in einer 1 cm dicken 1 ml-Kunststoffküvette bei 30°C in dem Photometer UVmini1240 (Shimadzu, Duisburg) durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden zunächst gut durchmischt, temperiert und der Nullabgleich eingestellt. Die Zugabe des Substrates startete die Reaktion. Die Messdauer betrug 30 s, dabei wurde die Zu- bzw. Abnahme der NADH-Konzentration bei 340 nm bestimmt. Die Menge an entstehendem/verbrauchtem NADH ist der Menge an umgesetztem Substrat äquivalent.

### 13.1. Oxidationsreaktion von Alkoholen

Die Galaktitol-Dehydrogenase oxidiert eine Vielfalt aliphatischer Alkohole und Polyole zu den entsprechenden Ketonen bzw. Ketosen. Dabei werden zwei Elektronen auf den Cofaktor NAD<sup>+</sup> übertragen, der im reduzierten Zustand im Wellenbereich zwischen 300 und 400 nm absorbiert und bei 340 nm sein Absorptionsmaximum besitzt. Zur Bestimmung der Aktivität der Galaktitol-Dehydrogenase wurde folgender Assay durchgeführt:

Messpuffer	500 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	280 $\mu$ l
NAD <sup>+</sup>	20 $\mu$ l
Enzymlösung	100 $\mu$ l
Substrat	100 $\mu$ l

Puffer und Lösungen:

#### Messpuffer: pH 9,0

BisTris 200 mM  
MgCl<sub>2</sub> 1 mM

#### Substrat-Stocklösung

1,2-Hexandiol 1 M

Die Substrat-Stammlösung wurde in Messpuffer angesetzt und in einer Endkonzentration von 0,1 M in der Küvette eingesetzt.

#### Cofaktor

NAD<sup>+</sup> 90 mM

Der Cofaktor wurde in einer Endkonzentration von 1,8 mM in der Küvette eingesetzt.

## 13.2. Reduktionsreaktion von Ketonen

Die Galaktitol-Dehydrogenase katalysiert mit einer hohen Stereoselektivität die Reduktion von kurzkettigen Ketonen zu S-konfigurierten Alkoholen. Der Assay wurde wie folgt angesetzt:

Messpuffer	500 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	280 $\mu$ l
NADH	20 $\mu$ l
Enzymlösung	100 $\mu$ l
Substrat	100 $\mu$ l

Puffer und Lösungen:

### Messpuffer: pH 6,5

Kaliumphosphat	200 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM

### Substrat-Stocklösung

Hydroxyaceton	2 M
---------------	-----

Die Substrat-Stammlösung wurde in Messpuffer angesetzt und in einer Endkonzentration von 0,2 M in der Küvette eingesetzt.

### Cofaktor

NADH	14 mM
------	-------

Der Cofaktor wurde in einer 1% w/v NaHCO<sub>3</sub>-Lösung angesetzt und in einer Endkonzentration von 0,28 mM in der Küvette eingesetzt.

## 13.3. Berechnung der Volumenaktivität

Mit Hilfe der zu Reaktionsbeginn beobachteten Extinktionsänderung pro Zeiteinheit wurde die Volumenaktivität nach folgender Formel errechnet (Bergmeyer und Gawehn, 1977 [16]):

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{\Delta E * V}{\varepsilon * v * d * t} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml} * \text{min}} \right] \text{ bzw. } \left[ \frac{U}{\text{ml}} \right]$$

$\Delta E/\text{min}$	=	Extinktionsänderung bei 340 nm pro Zeiteinheit [ $\text{min}^{-1}$ ]
$V$	=	Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes [ml]
$v$	=	Volumen der Enzymlösung im Reaktionsansatz [ml]
$d$	=	Schichtdicke der Küvette [cm]
$\varepsilon$	=	Extinktionskoeffizient des NADH bei 340 nm = $6,3 [\text{ml} * \mu\text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}]$
$t$	=	Zeit [min]

Der molare Extinktionskoeffizient  $\varepsilon$  gibt das Verhältnis zwischen Extinktion und der Substratkonzentration an. Die Einheit Unit (U) gibt die katalytische Aktivität des Enzyms an, dabei entspricht 1 Unit der Enzymmenge, die einen Umsatz von  $1 \mu\text{mol}$  Substrat pro Minute katalysiert.

Anhand der Volumenaktivität und der zugehörigen Proteinkonzentration lässt sich die spezifische Aktivität nach folgender Formel errechnen:

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\text{Volumenaktivität} \left[ \frac{U}{ml} \right]}{\text{Proteingehalt} \left[ \frac{mg}{ml} \right]} \left[ \frac{U}{mg} \right]$$

### 13.4. Einfluss von Glutardialdehyd auf die Enzymaktivität

Um die Galaktitol-Dehydrogenase für elektroenzymatische Reaktionen nutzen zu können, sollte getestet werden, ob sich eine Immobilisierung des Enzyms auf einer Elektrode über eine Quervernetzung mit dem Glutardialdehyd/Bovines Serum Albumin (BSA)-System, wie es bereits für die Sorbitol-Dehydrogenase gezeigt wurde (Gajdzik et al., 2007 [50]), eignet. Glutardialdehyd (GA) hat die Fähigkeit, Proteine zu binden und zu vernetzen. Die GatDH wird über die Vernetzung durch das GA mit dem BSA in dem Mikroassay stabilisiert. Um den Einfluss von GA auf die Aktivität des Enzyms zu testen, wurde die GatDH 1 h mit einem GA/BSA-Gemisch verschiedener Konzentration vorinkubiert und anschließend in den normalen Oxidationsassay eingesetzt. BSA wurde jeweils in einer Endkonzentration von 1% (w/v) eingesetzt, GA in den Konzentrationen 0,05% (w/v) bis 1%(w/v).

#### Glutardialdehyd-Stocklösung

Glutardialdehyd 10%

#### BSA-Stocklösung

Rinderserum Albumin 10%

## 13.5. Test auf kompetitive Inhibitoren

Durch die Cokristallisation eines Enzym-Inhibitor-Komplexes können neue Erkenntnisse über das aktive Zentrum eines Enzyms, z.B. über die Substratbindung, gewonnen werden.

Von den putativen Inhibitorsubstanzen wurden jeweils 1 molare Stocklösungen hergestellt und diese in der Küvette bis zu einer Endkonzentration von 0,1 M eingesetzt. Für die Oxidationsreaktion wurde 1,2-Hexandiol als Substrat verwendet und folgende Substanzen als mögliche Inhibitoren getestet: 2-Propanol, 1-Butanol, 1-Pentanol, Isoamylalkohol, Cyclopentanol, 1-Hexanol und Cyclohexanol. Für die Reduktionsreaktion diente Hydroxyaceton als Substrat und die Substanzen: Aceton, 2-Butanon, 2-Pentanon, 3-Hexanon, Cyclohexanon und 3-Heptanon wurden auf eine kompetitive Inhibition untersucht.

## 14. Proteinchemische Analyse

### 14.1. Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE)

#### 14.1.1. Native PAGE

Die native PAGE wurde mit 4%-20%igen Tris-HCl Gradientengelen der Firma Bio-Rad (München) durchgeführt. Die Proteinproben wurden mit dem Doppelten ihres Volumens an Probenpuffer gemischt und zu je 30  $\mu$ l auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker mit jeweils 10  $\mu$ l pro Tasche wurden der *Precision Plus Dual Color*-Marker (Bio-Rad) und der *Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die elektrophoretische Trennung wurde bei 20 V über 15 h durchgeführt. Das Gel wurde anschließend 4 h in Coomassie-Blau ge- und danach mehrere Stunden in Fixierer wieder entfärbt.

Puffer und Lösungen:

#### Solubilisierungspuffer

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
Glycerin	2,50 ml
0,5% Bromphenolblau	0,20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	5,55 ml

## Elektrodenpuffer

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

### 14.1.2. SDS-PAGE (Laemmli, 1970 [116])

Die SDS-PAGE wurde zur Reinheitskontrolle, Größenbestimmung, Expressionskontrolle und Identifikation des zu untersuchenden Enzyms eingesetzt. SDS (Natriumdocylsulfat) ist ein anionisches Detergens und wird zur Denaturierung und Solubilisierung von Proteinen eingesetzt. Die Polypeptidketten können mit den negativ geladenen SDS-Molekülen einen Komplex bilden, so dass die Oberflächenladung nur noch von dem SDS repräsentiert wird. Die Proteinproben wurden mit dem Doppelten ihres Volumens an frischem Solubilisierungs-Puffer versetzt und 10 min gekocht. Das Mercaptoethanol bricht als Reduktionsmittel die Schwefelbrücken der Proteine auf und sorgt somit für eine völlige Entfaltung. Für die diskontinuierliche Gelelektrophorese wurde die Mini-Protean-Apparatur (Bio-Rad, München) verwendet und je nach Anforderung Gele der Stärke 0,75 mm sowie 1,5 mm gegossen. Als Matrix zur Auftrennung dienten Acrylamid-Polymere, die durch radikalische Polymerisation entstehen. Die Porengröße wurde durch die Acrylamid/Bisacrylamidkonzentration variiert. Die Radikalstarter-Lösung wurde kurz vor Gebrauch frisch angesetzt, alle anderen Puffer wurden bei 4°C gelagert. Die Gelbestandteile wurden in einer festgelegten Reihenfolge zusammengegeben (vgl. Tabelle 21) und auf einem Magnetrührer bis zur Homogenität gemischt. Bis zur vollständigen Polymerisation wurde das Trenngel mit 100% Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen des Gels zu verhindern und eine planare Phasentrennung zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten. Danach wurde das Isopropanol vollständig entfernt und das engporige Trenngel mit dem großporigen Sammelgel überschichtet. Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Proben, das Trenngel trennt mittels eines Siebeffekts die Proben nach ihrer Größe auf. Von Proteinüberständen wurden 10 µl, von resuspendierten Zellpellets 5 µl auf das Gel aufgetragen. Als Markerproteine wurden der *Precision Plus Dual Color*-Marker (Bio-Rad) und der *Unstained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet und jeweils 7 µl in die Geltaschen eingefüllt. Zunächst wurde die Elektrophorese bei 50 V gestartet, sobald die Proben in das Trenngel eingedrungen waren, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die Proteine wanderten im elektrischen Feld 1 h mit einer Geschwindigkeit, die ihrer molekularen Masse entspricht durch das Polyacrylamidgel in Richtung Anode. Die Trennung war beendet, wenn die Bromphenolblau-Front das Gelende er-

reichte.

Tabelle 21.: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels.

	Trenngel	Sammelgel
Gelkonzentration	10 %	5 %
Acrylamid-Lösung	2,5 ml	1,25 ml
Trenn-/Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	5,0 ml	6,25 ml
TEMED	5,0 µl	10,0 µl
Radikalstarter-Lösung	50,0 µl	50,0 µl
TEMED	5,0 µl	5,0 µl

Puffer und Lösungen:

### Acrylamid-Lösung (Roth, Karlsruhe)

Rotiphorese 28:1 40%ige-Lösung

### Trenngel-Puffer: pH 8,7

Tris 18,2 g  
 SDS 0,4 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> ad 100 ml

### Sammelgel-Puffer: pH 6,8

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

### Radikalstarter-Lösung

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

### Elektrodenpuffer

Tris 3,0 g  
 Glycin 14,4 g  
 SDS 1,0 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> ad 1000 ml

### Solubilisierungs-Puffer

Solubilisierungs-Stammlösung 950 µl  
 β-Mercaptoethanol 50 µl

## Solubilisierungs-Stammlösung

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
10% SDS	2,00 ml
Glycerin	2,50 ml
0,5% Bromphenolblau	0,20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	3,55 ml

### 14.1.3. Coomassie-Proteinfärbung

Die Proteine wurden bei dieser Färbemethode im Gel gleichzeitig blau gefärbt und fixiert (Zehr et al., 1989 [238]). Dazu wurde das Gel mit Färbelösung bedeckt und für 3 x 30 s bei 360 Watt in einer Mikrowelle (FM411, Moulinex, Leipzig) oder alternativ 2 h bei RT auf einem Kippschüttler (GFL, Burgwedel) inkubiert. Die Färbelösung wurde anschließend entfernt und das Gel in frischem Fixierer entfärbt, wobei alle 30 min ein Wechsel der Fixierlösung erfolgte. Dies wurde solange wiederholt, bis das Gel im Hintergrund der Proteinbanden farblos war (modifiziert nach Weber und Osborn, 1969 [226]).

#### Fixierer

Methanol	300 ml
Essigsäure	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	500 ml

#### Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R-250 1,0%  
in Fixierer

### 14.1.4. Isoelektrische Fokussierung

Die native isoelektrische Fokussierung dient der Trennung von Proteinen aufgrund ihres relativen Gehalts an sauren und basischen Resten. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins entspricht dem pH-Wert, bei dem die Nettoladung des Proteins und somit auch seine Beweglichkeit im elektrischen Feld gleich Null ist. In einem pH-Gradientengel wandern Proteine so weit, bis sie den pH-Wert im Gel erreicht haben, der ihrem jeweiligen pI entspricht. Selbst Isoenzyme bzw. Proteine, die sich um nur geringe pI-Werte unterscheiden, lassen sich noch voneinander trennen (Radola, 1980 [160]).

Es wurden Servalyt Precotes Gradientengele pH 3-10 (150  $\mu\text{m}$ , 125 mm x 125 mm, Serva, Heidelberg) und der dazu passende Proteinstandard P9 (IEF Marker 3-10, Serva) verwendet. Die Proteinprobe wurde zuvor mittels einer Filtrationseinheit (Vivaspin 500  $\mu\text{l}$ , Membran: 10.000 Da, Vivascience<sup>®</sup>, Hannover) in Wasser umgepuffert. Nach Auftragen der Elektrodenflüssigkeiten, die als Polyampholyte mit unterschiedlichen pI-Werten zur Herstellung des pH-Gradienten im Gel dienen, erfolgte zunächst eine Vorfokussierung (Kammer: 2117 Multiphor II-Electrophoresis-Unit, LKB, Uppsala, Schweden; Kühlanlage: DLK 300, FRYKA Kältetechnik, Esslingen; Fokussierungsbedingungen: *low range*, 2000 V, 6 W, 3 mA) bis zu einer Spannung von 500 V. Von den Proben und dem Marker wurden je 10-20  $\mu\text{l}$  aufgetragen und die Fokussierung bis zur Spannungskonstanz durchgeführt. Danach wurde das Gel 20 min in 20% Trichloroessigsäure (w/v) inkubiert und kurz mit Entfärberlösung gespült. Die Inkubationszeit in der Färbelösung betrug 10 min. Schließlich wurde das Gel so lange in Entfärberlösung gewaschen, bis der Hintergrund entfärbt war.

### Färbelösung

Serva Blue W	400 mg
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	1000 ml

### Entfärber

Methanol	400 ml
Essigsäure	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	500 ml

## 14.2. Proteinbestimmung

Das BCA<sup>™</sup> Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) diente zur Quantifizierung des Gesamtproteingehalts einer Probe. Die Methode stellt eine Modifikation des von Lowry-Assays dar (Hartree, 1972 [70]) und basiert auf der sogenannten Biuret-Reaktion. In alkalischem Medium werden Cu<sup>2+</sup>-Ionen durch die Proteine zu Cu<sup>+</sup> reduziert und komplexiert. Dieser Komplex wird von der Bicinchoninsäure (BCA) stabilisiert, wobei aus einem Kupferkation und zwei BCA-Molekülen ein violett gefärbtes Reaktionsprodukt entsteht (Smith et al., 1985 [197]). Dieses Produkt ist wasserlöslich, zeigt sein Absorptionsmaximum bei 562 nm und eignet sich somit zu einer hoch sensitiven und selektiven kolorimetrischen Detektion in einem Bereich von 20 - 2000  $\mu\text{g/ml}$  Protein. Die Absorption verhält sich dabei linear zur Proteinkonzentration. Die makromolekulare Struktur des Proteins, die Anzahl der Peptidbindungen, sowie die Anwesenheit

der Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin sind für die Farbreaktion mit verantwortlich (Wiechelman et al., 1988 [228]).

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer Eichkurve des Referenzstandards Rinderserum Albumin (BSA) bestimmt. Die Eichgerade wurde aus einer den Messbereich abdeckender BSA-Verdünnungsreihe erstellt und dabei der Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung ermittelt. Die Proteinproben wurden in unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen und wie die Standards behandelt. Es wurden 25  $\mu\text{l}$  Probe/Eichgerade pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte vorgelegt und je 200  $\mu\text{l}$  frische Arbeitslösung, ein Gemisch im Verhältnis 50:1 aus den beiden Reagenzien A (BCA) und B (Kupfersulfat), den Proben und dem Standard zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 30 min bei 37°C im Reader (Model 680 XR microplate reader, Bio-Rad, München) inkubiert und bei 562 nm automatisch vermessen. Die Auswertung der zu analysierenden Proben erfolgte anhand der durch Trippelmessung ermittelten Eichgerade mit Hilfe des Programms *Excel* (Microsoft).

### 14.3. Tryptischer Verdau

Bei Trypsin handelt es sich um eine Serinprotease, die in einer Polypeptidkette spezifisch nach jedem Lysin bzw. Arginin schneidet, sofern diese nicht von einem Prolin gefolgt werden, da jene Bindung fast vollständig resistent für die Spaltung von Trypsin ist. Das verwendete Trypsin ist methyliert, somit wird ein geringerer Selbstverdau gewährleistet (Trypsin, *Sequencing Grade Modified*, Promega, Mannheim).

#### 14.3.1. Direkter Verdau

Von einer angereicherten Proteinprobe wurden 20  $\mu\text{l}$  mit 0,5  $\mu\text{l}$  Trypsin versetzt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde der Ansatz anschließend eingefroren.

#### 14.3.2. Verdau in einem SDS-Gel

Nach mehreren aufeinander folgenden Anreicherungsritten kann eine Proteinprobe immer noch unerwünschte Fremdproteine enthalten. Ein tryptischer Verdau im Gel (Shevchenko et al., 1996 [193], modifiziert) bietet die Möglichkeit, das Proteingemisch oder direkt den Rohextrakt elektrophoretisch aufzutrennen und nur die gewünschten Banden dem Verdau zu unterziehen und somit die Identität der entsprechenden Proteinbanden aufzuklären.

Die zu untersuchende Probe wurde dreimal zu je 50  $\mu\text{l}$  pro Tasche auf ein 1,5 mm dickes, präparatives SDS-Gel aufgetragen und das Gel nach dem Lauf einer 2 stündigen Coomassiefärbung unterzogen. Die Hintergrundfärbung wurde mehrmals mit frischem Fixierer ausgewaschen. Die gewünschten Banden wurden anschließend mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und zerkleinert. Die Gelstücke wurden in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben und 2 x 15 min in  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  gewaschen. Danach wurden die Gelstücke 2 x 15 min in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch inkubiert und dann 15 min in AcCN (reinst) gewaschen. Das Acetonitril ließ die Gelstücke stark zusammen schrumpfen. Nach dem die Gelstücke nach ca. 15 min an der Luft vollständig getrocknet waren, wurden 20  $\mu\text{l}$  der Trypsin-Lösung zugegeben. Das Trypsin wurde dazu vorher in frischen 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer gegeben. Das Quellen der Gelstücke wurde nach 15 min kontrolliert, die Gelstücke mussten weiterhin komplett bedeckt sein, ansonsten wurde noch Puffer (ohne Trypsin) zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Der Überstand wurde in ein neues, steriles Gefäß gegeben und bei -20°C gelagert.

Puffer und Lösungen:

#### **Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1)**

Acetonitril 1 ml  
 $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  1 ml

#### **Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer**

$\text{NH}_4\text{HCO}_3$  32 mg  
 $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  ad 10 ml

#### **Trypsin-Lösung**

Trypsin 1,6  $\mu\text{l}$   
 $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer 250  $\mu\text{l}$

### **14.4. MALDI-TOF-MS/MS Massenspektrometrie**

Das Prinzip der MALDI Massenspektrometrie (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*) ist das Einbetten eines Proteinmoleküls in das Kristallgitter einer Matrix, welche im Hochvakuum mit Hilfe eines Lasers bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird. Die Kristallmatrix absorbiert dabei die meiste Energie und überträgt einen

geringen Teil dieser Energie auf den Analyten. Die dabei entstehenden Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt. Danach besitzen die Ionen verschiedene Geschwindigkeiten in Abhängigkeit von ihrer Masse und werden in einem Flugzeitanalysator (TOF: *Time of Flight*) detektiert. Zunächst erfolgt eine Eichung mit Referenzsubstanzen bekannter Massen, anhand der sich die zu untersuchenden Proben bestimmen lassen.

Die Messung wurde mit dem Massenspektrometer Bruker Reflex III™, der SCOUT 386 Ionenquelle (Bruker Daltoniks, Bremen) und der Computeranlage Ultra 5 Spark (Sun, Santa Clara, CA, USA) mit einem Lecroy 9384C 4 GHz Digitizer (Lecroy Corp., Chestnut Ridge, NY, USA) durchgeführt. Als Analytproben wurden die direkt oder im SDS-Gel mit Trypsin verdauten Proteinproben verwendet. Probe und Matrix wurden jeweils in den Verhältnissen 1:1 und 1:9 gemischt. Für die Bestimmung der Molekülmassen der einzelnen Peptidfragmente wurde CCA ( $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure) als Matrix verwendet. Auf einen Proben-teller wurden je 1  $\mu$ l des Proben-Matrix-Gemischs aufgetragen. Nach Verdunsten des Lösungsmittels erfolgte die Cokristallisation des Analyten und der Matrix. Der Proben-teller wurde in das Massenspektrometer eingelegt und mit einem Laser bei 337 nm bestrahlt. Die erhaltenen Massenpeaks der Peptidfragmente wurden zur Identifizierung mit der Datenbank *Mascot* (<http://www.matrixscience.com>) und dem Internet-*Tool Protein Prospector* (<http://prospector.ucsf.edu>) abgeglichen.

# III. Experimente und Ergebnisse

Die Grundlage dieser Arbeit stellt eine Chemostatenanzucht des Organismus *Rhodobacter sphaeroides* Stamm Si4 dar, bei der eine neue, Galaktitol-metabolisierende Mutante entstand (Schneider, 1990 [185]). Der Wildtypstamm wurde dabei in einem Minimalmedium kultiviert, welches D-Glucitol als Kohlenstoffquelle in einer wachstumsbegrenzenden Konzentration von 1 mM und zusätzlich das nicht verwertbare Galaktitol in einem Überschuss von 20 mM enthielt. Nach einer Kultivierungszeit von 54 Tagen konnte durch einen starken Anstieg der optischen Dichte auf die Metabolisierung des Galaktitols geschlussfolgert werden. Die *gain of function* Mutante ließ sich in Reinkultur isolieren und zeigte zudem gegenüber dem Wildtypstamm ( $<0,05$  U/mg) eine stark erhöhte Galaktitol-Dehydrogenase-Aktivität (0,4 U/mg) im Rohextrakt. Der neue Stamm wurde als *Rhodobacter sphaeroides* D bezeichnet und daraus das Enzym Galaktitol-Dehydrogenase isoliert und charakterisiert (Schneider et al., 1995 [188]).

## 1. Anreicherung des unmodifizierten GatDH-Enzyms

Da in dieser Arbeit mehrere neue Varianten der GatDH hergestellt und mit verschiedenen Methoden getestet wurden, sollte das unmodifizierte Enzym in den jeweiligen Experimenten als Vergleich beziehungsweise als Positivkontrolle dienen. Der plasmidtragende *E. coli* BL21(DE3)-Stamm (pET24a(+)-nGDH(D)) wurde dazu in einem 10 l Fermenter in Komplexmedium kultiviert und das Enzym nach dem in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten Protokoll angereichert (vgl. Tabelle 22).

Bei Schneider et al., 1995 [188] wurde bereits eine Methode zur Anreicherung der nativen GatDH aus dem Organismus *Rhodobacter sphaeroides* Stamm D beschrieben. Bei dieser Strategie wurde das Enzym über fünf Schritte angereichert: Ammoniumsulfatfällung, Hydrophobe Interaktionschromatographie an Phenyl Sepharose, Anionenaustausch an Q-Sepharose, Affinitätschromatographie an einer Red-A Säule und Gelfiltration. Aus einer Anzucht im 10 l Bioreaktor in Minimalmedium wurden dabei 1500 Units Gesamtaktivität im Rohextrakt gewonnen und am Ende der Anreicherung noch 36% Ausbeute mit einer spezifischen Aktivität von 5,2 U/mg erhalten.

Tabelle 22.: Anreicherung der unmodifizierten GatDH, heterolog exprimiert in *E. coli* aus einer 10 Liter Fermentation.

		Volumen [ml]	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt- protein [mg]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Anreiche- rung [-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt		243	6976	3402	2,1	1,0	100
ASF		250	6189	1700	3,6	1,7	89
HIC		240	3873	1104	3,5	1,7	56
Gelfil- tration	Pool 1	32,0	1376	236	5,8	2,8	20
	Pool 2	34,5	2018	152	13,3	6,3	29
	Gesamt	66,5	3394	388	9,6	4,6	49

Das hier verwendete Protokoll zur Anreicherung der heterolog exprimierten GatDH wurde auf drei Anreicherungsschritte verkürzt. Im zellfreien Rohextrakt wurden 6976 U mit einer spezifischen Aktivität von 2,1 U/mg erhalten. Nach der ASF und der HIC wurde das Enzym 1,7-fach auf 3,5 U/mg angereichert. Nach der Gelfiltration wurden die Fraktionen in zwei getrennten Protein-Pools (1 + 2) vereinigt, da in den Fraktionen noch unterschiedlich viele Fremdproteine vorhanden waren. Insgesamt konnten so nach der Gelfiltration 49% der Gesamtaktivität erhalten werden. Im Pool 2 konnte die spezifische Aktivität unter 6,3-facher Anreicherung des Enzyms sogar auf 13,3 U/mg gesteigert werden. Die Reinheitskontrolle wurde in einer SDS-PAGE (siehe Abbildung 14) vorgenommen.

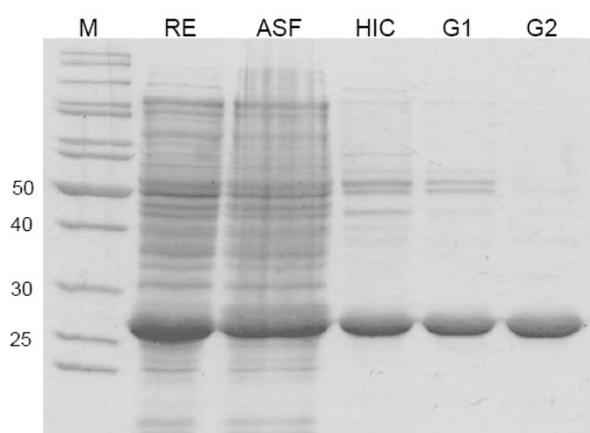


Abbildung 14.: SDS-PAGE der angereicherten unmodifizierten GatDH. Als Marker (M) dienten 7  $\mu$ l des Protein Ladder 10-200 kDa (Fermentas). Es wurden jeweils 10  $\mu$ l des Rohextraktes (RE), der 30%igen Ammoniumsulfatfällung (ASF), der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) und zweier gepoolter Fraktionen nach der Gelfiltration (G1, G2) auf das Gel geladen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

Nach den lediglich drei durchgeführten Anreicherungsschritten war die native GatDH bereits als distinkte Bande im zweiten Pool der Gelfiltration sichtbar. Der erste Pool enthielt dagegen noch eine geringe Anzahl an Fremdproteinen, wurde aufgrund des relativen hohen Anteils an Gesamtaktivität von 20% jedoch nicht verworfen.

## 2. Vergleichende Analyse der GatDH-Gen Sequenzumgebung in *Rhodobacter sphaeroides* Si4 und D

Der während des Chemostatenversuchs neu entstandene Mutationsstamm *Rhodobacter sphaeroides* D kann aufgrund der konstitutiv exprimierten Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) im Gegensatz zum Stamm Si4 Galaktitol als Kohlenstoffquelle nutzen und dieses zu L-Tagatose oxidieren (Schneider et al., 1995 [188]). Durch den Edman-Abbau wurden die ersten 20 Aminosäuren des GatDH-Proteins bestimmt. Diese ließen sich nach einer vollständigen Genomsequenzierung und Datenbankhinterlegung des *type strain Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 dem ORF (*open reading frame*) RSP\_2363 zuordnen. Somit wurde die Klonierung und heterologe Expression des GatDH-Gens aus Stamm D in *Escherichia coli* durch Ableitung entsprechender Primer möglich (Zimmer, 2006 [242]).

Es wurden sowohl der ORF des GatDH-Gens, als auch die ihn flankierenden Sequenzen des *type strain Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, des Parentalstammes *Rhodobacter sphaeroides* Si4, sowie des Mutationsstammes *Rhodobacter sphaeroides* D, der als einziger dieser Organismen die GatDH konstitutiv bilden kann, auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Sequenz untersucht (Zimmer, 2006 [242]). Die Analyse ergab eine 100%ige Übereinstimmung in der Nukleotidsequenz zwischen der 765 bp großen, Enzym kodierenden Sequenz der Stämme Si4 und D. Diese Sequenz zeigte insgesamt 26 Basenunterschiede bzw. fünf Unterschiede in der Aminosäuresequenz zum in der Datenbank hinterlegten Stamm 2.4.1. Die Universalität des genetischen Codes garantiert, dass identische Basentriplets auch immer in die gleichen Aminosäuren translatiert werden. Somit konnte eine direkte Enzymevolution der GatDH im Mutationsstamm D gegenüber dem Parentalstamm Si4 ausgeschlossen werden. Vielmehr spricht dieses Ergebnis für eine regulatorische Modifikation im Stamm D. Auch in den von Zimmer 2006 analysierten flankierenden Sequenzen zeigten die Stämme Si4 und D 128 bp *upstream* und 156 bp *downstream* des GatDH-Gens eine 100%ige Übereinstimmung in der Sequenz. Allerdings wies der die GatDH

exprimierende Stamm D als einziger der untersuchten Stämme einen zusätzlichen Sequenzeinschub von 21 bp acht Basenpaare vor dem Startcodon ATG des GatDH-Gens auf. Bei der Einschubsequenz handelt es sich um eine Verdopplung des Sequenzabschnitts acht Basen vor dem Translationsstart und 13 bp der GatDH kodierenden Sequenz. Der *type strain* 2.4.1 wies in den genflankierenden Abschnitten wiederum mehrere Basenunterschiede zu den beiden anderen Stämmen auf.

## 2.1. Identifizierung unbekannter Sequenzabschnitte in *Rhodobacter sphaeroides* D

Aufgrund der vollständigen Identität der GatDH kodierenden Nukleotidsequenzen in den beiden Stämmen *Rhodobacter sphaeroides* Si4 und D wurde eine evolutive Enzymmutation als Grund für die lediglich im Stamm D stattfindende GatDH Expression ausgeschlossen. In dieser Arbeit wird vielmehr eine im Chemostatenversuch unter Selektionsdruck entstandene Mutation in der genetischen Regulation der Transkription postuliert. Von Zimmer 2006 sind außer der Nukleotidsequenz des Galaktitol-Dehydrogenase-Gens auch 128 bp *upstream* des Gens im Stamm *Rhodobacter sphaeroides* Si4 und 149 bp (128 bp + 21 bp Einschubsequenz) im Stamm *Rhodobacter sphaeroides* D bekannt. Um nach regulatorischen Elementen beziehungsweise weiteren möglichen Unterschieden in der Sequenz im Stamm D gegenüber Stamm Si4 zu suchen, sollte der noch unbekannte Sequenzbereich *upstream* der bereits von Zimmer 2006 ermittelten Sequenz analysiert werden.

Die von Tan et al. 2005 vorgestellte neuartige PCR-Methode, die SiteFinding-PCR, erwies sich aufgrund ihrer schnellen und relativ einfachen Handhabung als ideale Methode für das Chromosom-*Walking*. Das Prinzip der SiteFinding-PCR wurde ausführlich im Material und Methodenteil beschrieben (siehe Abbildung 12, Kapitel 6.3). Als Template wurde die genomische DNA von *Rhodobacter sphaeroides* D in verschiedenen Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10, 1:100 und 1:1000) eingesetzt.

Nach der SiteFinding-Reaktion, also dem *Priming* des SiteFinders an die genomische DNA, wurde die erste Nested-Reaktion mit dem für den SiteFinder spezifischen SFP1-Primer (siehe Abbildung 13, Kapitel 6.3) und dem GatDH spezifischen GDH-RACE-inner-Primer durchgeführt. Das Produkt dieser Reaktion wurde 1:100 verdünnt und als Template für die zweite Nested-PCR eingesetzt. Die zweite Nested-Reaktion besteht an sich aus zwei parallel durchgeführten PCR-Reaktionen, wobei der Sitefinder spezifische Primer SFP2 jeweils mit den GatDH spezifischen Primern GatDH-GSP2 und

GatDH-GSP3 kombiniert wird. Beide SFP-Primer wurden aus der Sequenz des SiteFinders abgeleitet, wobei der SFP2-Primer weiter in Richtung des 3'-Endes lokalisiert ist (siehe Abbildung 13) und sich somit die Spezifität der zweiten Nested-Reaktion erhöht. Bei den genspezifischen Primern verhält es sich so, dass der GatDH-GSP1 (GDH-RACE-inner) innerhalb der GatDH-Sequenz bindet und die Primer -GSP2 und -GSP3 je weiter an das 5'-Ende des Gens rücken, um in Richtung der unbekannt Sequenzbereiche zu lesen. Die Amplifikate der zweiten Nested-PCR wurden auf einem 1,4%igen Agarosegel untersucht (siehe Abbildung 15).

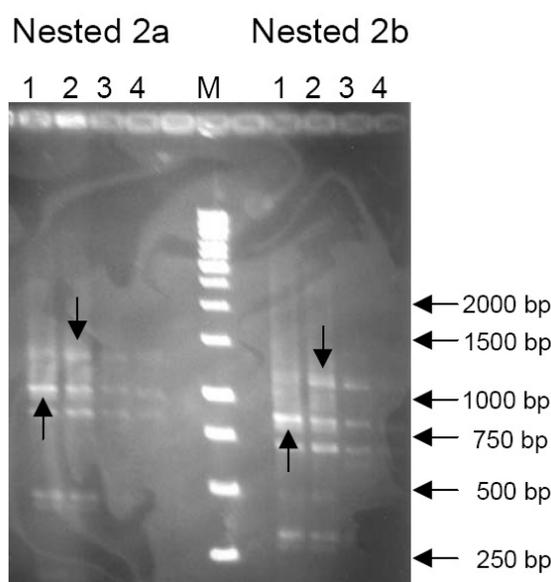


Abbildung 15.: 1,4%iges TBE-Agarosegel der zweiten Nested-PCR der SiteFinding-Reaktion. Nested 2a: Primer GatDH-GSP2, Nested 2b: Primer GatDH-GSP3 jeweils kombiniert mit dem SFP2-Primer. Genomische DNA als Template der SiteFinding-Reaktion: (1) unverdünnt, verdünnt mit Millipore-Wasser (2) 1:10, (3) 1:100, (4) 1:1000, (M) Marker 1kb DNA-Leiter (Fermentas). Die Pfeile zeigen die weiter verwendeten Amplifikate an.

Bei der zweiten Nested-PCR entstand eine Vielzahl an Amplifikaten verschiedener Größe. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich der SiteFinder zuvor an mehreren Stellen gleichzeitig an der genomischen DNA anlagerte. Besonderes Interesse fanden dabei die größten Amplifikate, da ein möglichst großer unbekannter Sequenzbereich ermittelt werden sollte. Bei Tan et al. wurden beim Test mehrerer Proben immer neue Fragmente erhalten, die größer als 1 kb waren. Auf dem Agarosegel ist zu erkennen, dass für alle Verdünnungsstufen Amplifikate entstanden waren. Die besten Resultate wurden für die unverdünnte und die 1:10 verdünnte Template DNA erzielt.

Bei den Fragmenten der Nested 2a-Reaktion war das stärkste Amplifikat bei etwa 1 kb zu sehen (1, schwarzer Pfeil). Das größte Amplifikat von ca. 1,3 kb ließ sich dagegen am besten in Spur 2 (schwarzer Pfeil) erkennen. Als Kontrolle für die Spezifität dieser Produkte diente die Nested 2b-Reaktion mit dem GatDH-GSP3 Primer. Dieser stellt sicher, dass keine falsch positiven Amplifikate gescreent werden, da nur die Zielmoleküle die komplementäre Sequenz für diesen geninternen Primer besitzen.

Auf dem Gel lässt sich dies einfach dadurch erkennen, dass die Amplifikate passend zu den Fragmenten der Nested 2a-Reaktion um genau 100 bp verkleinert sind. Der Grund hierfür liegt darin, dass die Primer GatDH-GSP2 und -GSP3 in einem Abstand von 100 bp aus der GatDH-Sequenz abgeleitet wurden. Die ebenfalls durch einen schwarzen Pfeil markierten Amplifikate auf der rechten Seite des Markers bestätigen so die zuvor erwähnten und ebenfalls auf der linken Seite markierten Banden. Jene größeren Fragmente wurden für die TOPO-Klonierung eingesetzt und anschließend sequenziert. Das größte bei der SiteFinding-PCR erhaltene Amplifikat von 1331 bp wurde nach der Sequenzierung mit dem selben Sequenzbereich im *type strain Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 durch Bildung eines *Alignments* beider Sequenzen verglichen (siehe Abbildung 16).

1 60  
*R.sph.* 2.4.1 ..TCATCCTGATCGGGCTGCGGGATGGATCCGCAGCCAGAGGCCAGGGGGCGAAATCCGGC  
D-SiteFinder ACTCAACAC,ACCACCT,CGCACAGCGTCCTCAAGCAGCCGCGGGGGGGCGAAATCCGGC

61 120  
*R.sph.* 2.4.1 GATTGGCTCAGGACAGCACAGCACCGTTTCAGCGCCGCGGGCGTCCGAGCTATGACATGG  
D-SiteFinder GATTGGCTCAGGTCAGCACAGCACCGTTTCAGCGCCGCGGGCGTCCGAGCTATGACATGG

121 180  
*R.sph.* 2.4.1 AGGACGGCGACAGCGCCGAGGCCTTCGCGCCTTCGCTGCGGGCGTCCGCTTCAGCGCG  
D-SiteFinder AAGACGGCGACAGCGCCGAGGCCTTCGCGCCTTCGCTGCGGGCGTGGCGCTTCAGCGCG

181 240  
*R.sph.* 2.4.1 AGGATCCAAGCCCGCTCTGGGTGCAGCTGAAAGAACCGGATCGAGCACGCCATCCTCGACG  
D-SiteFinder AGGATCCGAGCCTGCTCTGGGTGCAGCTGAAAGAACCGGATCGAGCATGCCATCCTCGACG

241 300  
*R.sph.* 2.4.1 GAACCCTCCCGAGAACGCGCGCCTGCCCTCCGAACAGGCCATGTGCAGCATGTTTCGACC  
D-SiteFinder GAACCCTCCCGAGAATGCGCGCCTGCCCTCCGAACAGGCCATGTGCAACATGTTTCGACC

301 360  
*R.sph.* 2.4.1 TGTGCGCCCCGGTGATCCGCAATGCGCTGCAGGCGCTGCGGGCGAGGGGCGGGTCATCA  
D-SiteFinder TGTGCGCCCCGGTAATCCGCAATGCGCTGCAGGCGCTGCGGGCGAGGGGCGGGTCATCA

361 420  
*R.sph.* 2.4.1 AGCAGCCGAGAAAGGGCATGTTCTGTGGCTCCGCGCGCGCCCGAGCTTGCCCTTCATGACCT  
D-SiteFinder AGCAGCCGAGGAAGGGCATGTTCTGTGGCTCCGCGGGCACCCGAGCTTGCCCTTCATGACCT

421 480  
*R.sph.* 2.4.1 CGGCGCTCGGCTGCTTCGACGATCTCTCGGCCAAGGGCTACAAGGTCACGGTCAAGACCT  
D-SiteFinder CGGCGCTCGGTGCTTCGACGACCTATCGGCCAAGGGTACAAGGTCACGGTCAAGACCT

481 540  
*R.sph.* 2.4.1 ACGAATTCGGCCTGCATCCGGCCAACGAGGACGAACGGCGCGTCTTCAAGCTGCCGAGG  
D-SiteFinder ACGAATTCGGCCTGCACCCGGCCAACGAGGACGAGCGGCGCGTCTTCAAGCTGCCGAGG

541 600  
*R.sph.* 2.4.1 GATTTTCAGGTGATCCGGCGCGCTGCGCGTCTATCACGCGAACGAGACGCCGCTGACCCATA  
D-SiteFinder GCTTTTCAGGTGATCCGGCGCGCTGCGCGTCTATCACGCGAACGAGACGCCGCTGACCCATA

601 660  
*R.sph.* 2.4.1 CGCTGATCTCGCTGCCCGCACACCGGCTGCCGGGCTTCGAGAAGCTCGATATGGAAGGGC  
D-SiteFinder CGCTGATCTCGCTGCCCGCGCACACCGGCTGCCGGGCTTCGAGAAGCTCGATATGGAAGGGC

661 720  
*R.sph.* 2.4.1 GCTCGATCTTCGGCACGATCCGCGAGCTCTACGGGCTGACGGTCGCGCGGGCGGATCGAT  
D-SiteFinder GCTCGATCTTCGGCACGATCCGCGAGCTCTACGGTCTGACGGTCGCGCGGGCGGATCGCT

721 780  
*R.sph.* 2.4.1 GGCTGAAGGGCGCCATCGTTCGGCCGGAAGTGGCGGCGCGGATGGGCGTGCCGCCCGGGC  
D-SiteFinder GGCTGAAGGGTGCCATCGTTCGGTTCGGAAGTGGCGGCGCGGATGGGCGTGCCGCCCGGGC

781 840  
*R.sph.* 2.4.1 GCGCCATGATCGCCATCGAGTCGGTGCCTACGACCACGACGGCAATGCGCTCGAATATT  
D-SiteFinder GCGCCATGATCGCCATCGAGTCGGTGCCTACGACCACGACGGCAATGCGCTCGAATATT

841 900  
*R.sph.* 2.4.1 ACCGCGCTACTACAACAGCGAAGTGCGCCCGATCCACGTGCGCAACCGACGCCATTAAAG  
D-SiteFinder ACCGCGCTACTACAACAGCGAAGTGCGCCCGATCCACGTGCGCAACCGACGCACATTAAAG

901 960  
*R.sph.* 2.4.1 CGCCTGTCGTCACAGCGAAAAACCTCCAGCGGCCCGGATCTTCGATTTCTGATCATTACC  
D-SiteFinder CGACTGACGTCACACCGAAAAACCTCCAGCGGCCCGGATCTTCGAAATTCGATCATTACC

	961	1020
<i>R.sph.</i> 2.4.1	ACATTGACAGAAGCAGATTTCCTCTACCTTTTTCTGGTAACGACCAGAAACCGCACGT	
D-SiteFinder	ACATTGACAGAAGCAGATTTCCTCTACCTTTTTCTGGTAACGACCAGAAACCGCGTCG	
	1021	1080
<i>R.sph.</i> 2.4.1	CGGGCGCTGGGAAGGACGCGGCCGAGCCTCGGGAGGAACCTTCGGGTCCGGGCTCCGCGT	
D-SiteFinder	CGGGCGCTGGGAAGGACGCGGCCGATCCTCGGGAGGAACCTTCGGGTCCGGGCTCCGCGT	
	1081	1140
<i>R.sph.</i> 2.4.1	CAGG.....GAGGAAGAATGGACTACAGGACGGTTTTTCGTCTC	
D-SiteFinder	CAGGAGGAAGAATGGACTACAGGAGAGGAAGAATGGACTACAGGACGGTTTTTCGTCTC	
	1141	1200
<i>R.sph.</i> 2.4.1	GATGGCGCCTGCGCGGCCGTCACCGGAGCGGGCAGCGGCATCGGCCTCGAAATCTGCCGG	
D-SiteFinder	GATGGCGCCTGCGCGGCCGTCACCGGAGCGGGCAGCGGCATCGGCCTCGAAATCTGCCGG	
	1201	1260
<i>R.sph.</i> 2.4.1	GCCTTCGCAGCCTCGGGCGCGCGGCTCATCCTGATCGACCGCGAGGGCGCGGCCCTCGAC	
D-SiteFinder	GCCTTCGCAGCCTCGGGCGCGCGGCTCATCCTGATCGATCGGGAGGGCTGCGGCCCTCGAC	
	1261	1320
<i>R.sph.</i> 2.4.1	CGGGCAGCTGAAGAGCTCGGC CGGCGGTGGCTTCGCGGATCGTGGCCGATGTGACGGAT	
D-SiteFinder	CGGGCAGCTGAAGAGCTCGGC CGGCGGTGGCTTCGCGGATCGTGGCCGACGTGACGGAT	
	1321	
<i>R.sph.</i> 2.4.1	GCGGAGGCGATGA	
D-SiteFinder	GCGGAGGCGATGA	

Abbildung 16.: Alignment der bei der SiteFinding-PCR amplifizierten Sequenz von Stamm *Rhodobacter sphaeroides* D mit der in der Datenbank hinterlegten Sequenz des *type strains* 2.4.1. Bei beiden Stämmen übereinstimmende Nukleotide sind gelb markiert, nicht übereinstimmende Basen sind weiß. In einer Sequenz fehlende Nukleotide werden durch einen Punkt (.) gekennzeichnet. Der abknickende schwarze Pfeil gibt den Translationsstart des ORFs eines Gens an. Die kodierenden Sequenzbereiche sind schwarz unterstrichen. Die ausschließlich im Stamm D vorhandene Duplikationssequenz wird durch rote Punkte markiert.

In der hinterlegten Sequenz des *type strains Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 wird 5' des zum GatDH-Gen homologen ORFs RSP\_2363 der für ein Regulatorprotein der GntR-Familie kodierende ORF RSP\_2362 beschrieben. Beide ORFs werden in Abbildung 16 durch schwarze Linien angezeigt. Die ORFs des putativen Regulators und der Dehydrogenase werden durch eine 193 bp große Zwischensequenz getrennt. Mit Ausnahme der zusätzlichen 21 bp großen Einschubsequenz, der Duplikationssequenz, die in Abbildung 16 durch eine rot gepunktete Linie markiert ist, zeigte die durch die SiteFinding-PCR ermittelte Sequenz von *Rhodobacter sphaeroides* D auch weiter 5' des GatDH-Gens eine hohe Homologie zu der Sequenz des *type strains*. Der 783 bp große ORF des putativen Regulators der GntR-Familie ist hier ebenfalls vorhanden, die Zwischensequenz ist aufgrund der Insertion auf 214 bp vergrößert.

Insgesamt lassen sich für den untersuchten 1333 bp großen Sequenzbereich von Stamm D im Vergleich zum *type strain* 85 Basenunterschiede identifizieren. Davon liegen 15 Unterschiede im ORF des GatDH-Gens, das hier aber nur in dem Teilstück seiner Anfangssequenz betrachtet wurde und bei der SiteFinding-Reaktion noch mitamplifiziert wurde. Die Unterschiede stimmen mit den von Zimmer 2006 für diesen Bereich angegebenen Austausch überein. Insgesamt konnte durch die SiteFinding-PCR in dieser Arbeit ein noch unbekannter Sequenzbereich von 964 bp *upstream* des bereits bekannten Sequenzstückes in *Rhodobacter sphaeroides* D sequenziert werden. In der gesamten Zwischensequenz befinden sich im Vergleich der Stämme zwölf verschiedene Basen. Im Unterschied zu der von Zimmer 2006 analysierten Sequenz wurde in *Rhodobacter sphaeroides* D ein zusätzlicher Basenaustausch an Position 986, C gegen T, 128 bp vor dem Startcodon ATG des GatDH-Gens ermittelt (Abstand gerechnet inklusive der Einschubsequenz) (siehe Abbildung 16). In der kodierenden Sequenz des GntR-ähnlichen Proteins befinden sich 35 Basenunterschiede. Die restlichen 23 Unterschiede sind vor dem ORF des GntR-Gens zu finden. Aus dem Sequenzbereich unmittelbar vor bzw. aus dem N-Terminus des Gens des GntR-ähnlichen Proteins wurden zwei Primer für die Amplifizierung desselben Sequenzstückes im Stamm *Rhodobacter sphaeroides* Si4 abgeleitet (siehe Abbildung 17).

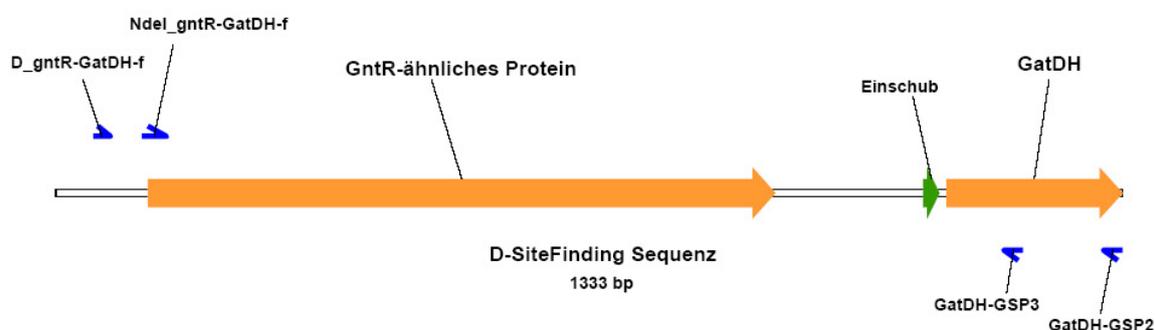


Abbildung 17.: Schema des bei der SiteFinding-PCR ermittelten 1333 bp großen Sequenzstückes von *Rhodobacter sphaeroides* D. Die blauen Pfeile zeigen die Bindungsbereiche der neu abgeleiteten und zur PCR verwendeten Primer an. Die orangefarbenen dicken Pfeile geben die ORFs der Gene wieder. Der grüne Pfeil markiert die lediglich im Stamm D vorhandene Einschubsequenz.

Ein putatives Regulatorprotein kann ebenso wie andere regulatorische Elemente Einfluss auf die Expression anderer Gene nehmen. Nach der Analyse des neu bekannten Sequenzbereichs im *Rhodobacter sphaeroides* Stamm D sollte nun der gleiche Sequenzabschnitt im *Rhodobacter sphaeroides* Stamm Si4 untersucht werden. Dabei galt es zu ermitteln, ob in diesem Stamm ebenfalls ein ORF für ein GntR-ähnliches

Protein bzw. weitere Unterschiede in der Sequenz im Vergleich zum Stamm D vorhanden waren. Um die SiteFinding-Reaktion für den Stamm Si4 nicht wiederholen zu müssen, wurde stattdessen eine Nested-PCR durchgeführt. Aus der bereits für den Stamm D bekannten Sequenz 5'-wärts des GntR-Regulators wurden der nested-Primer D\_gntR-GatDH-f und der Klonierungsprimer *NdeI*\_gntR-GatDH-f abgeleitet. Als Gegenprimer dienten wiederum die in der SiteFinding-Nested-PCR verwendeten GatDH-genspezifischen Primer GatDH-GSP2 und -GSP3.

## 2.2. Sequenzvergleich der Stämme Si4 und D

Für den Stamm *Rhodobacter sphaeroides* Si4 wurde der noch unbekannte Sequenzbereich *upstream* des GatDH-Gens mittels der aus Stamm D abgeleiteten Primer in einer Nested-PCR amplifiziert und sequenziert. Die insgesamt 1741 bp große Sequenz, bestehend aus dem ORF für ein GntR-ähnliches Protein (783 bp), der 193 bp großen Zwischensequenz und dem ORF für die Galaktitol-Dehydrogenase (765 bp) wurde mit dem gleichen Sequenzbereich aus dem *type strain Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 und Stamm D in ein *Alignment* gebracht und verglichen (siehe Abbildung 18).

Die Sequenz des Stammes *Rhodobacter sphaeroides* D ist mit zwei Ausnahmen zu der Sequenz des Stammes Si4 identisch. Zum einen zeigt sich vor dem Translationsstart des GatDH-Gens die bereits erwähnte 21 bp große Duplikationssequenz. Zum anderen befindet sich in der kodierenden Sequenz des GntR-ähnlichen Proteins im Stamm D im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen 2.4.1 und Si4 an Position 77 eine Punktmutation. Die Base Cytosin ist hier durch ein Thymin ersetzt. Die zuvor bereits ermittelten, in allen untersuchten Sequenzteilen vorkommenden Unterschiede der Stämme D und Si4 zum in der Datenbank hinterlegten *type strain* wurden durch diesen Sequenzvergleich nochmals bestätigt.

		5	15	25	35	45	55
2.4.1		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Si4		ATGGAGGACG	GCGACAGCGC	CGAGGCCTTC	CGCGCCTTCG	CTGCGGGCGT	CGCCCTTCAG
D		ATGGAAGACG	GCGACAGCGC	CGAGGCCTTT	CGCGCCTTCG	CCGCGGGCGT	GGCGCTTCAG
Consensus		ATGGAAGACG	GCGACAGCGC	CGAGGCCTTT	CGCGCCTTCG	CCGCGGGCGT	GGCGCTTCAG
		65	75	85	95	105	115
2.4.1		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Si4		CGCGAGGATC	CAAGCCCGCT	CTGGGTGCAG	CTGAAGAACC	GGATCGAGCA	CGCCATCCTC
D		CGCGAGGATC	CGAGCCCGCT	CTGGGTGCAG	CTGAAAACC	GGATCGAGCA	TGCCATCCTC
Consensus		CGCGAGGATC	CGAGCCCGCT	CTGGGTGCAG	CTGAAAACC	GGATCGAGCA	TGCCATCCTC
		125	135	145	155	165	175
2.4.1		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Si4		GACGGAACCC	TTCCCGAGAA	TGCCGCGCTG	CCTTCGGAAC	AGGCCATGTG	CAGCATGTTC
D		GACGGAACCC	TTCCCGAGAA	TGCCGCGCTG	CCTTCGGAAC	AGGCCATGTG	CAACATGTTC
Consensus		GACGGAACCC	TTCCCGAGAA	TGCCGCGCTG	CCTTCGGAAC	AGGCCATGTG	CAACATGTTC
		185	195	205	215	225	235
2.4.1		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Si4		GACCTGTTCG	GCCCAGGAT	CCGCAATGCG	CTGCAGGCGC	TCGCGGGCGA	GGGGCGGGTC
D		GACCTGTTCG	GCCCAGGTAAT	CCGCAATGCG	CTGCAGGCGC	TGGCGGGCGA	GGGGCGGGTC
Consensus		GACCTGTTCG	GCCCAGGTAAT	CCGCAATGCG	CTGCAGGCGC	TGGCGGGCGA	GGGGCGGGTC
		245	255	265	275	285	295
2.4.1		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Si4		ATCAAGCAGC	CGAGAAAGGG	CATGTTTCGTG	GCTCCGCGCG	CGCCCAGACT	TGCCTTCATG
D		ATCAAGCAGC	CGAGGAAGGG	CATGTTTCGTG	GCTCCGCGGG	CACCCAGACT	TGCCTTCATG
Consensus		ATCAAGCAGC	CGAGGAAGGG	CATGTTTCGTG	GCTCCGCGGG	CACCCAGACT	TGCCTTCATG
		305	315	325	335	345	355
2.4.1		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Si4		ACCTCGGCGC	TCGGCTGCTT	CGACGATCTC	TCGGCCAAGG	GCTACAAGGT	CACGGTCAAG
D		ACCTCGGCGC	TCGGTGTCTT	CGACGACCTA	TCGGCCAAGG	GTTACAAGGT	CACGGTCAAG
Consensus		ACCTCGGCGC	TCGGTGTCTT	CGACGACCTA	TCGGCCAAGG	GTTACAAGGT	CACGGTCAAG
		365	375	385	395	405	415
2.4.1		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Si4		ACCTACGAAT	TCGGCCTGCA	TCCGGCCAAC	GAGGACGAAC	GGCGCGTCTT	CAAGCTGCC
D		ACCTACGAAT	TCGGCCTGCA	CCCGCCAAC	GAGGACGAGC	GGCGCGTCTT	CAAGCTGCCG
Consensus		ACCTACGAAT	TCGGCCTGCA	CCCGCCAAC	GAGGACGAGC	GGCGCGTCTT	CAAGCTGCCG
		425	435	445	455	465	475
2.4.1		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Si4		GAGGGATTTT	AGGTGATCCG	GGCGCTGCGC	GTCTATCAGC	CGAACGAGAC	GCCGCTGACC
D		GACGGCTTTT	AGGTGATCCG	CGCGCTGCGC	GTCTATCAGC	CGAACGAGAC	GCCGCTGACC
Consensus		GACGGCTTTT	AGGTGATCCG	CGCGCTGCGC	GTCTATCAGC	CGAACGAGAC	GCCGCTGACC
		485	495	505	515	525	535
2.4.1		..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
Si4		CATACGCTGA	TCTCGCTGCC	CGCACACCGG	CTGCCGGGCT	TCGAGAAGCT	CGATATGGAA
D		CATACGCTGA	TCTCGCTGCC	CGCGCACCGG	CTGCCGGGCT	TCGAGAAGCT	CGATATGGAA
Consensus		CATACGCTGA	TCTCGCTGCC	CGCGCACCGG	CTGCCGGGCT	TCGAGAAGCT	CGATATGGAA

		545	555	565	575	585	595
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		GGGCGCTCGA	TCTTCGGCAC	GATCCGCGAG	CTCTACGGGC	TGACGGTCCG	GCGGGCGGAT
D		GGGCGCTCGA	TCTTCGGCAC	GATCCGCGAG	CTCTACGGTC	TGACGGTCCG	GCGGGCGGAT
Consensus		GGGCGCTCGA	TCTTCGGCAC	GATCCGCGAG	CTCTACGGTC	TGACGGTCCG	GCGGGCGGAT
		605	615	625	635	645	655
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		CGATGGCTGA	AGGGCGCCAT	CGTTCGGTCCG	GAAGTGGCGG	CGCGGATGGG	CGTGCCGCC
D		CGCTGGCTGA	AGGGTGCCAT	CGTTCGGTCCG	GAAGTGGCGG	CGCGGATGGG	CGTGCCGCC
Consensus		CGCTGGCTGA	AGGGTGCCAT	CGTTCGGTCCG	GAAGTGGCGG	CGCGGATGGG	CGTGCCGCC
		665	675	685	695	705	715
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		GGCGGCGCCA	TGATCGCCAT	CGAGTCGGTC	GCCTACGACC	ACGACGGCAA	TGCGCTCGAA
D		GGCGGCGCCA	TGATCGCCAT	CGAGTCGGTC	GCCTACGACC	ACGACGGCAA	TGCGCTCGAA
Consensus		GGCGGCGCCA	TGATCGCCAT	CGAGTCGGTC	GCCTACGACC	ACGACGGCAA	TGCGCTCGAA
		725	735	745	755	765	775
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		TATTACCGCG	CCTACTACAA	CAGCGAAGTC	GCCCCGATCC	ACGTCGCAAC	CGACGCCCAT
D		TATTACCGCG	CCTACTACAA	CAGCGAAGTC	GCCCCGATCC	ACGTCGCAAC	CGACGCACAT
Consensus		TATTACCGCG	CCTACTACAA	CAGCGAAGTC	GCCCCGATCC	ACGTCGCAAC	CGACGCACAT
		785	795	805	815	825	835
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		TAAGCGCCTG	TCGTCACAGC	GAAAAACCTC	CAGCGGCCCC	GATCTTCGAT	TTCTGATCAT
D		TAAGCGACTG	ACGTCACACC	GAAAAACCTC	CAGCGGCCCC	GATCTGCGAA	TTCTGATCAT
Consensus		TAAAGCGACTG	ACGTCACACC	GAAAAACCTC	CAGCGGCCCC	GATCTGCGAA	TTCTGATCAT
		845	855	865	875	885	895
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		TACCACATTG	ACAGAAGCAG	ATTTGCCTCC	TACCTTTTTTC	TGGTAACGAC	CAGAAACCGC
D		TACCACATTG	ACAGAAGCAG	ATTTGCCTCT	TACCTTTTTTC	TGGTAACGAC	CAGAAACCGC
Consensus		TACCACATTG	ACAGAAGCAG	ATTTGCCTCT	TACCTTTTTTC	TGGTAACGAC	CAGAAACCGC
		905	915	925	935	945	955
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		ACGTCGGGCG	CTGGGAAGGA	CGCGGCCGAG	CCTCGGGAGG	AACCTTCGGG	TCCGGGCTCC
D		GTCGCGGG-G	CTGGGAAGGA	CGCGGCCGAT	CCTCGGGAGG	AACCTTCGGG	TCCGGGCTCC
Consensus		GTCGCGGG-G	CTGGGAAGGA	CGCGGCCGAT	CCTCGGGAGG	AACCTTCGGG	TCCGGGCTCC
		965	975	985	995	1005	1015
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		GCGTCAGG--	-----	-----G	AGGAAGAATG	GACTACAGGA	CGGTTTTTCG
D		GCGTCAGGGA	GGAAGAATGG	ACTACAGGAG	AGGAAGAATG	GACTACAGGA	CGGTTTTTCG
Consensus		GCGTCAGG--	-----	-----G	AGGAAGAATG	GACTACAGGA	CGGTTTTTCG
		1025	1035	1045	1055	1065	1075
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		TCTCGATGGC	GCCTGCGCGG	CCGTCACCGG	AGCGGGCAGC	GGCATCGGCC	TCGAAATCTG
D		TCTCGATGGC	GCCTGCGCGG	CCGTCACCGG	AGCGGGCAGC	GGCATCGGCC	TCGAAATCTG
Consensus		TCTCGATGGC	GCCTGCGCGG	CCGTCACCGG	AGCGGGCAGC	GGCATCGGCC	TCGAAATCTG

		1085	1095	1105	1115	1125	1135
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		CCGGGCCTTC	GCAGCCTCGG	GCGCGCGGCT	CATCCTGATC	GACCGCGAGG	GC GCGGCCCT
D		CCGGGCCTTC	GCGGCCTCGG	GCGCGCGGCT	CATCCTCATC	GATCGGGAGG	CTGCGGCCCT
Consensus		CCGGGCCTTC	GCGGCCTCGG	GCGCGCGGCT	CATCCTCATC	GATCGGGAGG	CTGCGGCCCT
		1145	1155	1165	1175	1185	1195
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		CGACCGGGCA	GCTGAAGAGC	TCGGCGCGGC	GGTGGCTTCG	CGGATCGTGG	CCGATGTGAC
D		CGACCGGGCG	GCCCAGGAGC	TTGGCGCGGC	GGTTGCGGCG	CGGATCGTGG	CCGACGTGAC
Consensus		CGACCGGGCG	GCCCAGGAGC	TTGGCGCGGC	GGTTGCGGCG	CGGATCGTGG	CCGACGTGAC
		1205	1215	1225	1235	1245	1255
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		GGATGCGGAG	GCGATGACCG	CCGCGGCCGC	CGCGGCGGAA	GCCGTGGCGC	CGGTGTCGAT
D		GGATGCGGAG	GCGATGACCG	CCGCGGCCGC	CGAGGCGGAA	GCCGTGGCGC	CGGTCTCGAT
Consensus		GGATGCGGAG	GCGATGACCG	CCGCGGCCGC	CGAGGCGGAA	GCCGTGGCGC	CGGTCTCGAT
		1265	1275	1285	1295	1305	1315
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		CCTCGTCAAT	TCCGCGGGCA	TCGCCGCCT	CCACGATGCG	CTCGAGACCG	ACGACGCCAC
D		CCTCGTCAAT	TCCGCGGGCA	TCGCCGCCT	CCACGATGCG	CTCGAGACCG	ACGACGCCAC
Consensus		CCTCGTCAAT	TCCGCGGGCA	TCGCCGCCT	CCACGATGCG	CTCGAGACCG	ACGACGCCAC
		1325	1335	1345	1355	1365	1375
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		CTGGCGGCAG	GTGATGGCGG	TCAATGTGGA	CGGCATGTTC	TGGGCCAGCC	GCGCCTTCGG
D		CTGGCGGCAG	GTGATGGCGG	TCAATGTGGA	CGGCATGTTC	TGGGCCAGCC	GCGCCTTCGG
Consensus		CTGGCGGCAG	GTGATGGCGG	TCAATGTGGA	CGGCATGTTC	TGGGCCAGCC	GCGCCTTCGG
		1385	1395	1405	1415	1425	1435
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		GCGCGCCATG	GTCGCGCGCG	GGCAGGGGC	CATCGTGAAC	CTCGGCTCCA	TGTCGGGCAC
D		CCGCGCCATG	GTCGCGCGCG	GGCAGGGGC	CATCGTGAAC	CTCGGCTCCA	TGTCGGGCAC
Consensus		CCGCGCCATG	GTCGCGCGCG	GGCAGGGGC	CATCGTGAAC	CTCGGCTCCA	TGTCGGGCAC
		1445	1455	1465	1475	1485	1495
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		CATCGTCAAC	CGCCCGCAGT	TCGCCTCGAG	CTACATGGCC	TCGAAGGGCG	CGGTCCATCA
D		CATCGTCAAC	CGCCCGCAGT	TCGCCTCGAG	CTACATGGCC	TCGAAGGGGG	CGGTGCATCA
Consensus		CATCGTCAAC	CGCCCGCAGT	TCGCCTCGAG	CTACATGGCC	TCGAAGGGGG	CGGTGCATCA
		1505	1515	1525	1535	1545	1555
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		GCTGACGCGG	GCGCTCGCCG	CCGAATGGGC	GGGCCGGGGC	GTGCGGGTGA	ATGCGCTGGC
D		GCTGACGCGG	GCGCTCGCCG	CCGAATGGGC	GGGCCGGGGC	GTGCGGGTGA	ATGCGCTGGC
Consensus		GCTGACGCGG	GCGCTCGCCG	CCGAATGGGC	GGGCCGGGGC	GTGCGGGTGA	ATGCGCTGGC
		1565	1575	1585	1595	1605	1615
2.4.1		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
Si4		GCCGGGCTAT	GTGGCGACCG	AGATGACGCT	GAAGATGCGC	GAGCGGCCCG	AGCTCTTCGG
D		GCCGGGCTAT	GTGGCGACCG	AGATGACGCT	GAAGATGCGC	GAGCGGCCCG	AGCTCTTCGA
Consensus		GCCGGGCTAT	GTGGCGACCG	AGATGACGCT	GAAGATGCGC	GAGCGGCCCG	AGCTCTTCGA

		1625	1635	1645	1655	1665	1675
		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
2.4.1		AACATGGCTC	GACATGACGC	CGATGGGCCG	CTGCGGCGAG	CGGTCGGAGA	TTGCGGCGGC
Si4		GACCTGGCTC	GACATGACGC	CGATGGGCCG	CTGCGGCGAG	CCCTCGGAGA	TCGCGGCGGC
D		GACCTGGCTC	GACATGACGC	CGATGGGCCG	CTGCGGCGAG	CCCTCGGAGA	TCGCGGCGGC
Consensus		GACCTGGCTC	GACATGACGC	CGATGGGCCG	CTGCGGCGAG	CCCTCGGAGA	TCGCGGCGGC
		1685	1695	1705	1715	1725	1735
		.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....	.... ....
2.4.1		GGCGCTGTTT	CTTGCCCTCGC	CGGCGGCGAG	CTATGTCACG	GGCGCGATCC	TCGCGGTCGA
Si4		GGCGCTGTTT	CTTGCCCTCGC	CGGCGGCGAG	CTATGTCACG	GGCGCGATCC	TCGCGGTCGA
D		GGCGCTGTTT	CTTGCCCTCGC	CGGCGGCGAG	CTATGTCACG	GGCGCGATCC	TCGCGGTCGA
Consensus		GGCGCTGTTT	CTTGCCCTCGC	CGGCGGCGAG	CTATGTCACG	GGCGCGATCC	TCGCGGTCGA
		1745	1755	..			
		.... ....	.... ....	..			
2.4.1		TGGCGGTTAC	ACGGTCTGGT	GA			
Si4		TGGCGGTTAC	ACGGTCTGGT	GA			
D		TGGCGGTTAC	ACGGTCTGGT	GA			
Consensus		TGGCGGTTAC	ACGGTCTGGT	GA			

Abbildung 18.: Alignment der GntR- und GatDH-Nukleotidsequenz inklusive der nicht kodierenden Zwischensequenz der Stämme *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, Si4 und D. Homologe Basen sind gelb hinterlegt, nicht übereinstimmende weiß. Fehlende Nukleotide werden durch einen Strich (-) gekennzeichnet. Die kodierenden Consensusbereiche sind grau markiert, nicht kodierende weiß. Das Alignment wurde mit dem Programm Bioedit erstellt.

### 2.3. Homologievergleich mit anderen Regulatoren

Nach Eingabe der 783 bp großen Nukleotidsequenz des GntR-ähnlichen Proteins von *Rhodobacter sphaeroides* Si4 bzw. D in die Nukleotid-blast Suchmaske der NCBI-Homepage wurde ein Abgleich mit den dort hinterlegten Sequenzen durchgeführt. Dabei wurden folgende Übereinstimmungen gefunden:

1. 95% *Rhodobacter sphaeroides* KD131 chromosome 1, complete sequence, transcriptional regulator (GntR family) (**CP001150.1**)
2. 95% *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 chromosome 1, complete sequence, transcriptional regulator (GntR family) (**CP000143.1**)
3. 95% *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17029 chromosome 1, complete sequence, transcriptional regulator (GntR family) (**CP000577.1**)

Die Sequenzen aller Suchergebnisse stammen vom jeweils gleichen Organismus *Rhodobacter sphaeroides*. Dabei wurde übereinstimmend je eine 95%ige Homologie zu einem Transkriptions-Regulator der GntR-Familie aufgeführt. Die 95%ige Übereinstimmung mit dem putativen GntR-Regulator aus *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 wurde bereits beim Vergleich des Gesamtsequenz-Bereichs ermittelt (vgl. Abbildung 18). Wie bereits im vorherigen Kapitel festgestellt wurde, gibt es an Position 77 in der GntR-Sequenz im Stamm *Rhodobacter sphaeroides* D einen Basenaustausch verglichen

mit den beiden anderen Stämmen. Durch die *in silico* Translation der Sequenzen lassen sich die Aminosäure-Sequenzen der verschiedenen GntR-Gene der Stämme miteinander vergleichen (siehe Abbildung 19).

	1	60
GntR 2.4.1	MEDGDSAEAFRAFAAGVALQREDPSPLWVQLKNRIEHAILDGTLPENARLPSEQAMC	SMF
GntR Si4	MEDGDSAEAFRAFAAGVALQREDPSPLWVQLKNRIEHAILDGTLPENARLPSEQAMC	NMF
GntR D	MEDGDSAEAFRAFAAGVALQREDPS	LWVQLKNRIEHAILDGTLPENARLPSEQAMC
	61	120
GntR 2.4.1	DLSRPVIRNALQALAGEGRVIKQPRKGMFVAPRAPELAFMTSALGVFDDLSAKGYKVTVK	
GntR Si4	DLSRPVIRNALQALAGEGRVIKQPRKGMFVAPRAPELAFMTSALGVFDDLSAKGYKVTVK	
GntR D	DLSRPVIRNALQALAGEGRVIKQPRKGMFVAPRAPELAFMTSALGVFDDLSAKGYKVTVK	
	121	180
GntR 2.4.1	TYEFGGLHPANEDERRVFKLP	EGFQVIRALRVYHANETPLTHTLISLPAHRLPGFEKLDME
GntR Si4	TYEFGGLHPANEDERRVFKLP	PDGFQVIRALRVYHANETPLTHTLISLPAHRLPGFEKLDME
GntR D	TYEFGGLHPANEDERRVFKLP	PDGFQVIRALRVYHANETPLTHTLISLPAHRLPGFEKLDME
	181	240
GntR 2.4.1	GRSIFGTIRELYGLTVARADRWLKGAI	VPSEVAARMGVPPGGAMIAIESVAYDHDGNALE
GntR Si4	GRSIFGTIRELYGLTVARADRWLKGAI	VPSEVAARMGVPPGGAMIAIESVAYDHDGNALE
GntR D	GRSIFGTIRELYGLTVARADRWLKGAI	VPSEVAARMGVPPGGAMIAIESVAYDHDGNALE
	241	260
GntR 2.4.1	YYRAYYNSEVAPIHVATDAH	
GntR Si4	YYRAYYNSEVAPIHVATDAH	
GntR D	YYRAYYNSEVAPIHVATDAH	

Abbildung 19.: Alignment der Aminosäure-Sequenzen der drei GntR-Varianten aus *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, Si4 und D. Homologe Aminosäuren sind gelb hinterlegt. Die nicht mit den beiden anderen Stämmen übereinstimmenden Aminosäuren aus Stamm 2.4.1 sind weiß markiert und in roter Schrift. Die einzige zwischen Stamm D und Stamm Si4 abweichende Aminosäure ist grün hinterlegt.

Die beiden GntR-Proteine der Stämme Si4 und D unterscheiden sich in einer Aminosäure. Die Punktmutation T gegen C an Position 77 in der Nukleotidsequenz führte somit zu einem Austausch an Position 26 der Aminosäuresequenz. Die Stämme Si4 und 2.4.1 besitzen an dieser Position ein Prolin, eine zyklische Aminosäure mit hydrophober Seitenkette, welches einen erheblichen Einfluss auf die Faltung von Proteinen haben kann. Im Stamm D wird diese Aminosäure durch ein Leucin ersetzt, das eine lipophile Seitengruppe besitzt. In Abbildung 19 ist das Leucin im Stamm D grün hinterlegt. Die in der Nukleotidsequenz des *type strains* gefundenen 34 Basenunterschiede zum Stamm Si4 führen im Aminosäure-Abgleich nur zu drei Austauschen. Diese sind in der Abbildung durch eine rote Schrift mit weißem Hintergrund dargestellt. Bei dem überwiegenden Teil der Basenunterschiede handelt es sich somit um sogenannte stille Austausche, die keinen Einfluss auf die kodierte Aminosäure nehmen. Dies liegt darin begründet, dass im genetischen Code insgesamt 61 mögliche Codons für 20 Ami-

nosäuren kodieren, es also für viele Aminosäuren mehrere verschiedene Kodierungen gibt.

Wie bereits zuvor mit der Nukleotidsequenz verfahren, wurde die 260 Aminosäuren große Sequenz des GntR-ähnlichen Proteins von *Rhodobacter sphaeroides* Si4 bzw. D mittels der Protein-blast Suchmaske der NCBI-Homepage mit anderen redundanzfreien Proteinsequenzen abgeglichen. Dabei wurden als erste drei Treffer mit guter und höchster Übereinstimmung zur gesuchten Sequenz die gleichen Sequenzen ermittelt, die bereits beim Abgleich der Nukleotidsequenz gefunden wurden.

1. 98% Transcriptional regulator, GntR family [*Rhodobacter sphaeroides* KD131]  
(ref: **YP 002525035.1**)
2. 98% UbiC transcriptional regulator-associated domain-containing protein, GntR family [*Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17029] (ref: **YP 001042906.1**)
3. 98% Transcriptional regulator, GntR family [*Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1]  
(ref: **YP 352422.1**)
4. 45% Transcriptional regulator, GntR family [*Marinomonas* sp. MWYL1]  
(ref: **YP 001343007.1**)
5. 34% Transcriptional regulator [*Streptosporangium roseum* DSM 43021]  
(ref: **ZP 04474943.1**)
6. 31% Transcriptional regulator, GntR family [*Variovorax paradoxus* S110]  
(ref: **YP 352422.1**)
7. 30% Transcriptional regulator, GntR family [*Pseudomonas putida* KT2440]  
(ref: **NP 742373.1**)
8. 29% Transcriptional regulator, GntR family [*Pseudomonas entomophila* L48]  
(ref: **YP 605965.1**)
9. 28% Transcriptional regulator, GntR family [*Bacillus halodurans* C-125]  
(ref: **NP 241780.1**)
10. 26% HTH (helix-turn-helix)-type transcriptional repressor dasR [*Streptomyces avermitilis*] (sp: **Q82IWO.1**)

Die ebenfalls in *Rhodobacter sphaeroides* Stämmen gefundenen Sequenzen zeigen für die Aminosäure-Sequenz mit 98% eine noch höhere Übereinstimmung als die Gensequenzen. Die Homologie zu den Proteinsequenzen aus anderen Organismen ist dagegen mit <50% wesentlich geringer. Bei allen ermittelten Proteinen handelt es sich um Transkriptions-Regulatoren. Von den hier aufgeführten zehn Treffern lassen sich wiederum 80% der GntR-Familie zuordnen.

## 2.4. Homologievergleich mit anderen Promotorsequenzen

Die nun vollständig bekannte Sequenz zwischen dem GntR- und dem GatDH-Gen wurde auf eine zur Transkription des GatDH-Gens notwendige Promotorsequenz untersucht. Da die Sequenz der beiden Stämme *Rhodobacter sphaeroides* Si4 und D in diesem Bereich mit Ausnahme der Duplikation in D zu 100% identisch ist, die GatDH aber ausschließlich in *Rhodobacter sphaeroides* D exprimiert wird, wurde eben dieser Insertionsbereich genau analysiert.

Damit die Transkription eines Gens erfolgen kann, muss die RNA-Polymerase fest an eine bestimmte Nukleotid-Erkennungssequenz binden, nämlich den Promotor, welcher den Startpunkt für die mRNA-Synthese anzeigt. Die charakteristischen Elemente aus denen ein Promotor aufgebaut ist, sind die -35-Region und die Pribnow-Box (-10-Region). Diese werden von einer dissoziierbaren Untereinheit der RNA-Polymerase, dem Sigma-Faktor, erkannt und gebunden. Die überwiegende Mehrheit der Sigma-Faktoren gehört zu der sogenannten  $\sigma^{70}$ -Familie (Paget and Helmann, 2003 [147]), die als *housekeeping* Sigma-Faktoren von *Escherichia coli* für die Transkription konstitutiv exprimierter Gene benötigt werden (Gruber and Gross, 2003 [61]).

Die *upstream* des GatDH-Gens lokalisierte Einschubsequenz in *Rhodobacter sphaeroides* D wurde mit den bereits bekannten, in der Literatur für *Rhodobacter sphaeroides* beschriebenen Promotoren *puf*, *puc*, *bchC* (Bauer, 1995 [12]), *cycA* (Nickens and Bauer, 1998 [141]) und der Konsensussequenz des  $\sigma^{70}$ -Faktors von *E. coli* (Huerta and Collado-Vides, 2003 [79]; Helmann and Chamberlin, 1988 [73]) verglichen (siehe Abbildung 20).

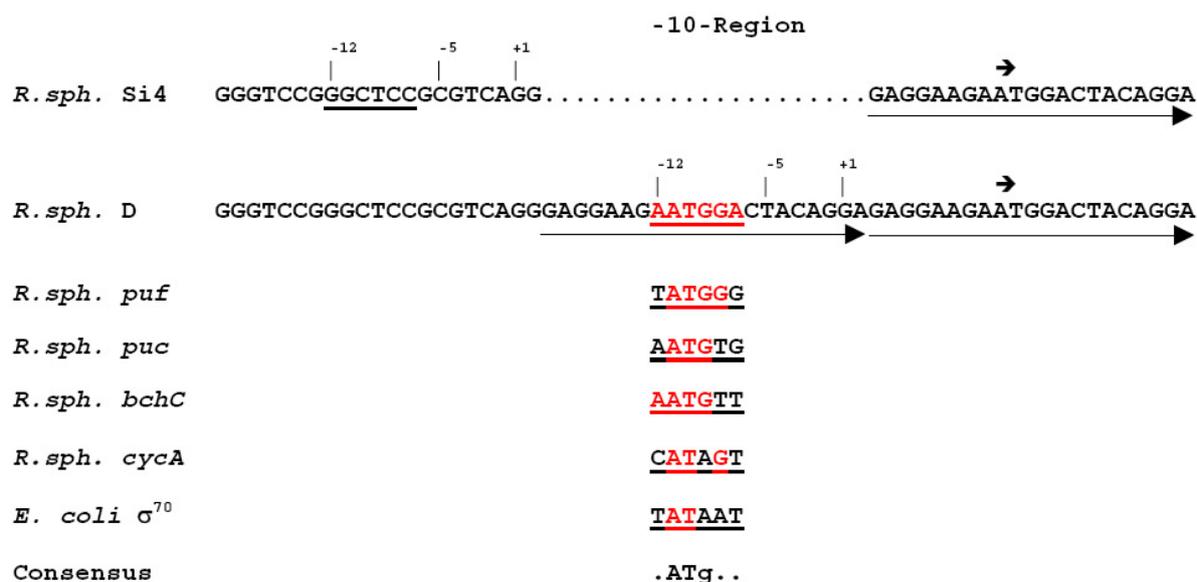


Abbildung 20.: Vergleich der -10-Region putativer Promotorsequenzen der untersuchten Stämme Si4 und D mit den in der Literatur für *Rhodobacter sphaeroides* beschriebenen Promotoren *puf*, *puc*, *bchC*, *cycA* und mit der Konsensussequenz  $\sigma$ -abhängiger *E. coli*-Promotoren. Die repetitive Sequenz wird durch die langen Pfeile, der Translationsstart durch die kleinen Pfeile angegeben. Die putativen Promotorsequenzen sind unterstrichen, zusätzlich sind alle Basen, die mit der möglichen Promotorsequenz von Stamm D übereinstimmen, rot markiert.

Innerhalb der ausschließlich im Stamm *Rhodobacter sphaeroides* D vorhandenen Duplikationssequenz lässt sich eine putative -10-Region als Teil eines möglicherweise neu entstandenen Promotors identifizieren. Die für die konstitutive Expression des GatDH-Gens in Frage kommende Pribnow-Box Sequenz weist gute Homologien zu den anderen für *Rhodobacter sphaeroides* beschriebenen -10-Regionen verschiedener Promotoren auf. Den Kern der Konsensussequenz bildet bei vier der betrachteten Promotoren ein ATG, nur in der *cycA*- und  $\sigma^{70}$ -Sequenz wird die Base G durch das Purin Adenin ersetzt. Die innerhalb der Einschubsequenz lokalisierte putative -10-Region von Stamm D besteht aus den ersten fünf Basenpaaren ATGGA des eigentlichen Translationsstarts des GatDH-Gens, die durch die Verdopplung der 21 bp nun nochmals vorhanden sind. Da diese Nukleotide *in frame*, also im selben Leserahmen wie das ursprüngliche Startcodon liegen, entstand in der Insertionssequenz theoretisch ein alternativer Translationsstart. Frühere Daten einer N-terminalen Edman Ansequenzierung des GatDH-Proteins belegen allerdings, dass lediglich das zweite ATG als Translationsstart in *Rhodobacter sphaeroides* erkannt wird. Betrachtet man den Sequenzbereich *upstream* der GatDH kodierenden Sequenz im Stamm *Rhodobacter sphaeroides* Si4, so ist in entsprechender Position der -10-Region keine zu den ande-

ren Promotoren übereinstimmende Sequenz zu finden.

## 2.5. Heterologe Expression verschiedener Sequenzvarianten zur Identifizierung regulatorischer Elemente

### 2.5.1. Expression des GatDH-Gens mit Vorsequenz

Zur Aufklärung bzw. Identifizierung möglicher regulatorischer Elemente, die zur Expression des GatDH-Gens im Stamm *Rhodobacter sphaeroides* D gegenüber dem Parentalstamm Si4 führen, wurden zunächst Varianten beider Stämme aus den von Zimmer 2006 aufgeklärten Sequenzbereichen abgeleitet. Als Templates dienten die noch aus der Arbeit von Zimmer 2006 vorliegenden pCRII-TOPO-Plasmide (nestedGDH-Si4 und nestedGDH-D), wobei die gewünschten Amplifikate nach erfolgreicher nested-PCR zur Sequenzüberprüfung ebenfalls zuerst in den pCRII-TOPO-Vektor zwischenkloniert wurden. In den Expressionsvektor pET24a(+) wurden dann jeweils nicht nur das GatDH-Gen selbst, sondern auch ein Teil des bereits bekannten, *upstream* des Gens lokalisierten Sequenzabschnitts als sogenannte Vorsequenz (VS) mit inkloniert (Si4-VS+GatDH, D-VS+GatDH). Die Sequenzbereiche wurden über die Restriktions-Schnittstellen *Xba*I und *Bam*HI inkloniert, um die vektoreigene ribosomale Bindungsstelle (RBS) AGGAG zu entfernen (siehe Abbildung 21) und damit auf mögliche in der Vorsequenz vorhandene putative RBS zu testen.

Der T7-Promotor sowie der *Lac*-Operator lassen sich gezielt durch die Zugabe von IPTG steuern. Die Expression des Zielgenes wird induziert, da die *Lac*I-Monomere an das IPTG binden, die T7-RNA-Polymerase nun von der Zelle gebildet werden, und somit auch die Transkription stattfinden kann. Der T7-Terminator beendet die Bildung der entstehenden mRNA. Ein Resistenzgen, hier für Kanamycin, ermöglicht die Selektion über ein Antibiotikum und dient zum Erhalt des Plasmids in der Wirtszelle. Die RBS ist für die Bindung der Ribosomen an die mRNA, also für die Translation des Genes, entscheidend. Für die Klonierung einer gewünschten Sequenz stehen die verschiedenen Restriktions-Schnittstellen der *multiple cloning site* zur Verfügung. Die *Xba*I-Restriktionssequenz ist als einzige der im Vektor vorhandenen Schnittstellen 5' der vektoreigenen ribosomalen Bindestelle lokalisiert. Durch eine Restriktion des Vektors an dieser Schnittstelle ist es möglich, diese RBS zu entfernen. Damit trotzdem eine Translation eines inklonierten Zielgenes erfolgen kann, müsste stattdessen eine mit dem Gen inklonierte RBS erkannt werden.

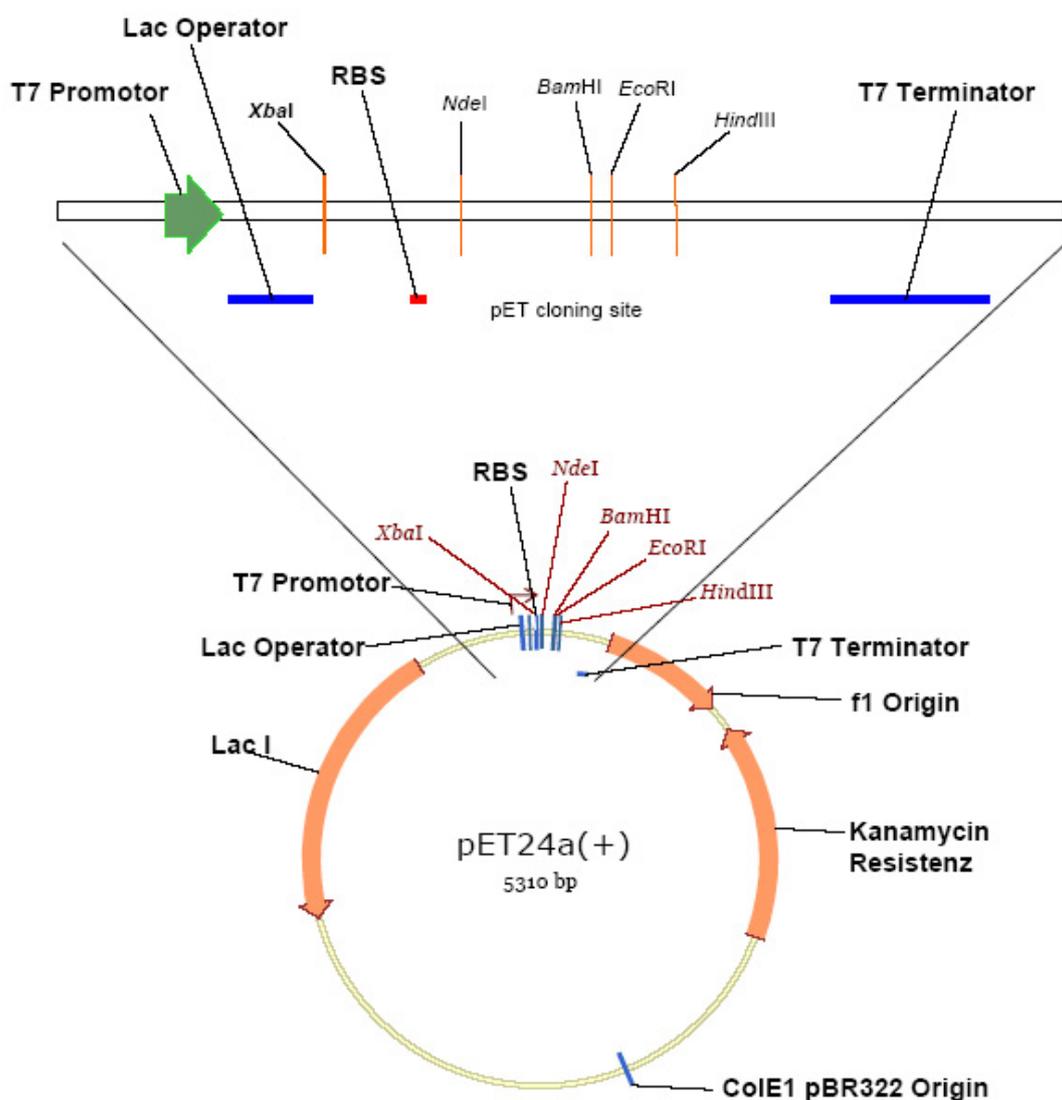


Abbildung 21.: Schematische Darstellung der pET24a(+)-Vektorkarte und Vergrößerung des für die Klonierung relevanten Sequenzabschnittes. Dargestellt sind die Elemente des *Lac*-Systems, die T7-Elemente, die vektoreigene RBS, das Kanamycin-Resistenzgen, sowie einige Restriktions-Schnittstellen der *multiple cloning site*. Die Abbildung wurde mit dem Programm VektorNTI 10 (Invitrogen) erstellt.

Das charakteristische Sequenzmuster einer RBS bei Prokaryoten ist die Shine-Dalgarno Sequenz am 5'-Ende der mRNA, die dem 3'-Ende der 16S rRNA der Ribosomen komplementär ist (Shine and Dalgarno, 1974 [194]). Die purinreiche Region besitzt die stark konservierte Nukleotidfolge AGGA als Kernsequenz der RBS (Mikkonen et al., 1994 [135]). Sie ist typischerweise ca. 8-10 Basenpaare vor dem Translationsstart lokalisiert, wobei das Motiv AGGAG als eine der idealsten Anfangssequenzen beschrieben wurde (Suzek et al., 2001 [211]).

In den beiden untersuchten Stämmen *Rhodobacter sphaeroides* Si4 und D ist sieben Basenpaare vor dem Startcodon ATG die Sequenz AGGAA (rot) als potenzielle RBS vorhanden (siehe Abbildung 22). Sie stellt gleichzeitig auch die einzig mögliche RBS für den Stamm Si4 dar. Dagegen sind in der Sequenz von Stamm D noch zwei weitere putative RBS vorhanden. Durch die zusätzliche repetitive Insertion von 21 bp (schwarzer langer Pfeil) ist die gleiche Konsensus-Sequenz nochmals am Anfang der Duplikation in der -28 Position vor dem Translationsstart zu finden (AGGAA, blau). Zudem entsteht zwischen den doppelt vorhandenen Sequenzen an der vermeintlich günstigeren -12 Position der Translations-Initiationsstelle die als noch effektiver beschriebene mögliche RBS AGGAG (grün). Jene ist ausschließlich im Stamm D vorhanden. In der GatDH Vorsequenz ist somit eine potenzielle RBS in *Rhodobacter sphaeroides* Si4, dagegen insgesamt drei in *Rhodobacter sphaeroides* D zu finden.

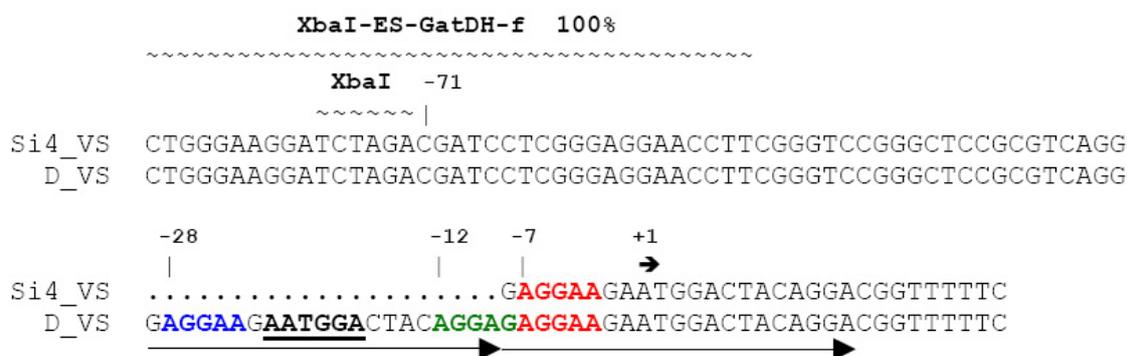


Abbildung 22.: Alignment der *upstream* des GatDH-Gens lokalisierten, nicht kodierenden Sequenz der Vorsequenz-Varianten aus *Rhodobacter sphaeroides* Si4 und D. Die Sequenz des zur Amplifikation verwendeten Primers *XbaI*-ES-GatDH-f ist durch die lange geschlängelte Linie markiert, die durch den Primer in die Sequenz eingeführte Restriktions-Schnittstelle *XbaI* als kurze geschlängelte Linie. Das in beiden Varianten vollständig klonierte GatDH-Gen ist hier nur in seinen ersten 22 Basenpaare als Teilstück dargestellt. Die Nummerierung der Basen ist auf das Startcodon ATG des GatDH-Gens und auf die Sequenz des Stammes D bezogen. Die Einschubsequenz wird durch die langen, der Translationsstart durch den kurzen dicken schwarzen Pfeil markiert. Die Sequenz der putativen -10-Region des Promotors ist schwarz unterstrichen und durch eine dicke schwarze Schrift gekennzeichnet. Die potenziellen RBS sind in den Farben blau, grün und rot dargestellt, wobei die rote RBS in beiden Stämmen zu finden ist.

Zur Amplifikation der Vorsequenz-Varianten wurde der 36 bp lange Primer *XbaI*-ES-GatDH-f verwendet. Dieser wurde aus der von Zimmer 2006 ermittelten Vorsequenz 87 bp *upstream* des GatDH-Gens im Stamm D bzw. 66 bp im Stamm Si4 abgeleitet und fügt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *XbaI* in die Sequenz ein. Das

für Stamm D 71 bp bzw. für Stamm Si4 50 bp große, nicht kodierende Sequenzstück wurde zusammen mit dem 765 bp langen GatDH-Gen in den Expressionsvektor ohne eigene RBS kloniert, um auf die bereits erwähnten putativen RBS innerhalb dieser Vorsequenz zu testen. Die nach der Sequenzierung als positiv identifizierten Klone pET24a(+)-D-VS+GatDH und -Si4-VS+GatDH wurden unter Standardbedingungen in Komplexmedium bei 28°C in Schüttelkulturen angezogen und nach einer Induktionszeit von 18 Stunden geerntet und aufgeschlossen. Die Rohextrakte und Pelletfraktionen wurden zur vergleichenden Analyse des Expressionsmusters beider Stämme auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe Abbildung 23).

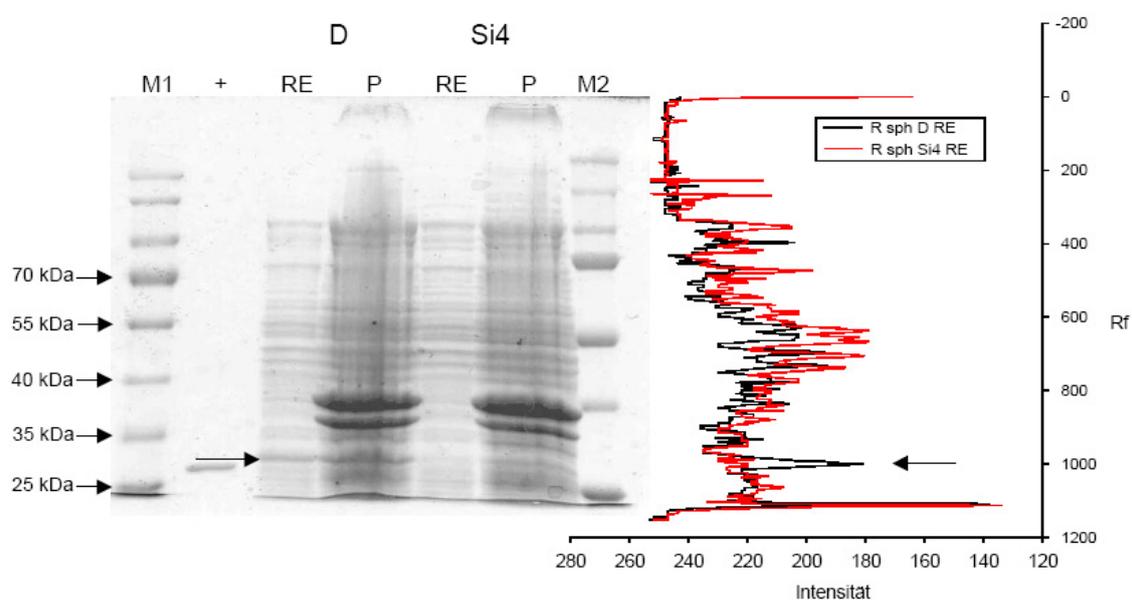


Abbildung 23.: SDS-PAGE und Analyse der Proteinbanden der Vorsequenz-Varianten der Stämme Si4 und D. Bei der SDS-PAGE wurde ein 5%iges Sammel- und ein 10%iges Trenngel verwendet und je 10  $\mu\text{l}$  des (P) Pellets, des (RE) Rohextrakts und der (+) Positivkontrolle (angereicherte native GatDH; 1:10 mit Wasser verdünnt) aufgetragen. Von den Markern (M1) PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) und (M2) Dual Color (Bio-Rad) wurden jeweils 7  $\mu\text{l}$  auf das Gel geladen. Mit Hilfe der Programme analySIS und SigmaPlot wurden die Intensitäten aller Proteinbanden gegen die Rf-Werte aufgetragen und somit das Expressionsmuster in den Rohextraktfraktionen beider Stämme verglichen (schwarz: *Rhodobacter sphaeroides* D; rot: *Rhodobacter sphaeroides* Si4).

Als Vergleich wurde auf die SDS-PAGE zusätzlich die angereicherte native, ebenfalls heterolog exprimierte, GatDH mit einem Molekulargewicht von 26,4 kDa pro Unter-einheit mit aufgetragen. Bei den beiden prominenten Banden in den Pelletproben von Stamm D und Si4 handelt es sich um konstitutiv exprimierte Proteine der Wirtszelle, die in der Analyse nicht betrachtet wurden.

In der Rohextrakt- und in der Pelletfraktion des Stammes D ist, im Vergleich zu den anderen Banden der Probe, eine stärker exprimierte Bande zu erkennen. Diese Proteinbande ist allerdings etwas größer als die 26 kDa große Bande der Positivkontrolle. Die in Abbildung 22 als putative Pribnow-Box markierte Sequenz innerhalb des Einschubs stellt gleichzeitig einen alternativen Translationsstart im Stamm D dar. Die ersten vier Aminosäuren MDYR des N-Terminus werden hier *in frame*, also im selben Leseraster des ursprünglichen GatDH-Genes, dupliziert. Zusätzlich sind beim Ablesen dieses ersten ATG nach jenen vier Aminosäuren noch die drei weiteren Aminosäuren RGR vorhanden, die allerdings von der normalen GatDH-Sequenz abweichen. Somit wäre ein um sieben Aminosäuren verlängerter N-Terminus vor der eigentlichen GatDH-Proteinsequenz vorhanden. Als RBS käme für dieses vergrößerte Protein ein ebenfalls durch die Duplikation nochmals vorhandenes AGGAA in -7 Position vor dem alternativen Startcodon in Frage (siehe Abbildung 22, blau). Obwohl jene RBS in gleicher Position wiederum in der Sequenz von Stamm Si4 vorhanden ist (rot), lässt sich für deren Probe weder im Rohextrakt noch im Pellet eine überexprimierte Bande erkennen. Bei Verwendung dieser RBS bzw. der im Stamm D noch als dritte Option möglichen AGGAG-RBS (grün) wäre eine Proteinbande in gleicher Höhe wie die Bande der Positivkontrolle zu erwarten.

Durch das Auftragen der Intensitäten der verschiedenen Proteinbanden gegen die im SDS-Gel zurückgelegte Laufstrecke (Rf-Werte) lassen sich die Expressionsmuster und Proteinmengen der zellfreien Rohextrakte beider Stämme auch ohne Proteinbestimmung bzw. Ermitteln der spezifischen Aktivitäten qualitativ bestimmen (Si4: rotes Muster; D: schwarzes Muster). Die Anzahl und Positionen der Peaks sind in beiden Proben etwa gleich, wobei grundsätzlich die Intensitäten in der Probe von Stamm Si4 leicht erhöht sind. Im Peakmuster vom Stamm D sticht jedoch ein Peak bei einem RF-Wert von ca. 1000 hervor, der sich eindeutig der überexprimierten Bande zuordnen lässt und nicht in der Probe von Stamm Si4 vorhanden ist. Somit kann durch dieses Experiment bereits gezeigt werden, dass sich die Sequenz unmittelbar vor dem GatDH-Gen unterschiedlich auf die Expression in den Stämmen D und Si4 auswirkt. Das Ergebnis der Aktivitätsbestimmung beider Varianten wird in Kapitel 2.5.6 erläutert.

### 2.5.2. Coexpression des GntR-ähnlichen Proteins und der GatDH

Anhand der mittels der SiteFinding-PCR in beiden Stämmen erweiterten Sequenzabschnitte *upstream* des GatDH-Gens wurden weitere Konstrukte hergestellt. Dabei sollte das in verwandten *Rhodobacter sphaeroides*-Stämmen als putatives Regulatorprotein der GntR-Familie beschriebene GntR-Gen gemeinsam mit der GatDH kloniert

und exprimiert werden.

Eine Vielzahl der Regulatorproteine können die Expression anderer Proteine beeinflussen und wirken dabei als Repressoren der Transkription oder Translation. Man unterscheidet dabei zwischen aktiven Repressoren, die so lange aktiv sind, bis sie durch einen Induktor (z.B. ein bestimmtes Substrat) inaktiviert werden. Ein Beispiel hierfür ist das Lactose-Operon, welches sich das in dieser Arbeit verwendete pET24-BL21(DE3)-Expressionssystem zunutze macht. Es existieren auch inaktive Repressoren, die erst bei Anwesenheit eines bestimmten Substrats aktiviert werden. Ein Regulatorprotein benötigt ein spezifisches Sequenzmuster, um je nach Funktion entweder an die DNA oder an die mRNA zu binden und damit entsprechend die Transkription oder Translation zu blockieren. Beim Abgleich der GntR-Aminosäuresequenz aus Stamm Si4 bzw. D in Kapitel 2.3 wurden ausschließlich Übereinstimmungen mit Transkriptions-Regulatoren gefunden. Weil in *Rhodobacter sphaeroides* D als einzigem Stamm die GatDH konstitutiv exprimiert wird, könnte hier die Bindung und somit die Wirkung eines Repressors aufgehoben sein. Da sich die Stämme Si4 und D hauptsächlich in der Einschubsequenz unterscheiden, könnte jene Insertion womöglich für eine Unterbrechung einer GntR-Erkennungssequenz verantwortlich sein.

Das GntR-Gen ist in der Sequenz beider Stämme Si4 und D vorhanden und wurde inklusive der Zwischensequenz bis einschließlich des GatDH-Gens in den Expressionsvektor pET24a(+) kloniert (Si4-GntR+GatDH; D-GntR+GatDH). Bei der Transkription werden beide Gene und die Zwischensequenz auf eine gemeinsame mRNA umgeschrieben. Für das erste Gen, also in diesem Falle das GntR-ähnliche Protein, steht die vektoreigene RBS AGGAG zur Verfügung. Für das zweite Gen, also die GatDH, müssen die bereits zuvor erläuterten, potenziellen RBS innerhalb der Zwischensequenz genutzt werden. Als Restriktions-Schnittstellen wurden hier *NdeI* und *HindIII* statt der zuvor verwendeten *BamHI*-Sequenz benutzt, da sich im ORF des GntR-Gens eine *BamHI*-Schnittstelle befindet. Wie die Vorsequenz-Varianten wurden die Klone der GntR-GatDH-Coexpression nach der Bestätigung der Sequenz durch Sequenzierung unter den Standardbedingungen kultiviert und untersucht (siehe Abbildung 24).

Bei einer Expression beider Gene sind zwei überexprimierte Banden im SDS-Gel zu erwarten, die jedoch aufgrund ihres ähnlichen Molekulargewichts relativ eng beieinander liegen sollten. Anhand der bekannten Aminosäuresequenz des GntR-ähnlichen Proteins lässt sich für dieses ein Gewicht von 28,8 kDa pro Untereinheit ableiten. Für

die GatDH ist die Größe von 26,4 kDa pro Monomer bereits bekannt.

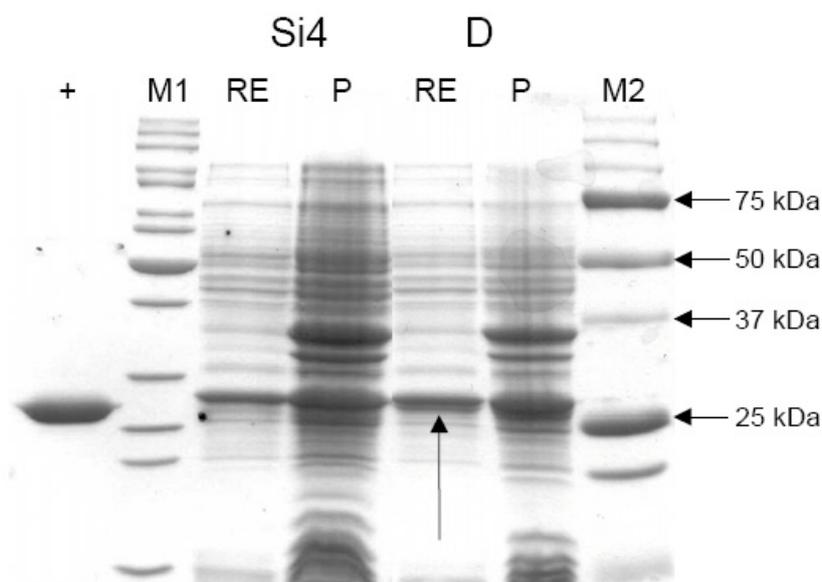


Abbildung 24.: SDS-PAGE der Coexpression der GntR- und GatDH-Sequenz in den Stämmen Si4 und D. Zur besseren Trennung der Banden wurde hier ein 6%iges Sammel- und ein 12%iges Trenngel verwendet und je 5  $\mu$ l des (P) Pellets, 10  $\mu$ l des (RE) Rohextrakts und 10  $\mu$ l der (+) Positivkontrolle (angereicherte native GatDH; 1:10 mit Wasser verdünnt) aufgetragen. Von den Markern (M1) Protein Ladder 10-200 kDa (Fermentas) und (M2) Dual Color (Bio-Rad) wurden jeweils 7  $\mu$ l auf das Gel geladen. Der schwarze Pfeil markiert die lediglich im Rohextrakt von Stamm D vorhandene Doppelbande.

Bei der Herstellung der SDS-Gele lässt sich der Vernetzungsgrad des Acrylamids im Gel selber durch Ansetzen und Mischen der Komponenten bestimmen. Je höher der Vernetzungsgrad eines Gels gewählt wird, desto langsamer wandern die Proteine durch das elektrische Feld und desto besser werden die verschieden großen Banden voneinander getrennt. In allen untersuchten Fraktionen ist eine Bande zu erkennen, die zwischen der 25 kDa und der 30 kDa Bande des Protein Ladder 10-200 kDa Markers liegt. Da sie zudem im Gel größer als die Positivkontrolle (native GatDH) erscheint, könnte es sich hier um die Bande des 28,8 kDa großen GntR-Monomers handeln. Im Gegensatz zur Probe aus Stamm Si4 ist in der Rohextraktfraktion des Stammes D noch eine weitere dünne zweite Bande direkt unterhalb der vermeintlichen GntR-Bande zu erkennen. Diese wird in Abbildung 24 durch einen schwarzen Pfeil angezeigt. Die Probe der nativen GatDH wurde in diesem Gel in einer zu hohen Proteinmenge aufgetragen, jedoch lässt sich noch erkennen, dass die zusätzliche Bande im Stamm D ungefähr auf deren Höhe liegt. Da in den Pelletfraktionen ein relativ hoher Anteil an unlöslichem Protein vorliegt, lässt sich in diesen schlecht erkennen, ob auch hier eine Doppelbande vorhanden ist. Um die Identität beider Proteinbanden

im Stamm D und der Einzelbande im Stamm Si4 zu klären, wurden diese einer Analyse im MALDI unterzogen (vgl. Kapitel 2.5.3). Das Ergebnis der Aktivitätsbestimmung beider Varianten ist in Kapitel 2.5.6 dargestellt.

### 2.5.3. MALDI-TOF-MS/MS Analyse zur Proteinidentifizierung

In der MALDI-TOF-Analyse lässt sich für jedes enzymatisch oder chemisch gespaltene Protein ein spezifischer Peptidfingerprint generieren. Dabei werden die Massen aller flugfähigen einfach oder mehrfach geladenen Peptide gleichzeitig detektiert. Bei der MS/MS-Methode werden zudem bis zu zehn der prominentesten Massenpeaks, die Mutterpeaks, nach der ersten Analyse nochmals einem Zerfall in sogenannte Tochterpeaks unterworfen. Der dabei erhaltene noch spezifischere Datensatz kann dann für eine Datenbankrecherche verwendet werden.

Bei heterologer Expression des Sequenzstücks des GntR-Gens bis einschließlich der GatDH-Gensequenz wurde in einer SDS-PAGE für die Proben aus Stamm Si4 und D eine deutlich überexprimierte Bande erhalten, im Stamm D außerdem noch eine zweite schwächere Bande direkt unterhalb der ersten. Da lediglich für die GatDH ein Aktivitätsassay durchführbar war, nicht jedoch für das putative GntR-Enzym, wurden die Proben im MALDI analysiert. Um sich eine vorherige aufwendige Anreicherung des GntR-Proteins zu ersparen und gleichzeitig ebenfalls die zweite Bande in der Probe aus Stamm D untersuchen zu können, wurde mit den zellfreien Rohextrakten beider Stämme ein Im-Gel-Verdau durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die einzelnen Proteinbanden erst durch die SDS-PAGE aufgetrennt werden und sich anschließend die gewünschte Bande gezielt aus dem Gel ausschneiden und weiter untersuchen lässt. Durch dieses Verfahren wurden die potenzielle Bande des GntR-Proteins aus den Proben beider Stämme, sowie die zweite Bande aus Stamm D isoliert und mit Trypsin verdaut.

Ein *in silico*-Verdau der jeweiligen Aminosäure-Sequenz eines Proteins bietet die Möglichkeit vorab zu klären, welche einzelnen Peptidmassen bei einem realen Verdau zu erwarten sind. Die Internet-Software Protein Prospector ermittelt dabei die Schnittstellen innerhalb einer Aminosäure-Sequenz für eine bestimmte Spaltung und gibt anschließend die in einem solchen Verdau zerlegten Massen an. Dabei kann außerdem berücksichtigt werden, ob alle Trypsin-Schnittstellen geschnitten werden, oder ob durch sogenannte *missed cleavages* aufgrund nicht verdauter Schnittstellen noch zusätzliche vergrößerte Fragmente entstehen können. In der MALDI-TOF-Analyse sollten dann möglichst viele der Massenpeaks detektiert werden, um somit die Iden-

tität des verdauten Proteins bestätigen zu können. Die bei der MS/MS-Analyse erhaltenen Fingerprints der einzelnen Proben wurden deshalb zuerst mit dem theoretischen Verdau der Aminosäure-Sequenzen der heterolog exprimierten Proteine über das Internet-Tool Protein Prospector abgeglichen (vgl. Tabelle 23).

Tabelle 23.: Ergebnistabelle der bei der MALDI-Analyse identifizierten Peptidmassen der verschiedenen Proben, die mit den bei einem theoretischen Trypsinverdau der Proteine über das Internet-Tool Protein Prospector erhaltenen Massenpeaks übereinstimmen. Als Proben wurden die heterolog exprimierten und in einem SDS-Gel trypsinverdauten Proteinbanden des GntRs aus den Stämmen Si4 und D und der GatDH aus Stamm D untersucht. Bei den verglichenen Massenpeaks wurden die Peptidfragmente mit 1-2 nicht geschnittenen Restriktionsstellen (*missed cleavages*) mit berücksichtigt. Die Peptidmassen werden als Masse-/Ladungszahl (m/z) angegeben.

Probe	<i>missed cleavages</i>	Peptidmassen (m/Z)
Si4 GntR	0	1003,6; 1021,6; 1044,6; 1069,6; 1099,6; 1227,5; 1243,5; 1311,7; 1648,9; 1677,8; 1857,9; 2083,0; 2099,0; 2207,1; 2223,1; 2239,1; 2270,2; 2996,4; 3012,4; 3028,4
	1	868,6; 1391,7; 1407,7; 1418,8; 1510,8; 1833,9; 2105,0; 2296,2; 2941,6
	2	1574,9; 2497,3
D GntR	0	1003,6; 1021,6; 1044,6; 1069,6; 1099,6; 1227,5; 1243,5; 1327,7; 1648,9; 1677,8; 1857,9; 2083,0; 2099,0; 2207,1; 2223,1; 2239,1; 2270,2; 2996,4; 3012,4; 3028,4
	1	868,6; 1391,7; 1407,7; 1418,8; 1833,9; 1919,0; 2105,0; 2312,3; 2941,6
	2	1574,9; 1759,0; 2261,1; 2497,3; 3366,7
D GatDH	0	881,5; 944,5; 1127,6; 1542,7; 1677,9; 1693,8; 1709,8; 1710,8; 1725,8; 1726,8; 1742,8; 2108,0; 2124,0; 2140,0; 2914,5; 2930,4; 2946,4; 3367,7; 3383,7
	1	1473,9; 1965,0; 2142,0; 2411,1
	2	2200,2; 2669,2; 2913,4

In Tabelle 23 sind für die verschiedenen Proben diejenigen Peptidmassen des *in silico*-Verdaus aufgelistet, die sich durch die MALDI-Ergebnisse bestätigen ließen. Für das GntR-Protein aus Stamm Si4 wurden insgesamt 31 Peptidmassen bestätigt. Davon wurden alle 20 der möglichen 20 Fragmente des theoretischen Verdaus ohne *missed cleavages* wiedergefunden. Die ausgeschnittene Bande kann somit zu 100% als die heterolog exprimierte GntR-Sequenz identifiziert werden. Bei den restlichen elf Massen handelt sich um Fragmente, die eine oder zwei nicht verdaute Trypsin-Schnittstellen enthalten. Auch die Probe aus Stamm D wurde auf gleiche Weise als das heterolog exprimierte GntR-Protein identifiziert. Ebenfalls 20/20 der vollständig verdauten Peptidmassen der GntR-Sequenz aus Stamm D ließen sich bestätigen. Zusätzlich wurden hier noch 14 weitere nicht komplett restringierte Fragmente, also

insgesamt 34 Massen, gefunden. Der Fingerprint der zweiten dünneren Bande der Doppelbande aus der Probe von Stamm D wurde mit der theoretisch verdauten Aminosäure-Sequenz der GatDH verglichen. Hier konnten insgesamt 26 Peptidmassen bestätigt werden, wovon 19 der 21 vollständig verdauten Fragmente gefunden wurden. Dies entspricht einer Identifizierung der GatDH von 90%. Bei einem der fehlenden Peptidmassen handelt es sich um den C-Terminus der Proteins.

Obwohl durch den Vergleich mit den *in silico*-verdauten Sequenzen der Proteine die Identität der heterolog exprimierten GntR-Sequenz in beiden Stämmen und der GatDH-Sequenz aus der Doppelbande im Stamm D bereits bestätigt wurden, erfolgte mit den Fingerprints der verschiedenen Proben parallel noch ein Abgleich mit der Mascot-Proteindatenbank. Bei der Mascot-Suche wird für jede Probe ein sogenannter *Score* ermittelt. Dabei beträgt der *Ionenscore*  $-10 \cdot \log(P)$ , wobei P für die Wahrscheinlichkeit steht, dass es sich bei der gefundenen Übereinstimmung um ein zufälliges Ereignis handelt. Der *Proteinscore* muss deshalb über dem Wert 80 liegen, um als signifikant zu zählen ( $p < 0,05$ ). Für die bei der Datenbanksuche erhaltenen Proteinhits werden die Proteinscores von den Ionenscores als eine nicht zufallsbedingte Basis abgeleitet. In Abbildung 25 wurde für jede Probe jeweils der erste Treffer mit der höchsten Übereinstimmung dargestellt.

Alle gefundenen Treffer weisen einen Score von über 80 auf und gelten somit als signifikant. Für die Probe des GntRs aus Stamm Si4 wurde die beste Übereinstimmung mit dem höchsten Score-Wert und einer Sequenzabdeckung von über 85% zu einem Transkriptions-Regulator der GntR-Familie aus *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 gefunden. Die übereinstimmenden Peptidfragmente dieses Regulators mit denen der untersuchten Probe sind in der Aminosäure-Sequenz des GntR-Proteins aus Stamm Si4 rot markiert. Das gleiche Ergebnis wurde für die GntR-Probe aus Stamm D ermittelt, allerdings mit einem niedrigeren Score und damit auch mit einer geringeren Sequenzabdeckung von 75,4%. Für die GatDH-Probe aus Stamm D wurde eine Sequenzabdeckung von fast 52% mit einer *short-chain* Dehydrogenase/Reduktase aus *Rhodobacter sphaeroides* ATCC erhalten. Dass für diese Abgleiche keine 100%igen Übereinstimmungen ermittelt werden können, liegt daran, dass nur auf die in der Datenbank bereits hinterlegten Sequenzen zurückgegriffen werden kann. Außerdem wurden aufgrund der starken Quervernetzung wahrscheinlich nicht alle Peptide aus den Gelstücken des Im-Gelverdaus extrahiert und gelangten daher gar nicht erst in die MALDI-Untersuchung.

**Mascot Search Results (Probe:Si4 GntR)**

Match to: gi|77462918 Score: 219 Nominal mass ( $M_r$ ): 28709

Description: transcriptional regulator, GntR family  
[*Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1]

Sequence coverage: 85,4%

```

1 MEDGDSAEAF RAFAAGVALQ REDPSPLWVQ LKNRIEHAIL DGTLPENARL PSEQAMCNMF
61 DLSRPVIRNA LQALAGEGRV IKQPRKGMFV APRAPELAFM TSALGVFDDL SAKGYKVTVK
121 TYEFGHLHPAN EDERRVFKLP DGFQVIRALR VYHANETPLT HTLISLPAHR LPGFEKLDME
181 GRSIFGTIRE LYGLTVARAD RWLKGAIVPS EVAARMGVPP GGAMIAIESV AYDHDGNALE
241 YYRAYYNSEV APIHVATDAH

```

**Mascot Search Results (Probe:D GntR)**

Match to: gi|77462918 Score: 137 Nominal mass ( $M_r$ ): 28709

Description: transcriptional regulator, GntR family  
[*Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1]

Sequence coverage: 75,4%

```

1 MEDGDSAEAF RAFAAGVALQ REDPSLLWVQ LKNRIEHAIL DGTLPENARL PSEQAMCNMF
61 DLSRPVIRNA LQALAGEGRV IKQPRKGMFV APRAPELAFM TSALGVFDDL SAKGYKVTVK
121 TYEFGHLHPAN EDERRVFKLP DGFQVIRALR VYHANETPLT HTLISLPAHR LPGFEKLDME
181 GRSIFGTIRE LYGLTVARAD RWLKGAIVPS EVAARMGVPP GGAMIAIESV AYDHDGNALE
241 YYRAYYNSEV APIHVATDAH

```

**Mascot Search Results (Probe:D GatDH)**

Match to: gi|126461793 Score: 134 Nominal mass ( $M_r$ ): 26329

Description: short-chain dehydrogenase/reductase SDR  
[*Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17029]

Sequence coverage: 51,6%

```

1 MDYRTVFRDL GACAAVTGAG SGIGLEICRA FAASGARLIL IDREAAALDR AAQELGAAVA
61 ARIVADVTD AAMTAAAAEA EAVAPVSILV NSAGIARLHD ALETDDATWR QVMVNVNVDGM
121 FWASRAFGRA MVARGAGAIV NLGSMSTIV NRPQFASSYM ASKGAVHQLT RALAAEWAGR
181 GVRVNALAPG YVATEMTLKM RERPELFETW LDMPMGRG EPSEIAAAAL FLASPAASYV
241 TGAILAVDGG YTVW

```

Abbildung 25.: Ergebnisse der Mascot-Datenbanksuche mit den MALDI-Fingerprints der GntR-Probe aus Stamm Si4 und D und der GatDH-Probe aus Stamm D. Dargestellt ist jeweils der höchste gefundene Hit zusammen mit der Datenbanknummer, dem Proteinscore, der molekularen Masse und dem Organismus des verwandten Proteins. Die übereinstimmenden gefundenen Peptidfragmente sind entsprechend in der Aminosäure-Sequenz der jeweils untersuchten Probe rot markiert. Die Sequenzabdeckung gibt dabei an, wie hoch der Anteil dieser homologen Fragmente an der Gesamtsequenz beträgt.

#### 2.5.4. Coexpression des GntR-ähnlichen Proteins mit einem Aminosäureaustausch und der GatDH

Der gesamte Sequenzbereich des ORFs des GntR-ähnlichen Proteins bis einschließlich der gesamten GatDH-Sequenz weist in den beiden Stämmen *Rhodobacter sphaeroides* Si4 und D zwei Unterschiede auf. Zum einen wurde eine 21 bp große Sequenz im Stamm D dupliziert, die einen Einfluss auf eine potenzielle Erkennungssequenz eines möglichen GntR-Regulators haben könnte. Zum anderen unterscheidet sich der ORF des Regulators beider Stämme in genau einer Punktmutation, die auch den Austausch einer Aminosäure zur Folge hat. An Position 26 ist im Stamm D statt eines Prolins ein Leucin vorhanden. Dieser Austausch könnte einen maßgeblichen Einfluss auf die Faltung und damit auch auf die Funktion des GntR-ähnlichen Proteins haben. Die konstitutive Expression der GatDH findet lediglich im Stamm D statt, welcher auch als einziger der Stämme den Leucin-Austausch innerhalb der GntR-Sequenz trägt. Der Parentalstamm Si4 und der *type strain* 2.4.1, die beide das Prolin an Position 26 des GntR-Proteins besitzen, können die GatDH nicht exprimieren.

Es galt zu untersuchen, ob der Aminosäureaustausch im Stamm D gegenüber Stamm Si4 möglicherweise einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des GntR-ähnlichen Proteins hat und somit folglich auch die Expression der GatDH beeinflusst. Dazu wurden die Coexpressions-Varianten beider Stämme mittels einer QuikChange-PCR einer ortsgerichteten Mutagenese zum gezielten Austausch der einzigen unterschiedlichen Base Thymin bzw. Cytosin an Position 77 des GntR-Gens unterzogen. In der Variante pET24a(+)-D-L26PGntR+GatDH wurde somit an Position 26 des GntR-Proteins das Leucin durch ein Prolin ersetzt, in der Variante -Si4-P26LGntR+GatDH entsprechend das Prolin gegen ein Leucin. Ein direkter Aktivitätstest des putativen Regulatorproteins war nicht möglich, daher wurden die Auswirkungen der jeweiligen Austausche in den Varianten indirekt durch die Expression des GatDH-Enzyms bestimmt. Die Varianten wurden in gleicher Weise wie die anderen Klone kultiviert und aufgeschlossen. Der Vergleich der Proben beider Stämme auf einem SDS-Gel lieferte optisch das gleiche Ergebnis wie die Varianten ohne Aminosäureaustausch. Die Ergebnisse der jeweiligen Oxidations-Assays lassen sich in Kapitel 2.5.6 vergleichen.

#### 2.5.5. Kultivierung der Varianten ohne IPTG-Induktion

Wie bereits in Kapitel 2.4 erläutert wurde, ließ sich für den Stamm *Rhodobacter sphaeroides* D innerhalb der Duplikationssequenz eine mögliche -10-Region eines Promotors identifizieren (siehe Abbildung 20). Da diese im Stamm *Rhodobacter sphaeroides*

Si4 nicht vorhanden ist, könnte sie ebenfalls eine gute Erklärung für die konstitutive Expression im Stamm D darstellen. Die in den pET24a(+)-Vektor einklonierten verschiedenen Sequenzvarianten von Si4 und D stehen in ihrem Wirt *Escherichia coli* unter Kontrolle des *Lac*-Repressor/T7-Promotor-Systems (vgl. Kapitel 10). Um die Varianten auf eine mögliche eigene vorhandene Promotorsequenz zu testen, müssen sie dem Einfluss des verwendeten Expressionssystems entzogen werden. Dies wurde einfach dadurch erreicht, dass die Varianten ohne Zugabe des Laktoseanalogons IPTG kultiviert wurden. Der *LacI*-Repressor bleibt aktiv, es wird keine T7-RNA-Polymerase translatiert und somit bleibt auch der T7-Promotor des Vektors inaktiv. Außer den zu untersuchenden Varianten wurden zudem zwei weitere Enzymvarianten, die N-terminal His(6)-getagte Galaktitol-Dehydrogenase (vgl. Kapitel 3.1) und eine Sorbitol-Dehydrogenase, im selben Expressionssystem ohne IPTG-Induktion angezogen, um auf eine mögliche Basalexpression testen zu können. Das Ergebnis der Aktivitätsbestimmung der Anzucht aller Varianten ohne IPTG-Induktion wird im nächsten Kapitel erläutert.

#### **2.5.6. Vergleich der Volumenaktivitäten der verschiedenen Sequenzvarianten aus *R. sphaeroides* Si4 und D**

Um den Einfluss der zusätzlichen repetitiven Sequenz bzw. des AS-Austausches in der *GntR*-Sequenz im Stamm D gegenüber Stamm Si4 auf die konstitutive Expression des *GatDH*-Gens im Stamm *R. sphaeroides* D zu untersuchen, wurden verschiedene Mutanten beider Stämme in *Escherichia coli*-Zellen produziert (siehe Tabelle 24). Alle in den vorherigen Kapiteln 2.5.1 bis 2.5.4 bereits vorstellten Sequenzvarianten haben den vollständigen ORF des *GatDH*-Gens gemein. Diesen Varianten wurden zusätzlich verschiedene Sequenzstücke aus dem *upstream* des *GatDH* lokalisierten Bereichs mit einkloniert. Zum einen wurde der ORF des *GntR*-ähnlichen Proteins zusammen mit der kompletten, zwischen dem *GntR*- und dem *GatDH*-Gen liegenden, nicht kodierenden Zwischensequenz (ZWS) einkloniert. Diese Varianten wurden zur Coexpression beider Gene verwendet (*GntR* + ZWS + *GatDH*). Die Zwischensequenz ist im Stamm Si4 193 bp groß, im Stamm D beträgt die Länge der Sequenz, aufgrund der 21 bp großen Insertion, 214 bp. Da sich die Sequenz des *GntR*-Proteins in beiden Stämmen um genau eine Aminosäure unterscheidet, wurden für jeden Stamm je eine Variante mit der ursprünglichen Sequenz und eine mit dem AS-Austausch des anderen Stammes hergestellt (*GntR*(L26P): ursprüngliche Sequenz im Stamm Si4 (Prolin) und *GntR*(P26L): ursprüngliche Sequenz im Stamm D (Leucin)). Zum anderen wurde lediglich ein Teilstück der ZWS, ohne den *GntR*, als sogenannte Vorsequenz (VS) vor das *GatDH*-Gen gesetzt (VS + *GatDH*). Die Vorsequenz hat im Stamm Si4 eine Größe von

50 Basenpaaren, die Sequenz im Stamm D ist wegen des Einschubs wiederum um 21 bp vergrößert (71 bp). Die verschiedenen Varianten wurden zum Vergleich jeweils sowohl aus den Sequenzen des Parentalstammes Si4, als auch aus denen des Mutationsstammes D kloniert. Um die Ergebnisse besser vergleichbar zu machen, wurden alle Varianten im gleichen Volumen als Schüttelkulturen unter identischen Bedingungen kultiviert. Die jeweils 250 ml großen Komplexmedium-Kulturen wurden, außer bei der Anzucht ohne IPTG-Zugabe (vgl. Kapitel 2.5.5), bei einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 induziert und nach 18 Stunden Wachstum bei 28°C abgeerntet. Die Volumenaktivität der Rohextrakte wurden im Oxidations-Assay mit 1,2-Hexandiol als Substrat bestimmt (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24.: Volumenaktivitäten der zellfreien Rohextrakte der rekombinanten GatDH Sequenzvarianten aus *R. sphaeroides* Si4 und D mit unterschiedlichen Sequenzelementen und -größen *upstream* des 5'-Endes der GatDH. **(VS)**: Teilstück der Zwischensequenz zwischen dem GntR- und GatDH-Gen mit einer Größe von 50 bp im Stamm Si4 und 71 bp im Stamm D. Die VS-Varianten wurden zudem über eine *Xba*I-Schnittstelle einkloniert, um die vektoreigene RBS zu entfernen. **(ZWS)**: vollständige Zwischensequenz zwischen dem GntR- und GatDH-Gen mit einer Größe von 193 bp im Stamm Si4 und 214 bp im Stamm D. **(L26P/P26L)**: liest sich, erste AS wurde an Position 26 durch zweite AS ausgetauscht; das GntR-Protein unterscheidet sich in einer AS im Stamm Si4 (P) verglichen zu Stamm D (L); AS-Austausch erfolgte anhand einer QuikChange-PCR um beide Varianten in beiden Stämmen zu testen. Alle Varianten wurden mit **(+IPTG)**-Zugabe und ohne **(-IPTG)**-Induktion kultiviert und die Aktivitäten anschließend mit 1,2-Hexandiol als Substrat bestimmt. (n.b. = nicht bestimmt).

Sequenzvarianten in pET24a(+)	Volumenaktivität [Units] aus 250 ml Kulturen (Aktivitäten mit 1,2-Hexandiol als Substrat bestimmt.)			
	aus <i>R. sphaeroides</i> Si4		aus <i>R. sphaeroides</i> D	
	+IPTG	-IPTG	+IPTG	-IPTG
VS + GatDH	16	-	-	-
GntR(L26P) + ZWS + GatDH	-	-	168	53
GntR(P26L) + ZWS + GatDH	-	-	158	90
NHis-GatDH	n.b.	n.b.	1204	-

Für die Varianten aus Stamm Si4 mit dem gesamten Sequenzstück des GntR- bis einschließlich des GatDH-Proteins (GntR(L26P/P26L) + ZWS + GatDH) konnten weder mit noch ohne IPTG-Induktion Aktivitäten gemessen werden. Gründe hierfür wären jeweils ein funktionaler Repressor und die fehlenden potenziellen regulatorischen Elemente, die durch den Einschub im Stamm D zusätzlich vorhanden sind. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass der Aminosäure-Austausch im GntR-Protein keinen Einfluss auf die folgende Expression der GatDH hat, ansonsten müssten für die

GntR(L26P)/GntR(P26P)-Varianten unterschiedliche Ergebnisse erhalten werden. Ob der durch die MALDI-Analyse (vgl. Kapitel 2.5.3) identifizierte putative Regulator im Stamm Si4 aufgrund einer möglichen funktionalen Erkennungssequenz grundsätzlich einen Einfluss auf die Expression nimmt, die dagegen im Stamm D durch den Einschub unterbrochen sein könnte, lässt sich anhand dieses Experiments allerdings nicht klären.

Eine geringe Aktivität von 16 Units konnte allerdings für die Vorsequenz-Variante bei vorheriger IPTG-Zugabe bestimmt werden. Da in dieser Variante die vektoreigene RBS fehlt, kann die Wirtszelle die einzig verfügbare RBS AGGAA in der -7 Position unmittelbar vor dem GatDH-Gen anscheinend nur für eine niedrige Translationsrate nutzen. Die schwache Expression wurde zuvor bereits in der SDS-PAGE beobachtet (vgl. Abbildung 23), da im Rohextrakt trotz vorhandener schwacher Aktivität keine überexprimierte Bande sichtbar war. Ohne IPTG-Induktion ist der im Vektor vorhandene T7-Promotor nicht aktiv. Da keine putative Promotorsequenz in der Vorsequenz von Stamm Si4 vorhanden ist, erklärt sich warum in der VS-Variante bei Anzucht ohne Induktion keine Aktivität mehr zu messen ist.

In den Rohextrakten der IPTG-induzierten Gesamtsequenz-Varianten (GntR(L26P/-P26L) + ZWS + GatDH) aus Stamm D konnte dagegen eine Aktivität von 158 Units für die Variante mit dem für diesen Stamm ursprünglichen GntR-Protein (P26L) und 168 Units für die Variante mit dem AS-Austausch L26P im GntR gemessen werden. Für die gleichen Varianten wurden ohne IPTG-Zugabe die niedrigeren Aktivitäten von 53 Units (L26P) und 90 Units (P26L) erhalten. Dies ließe sich prinzipiell nur dadurch erklären, dass der in der Einschubsequenz von Stamm D lokalisierte putative Promotor und eine der potenziellen RBS tatsächlich funktionell wären, wenn auch in der Wirtszelle nicht so effektiv wie im ursprünglichen Organismus *Rhodobacter sphaeroides*. Dass in den Coexpressions-Varianten im Stamm D gegenüber Stamm Si4 grundsätzlich eine GatDH-Aktivität vorhanden ist, ließ sich bereits durch die SDS-PAGE nachweisen (vgl. Abbildung 24). Im Rohextrakt von Stamm D war im Gegensatz zu Stamm Si4 außer der deutlich überexprimierten Bande für das Regulatorprotein eine zweite dünne Bande in Größe des GatDH-Monomers von 26 kDa vorhanden. In einer MALDI-Analyse wurde sowohl diese Bande als Galaktitol-Dehydrogenase identifiziert, als auch die Identität des GntR-Repressors bestätigt (vgl. Kapitel 2.5.3). Dass die GatDH im Vergleich zum GntR-Protein schwächer exprimiert wird, könnte daran liegen, dass die potenziellen RBS in der Sequenz von Stamm D von der Wirtszelle nicht so optimal wie die vektoreigene RBS genutzt werden können. Es wäre ebenfalls

möglich, dass der GntR-Repressor auch im Stamm D noch funktional ist, jedoch wesentlich schwächer als im Stamm Si4, wo keine GatDH-Expression mehr bestimmbar ist.

Für die Vorsequenz-Variante wurde keine Aktivität erhalten. Das Ergebnis stimmt mit der Analyse der Proteinprobe in einem SDS-Gel überein (vgl. Abbildung 23). Dort wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von über 26 kDa ermittelt, welches vermutlich durch Verwendung der ersten potenziellen RBS AGGAA und Ablesen des alternativen Startcodons zur Translation des N-terminal vergrößerten und inaktiven GatDH-Enzyms führt. Dass auch ohne IPTG-Zugabe keine Aktivität zu messen ist, könnte daran liegen, dass die Vorsequenz mit nur 71 bp in Relation zur gesamten Zwischensequenz stark verkürzt ist. Die Bindung der RNA-Polymerase an die putative Promotorsequenz könnte durch den unmittelbar vor der inklonierten Sequenz lokalisierten, in diesem Falle aktiven *Lac*-Repressor sterisch behindert sein.

In den BL21(DE3)-Wirtszellen unterliegt die Expression der Zielgene dem T7/*Lac*-Repressorsystem des pET24a(+)-Vektors. Das System ist so angelegt, dass eine Expression erst dann stattfinden kann, wenn dem Medium IPTG zugegeben wird. Die ursprünglich an den *Lac*-Repressor gebundenen *LacI*-Tetramere binden an das IPTG und geben so ihre Regulatorfunktion auf. Die T7-RNA-Polymerase kann nun von der Wirtszelle transkribiert und translatiert werden und hoch spezifisch an den T7-Promotor auf dem Expressionsvektor vor den Zielgenen binden. Im Vektor ist *downstream* des T7-Promotors zusätzlich eine *LacI*-Operatorsequenz lokalisiert. Diese wird bei IPTG-Induktion ebenfalls nicht mehr durch die *LacI*-Tetramere blockiert und die Zielgene können schließlich exprimiert werden. Das System verfügt also sozusagen über zwei Sicherungssysteme, den hoch spezifischen T7-Promotor und den, die Expression der T7-RNA-Polymerase und den T7-Promotor selbst blockierenden, *Lac*-Repressor zur Kontrolle der Basalexpression (Dubendorff and Studier, 1991 [39]). Eine schwache Basalexpression ist aufgrund einer sehr geringen Expression der T7-RNA-Polymerase durch die Wirtszelle trotz dieses System immer noch möglich. Das bedeutet, dass ein Zielgen auch ohne IPTG-Induktion von den Zellen schwach exprimiert werden kann.

Um zu testen, ob die in den Kulturen ohne IPTG-Zugabe erhaltenen Aktivitäten wegen einer veränderten Regulation oder aufgrund einer Basalexpression detektierbar waren, wurden zwei weitere bekannte Enzymvarianten unter den gleichen Bedingungen angezogen und getestet. Die N-terminal His-getagte GatDH, kloniert aus Stamm *Rhodobacter sphaeroides* D (vgl. Kapitel 3.1), erreichte unter IPTG-Induktion im Roh-

extrakt eine Volumenaktivität von ca. 1200 Units. Bei gleicher Anzucht ohne IPTG-Zugabe wurde keine Aktivität gemessen. Da die GatDH-Sequenz für beide Stämme D und Si4 identisch ist und wegen des universellen Codes zu identischen Proteinen translatiert werden muss, wurde die Messung nur für die klonierte Sequenz aus Stamm D durchgeführt und nicht nochmals für das Gen aus Stamm Si4 wiederholt (n.b.). Nicht in Tabelle 24 dargestellt ist der in gleicher Weise durchgeführte Test auf eine Basalexpression für eine Sorbitol-Dehydrogenase, welche aus Stamm *Rhodobacter sphaeroides* Si4 kloniert wurde. Für dieses Enzym konnte ebenfalls keine Basalexpression bestimmt werden. Somit konnte für die gemessenen Aktivitäten ohne IPTG-Induktion eine Basalexpression als Ursache ausgeschlossen werden. Durch den repetitiven Einschub ist im Stamm D eine zusätzliche putative Promotorsequenz vorhanden, die für die Expression des GatDH-Enzyms auch ohne IPTG-Zugabe verantwortlich sein könnte. Da ohne die Induktion noch 57% der Aktivität der P26L-Variante und 32% der Aktivität der L26P-Variante mit Induktion erreicht wurden, ist dies ebenfalls eher ein Hinweis auf eine veränderte regulatorische Mutation im Stamm D. Eine Aktivität, die aus einer Basalexpression stammt, müsste im Vergleich wesentlich geringer sein.

## 2.6. Zweistufige Reverse Transkriptase-PCR zur mRNA-Analyse

Mit Hilfe dieser Methode sollte die RNA der beiden Stämmen *Rhodobacter sphaeroides* Si4 und D auf die Anwesenheit der GntR-, GatDH-, oder beide Gene kodierenden mRNA untersucht werden. Der Nachweis der mRNA wäre ein Beweis für die Transkription des zugehörigen Gens im jeweiligen Stamm bzw. könnte einen Hinweis auf eine gemeinsame oder eine voneinander unabhängige Expression der beiden Gene liefern.

Da der Stamm Si4 Galaktitol nicht als Kohlenstoffquelle nutzen kann, wurden beide Stämme auf Malat angezogen und nach Erreichen einer optischen Dichte von 1 die Gesamt-RNA isoliert. Als Nested-Primer wurden die genspezifischen Primer RT-GntR-nested-r und RT-GatDH-nested-r für die RT-Reaktion eingesetzt. Da das GatDH-Gen 3'-wärts des GntR-Gens lokalisiert ist, könnte somit anhand des GatDH-nested-Primers eine lediglich für die GatDH kodierende mRNA nachgewiesen werden, als auch eine mRNA, die beide Gene polycistronisch enthält. Falls für das GntR-Protein eine eigenständige mRNA vorhanden sein sollte, kann diese durch den GntR-nested-Primer bei der Reversen Transkription amplifiziert werden. Entsprechend wurden für die Vermehrung der cDNA anschließend die Primerpaare: GatDH-f und GatDH-r für das GatDH-Gen, GntR-f und GntR-r für das GntR-Gen und GntR-f und GatDH-r für

beide Gene auf einer gemeinsamen mRNA eingesetzt. Es wurden außerdem mehrere Kontrollen durchgeführt. So wurden die RT-Ansätze beider Stämme doppelt angesetzt, in einen der Ansätze jedoch keine Reverse Transkriptase hinzu pipettiert. Dieser Ansatz galt als Negativkontrolle für genomische DNA, um sicher zu gehen, dass gebildete Amplifikate ausschließlich aus der mRNA und nicht aus in den Präparationen möglicherweise noch vorhandener DNA entstanden waren. Der RT-Ansatz wurde zudem noch einmal mit RT, jedoch mit Wasser statt Template angesetzt, um auf Verunreinigungen innerhalb der verwendeten Substanzen zu testen. Für beide Negativkontrollen wurden ebenso wie für die normalen Proben die nachfolgende PCR durchgeführt. Als Positivkontrolle für die verschiedenen möglichen Amplifikate der Folge-PCR, wurde als Template die Plasmid-DNA eines die beiden Gene coexprimierenden Si4-Klones verwendet. Insgesamt wurden also 16 Ansätze untersucht, jeweils drei pro Stamm für die verschiedenen möglichen Amplifikate, sowie sieben Negativ- und drei Positivkontrollen. Das Ergebnis nach RT-Reaktion und PCR zur Vermehrung der gebildeten cDNA wurde auf einem 1%igen Agarosegel überprüft (siehe Abbildung 26).

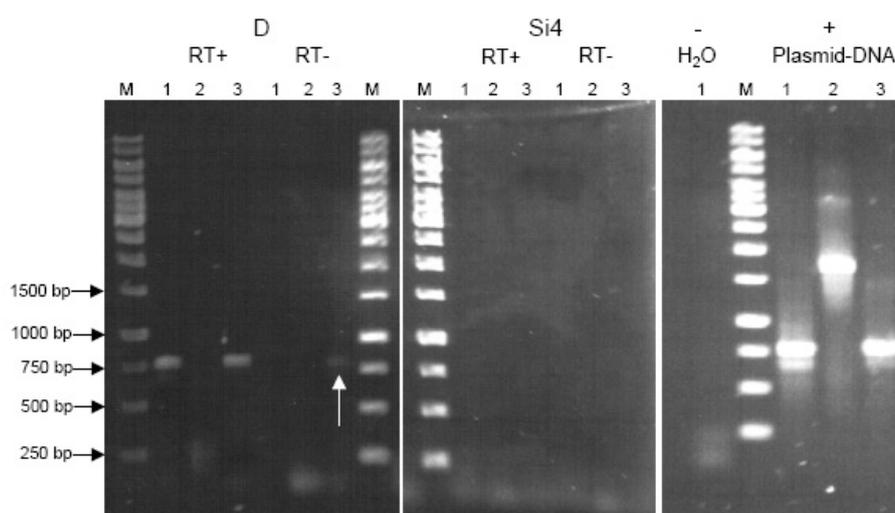


Abbildung 26.: Ergebnis der zweitstufigen RT-PCR. Als Templates wurden die Gesamt-RNA aus Stamm D und Si4, sowie Wasser als Negativkontrolle (-) und Plasmid-DNA als Positivkontrolle (+) verwendet. Ansätze (RT+): mit Reverse Transkriptase, (RT-): ohne Reverse Transkriptase als Negativkontrolle für genomische DNA. Marker (M): 1kb-Ladder (Fermentas), Primerpaare (1): GatDH-f und GatDH-r, (2): GntR-f und GatDH-r, (3): GntR-f und GntR-r. Der weiße Pfeil zeigt die relativ schwache Bande für das GntR-Amplifikat des Ansatzes ohne RT aus Stamm D an.

Für Stamm D wurde das 765 bp große Amplifikat für das GatDH-Gen erhalten (Spur 1). Da die Bande lediglich in dem Ansatz mit Reverse Transkriptase (RT+) vorhanden war, kann das Fragment nur aus der für das GatDH-Gen kodierenden mRNA

amplifiziert worden sein. Somit wäre die transkribierte mRNA für das GatDH-Gen im die GatDH konstitutiv exprimierenden Stamm *Rhodobacter sphaeroides* D nachgewiesen. In dem Ansatz mit Reverser Transkriptase wurde für Stamm D außerdem das 783 bp große Amplifikat des GntR-Gens erhalten (Spur 3). Da in der Probe ohne Reverse Transkriptase jedoch ebenso eine, wenn auch wesentlich schwächere (weißer Pfeil) Bande zu sehen war, kann in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden, dass das Fragment für den GntR-Regulator aus einer DNA-Verunreinigung statt aus der zugehörigen mRNA amplifiziert wurde. Eine gemeinsame mRNA für beide Gene konnte für Stamm D nicht nachgewiesen werden (Spur 2).

Für die Ansätze aus Stamm Si4 wurden überhaupt keine Amplifikate erhalten. Somit konnte durch dieses Experiment weder die Transkription des GntR-Gens, noch die des GatDH-Gens in diesem Stamm nachgewiesen werden. In der Negativkontrolle (-) mit Wasser als Template ist keine Bande zu sehen. Die für die Reaktionen verwendeten Reagenzien enthielten also keine Verunreinigungen. Für die PCR-Positivkontrollen (+) wurden alle erwarteten Amplifikate erhalten, nämlich die GatDH (765 bp, Spur 1), das Fragment für beide Gene (1741 bp, Spur 2) und der GntR (783 bp, Spur 3).

Durch die durchgeführten Experimente ließ sich abschließend nicht mit vollständiger Sicherheit klären, ob der durch die Einschubsequenz im Stamm D neu entstandene Promotor für die konstitutive Expression der GatDH im Stamm D gegenüber den Stämmen Si4 und 2.4.1 verantwortlich ist. Die meisten Ergebnisse weisen jedoch auf eine derartige modifizierte Regulation der Expression des GatDH-Gens im Stamm D hin. Da für Stamm Si4 weder die mRNA des GntR-Proteins als selbständiges Molekül, noch als polycistronisches Fragment nachgewiesen werden konnte, ist eine negative Regulation der Expression des GatDH-Gens im Parentalstamm anhand dieses GntR-Regulatorproteins als unwahrscheinlich zu betrachten.

### **3. Gezielte Strukturveränderung am C-Terminus der Galaktitol-Dehydrogenase zur Untersuchung der Magnesiumionen-Abhängigkeit**

Im Rahmen einer Diplomarbeit innerhalb dieser Arbeitsgruppe wurde der Einfluss von Metallionen auf die katalytische Aktivität der aus dem Mutationsstamm *Rhodobacter sphaeroides* D isolierten und angereicherten Galaktitol-Dehydrogenase untersucht (Jäkel, 1994 [88]). Bei Schneider et al., 1995 wurde eine strikte Abhängigkeit der

Aktivität des Enzyms von bivalenten Kationen gezeigt, wobei eine Inkubation in  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  und  $\text{CoCl}_2$  die Aktivität gegenüber dem üblicherweise verwendeten  $\text{MgCl}_2$  noch steigerten. Dagegen zeigte eine Zugabe von  $\text{ZnSO}_4$  bzw.  $\text{FeSO}_4$  einen inhibitorischen Effekt für das Enzym in Form sinkender Aktivitätsraten. Bei diesen Experimenten konnte also ein Einfluss der Metallionen auf die Aktivität der Dehydrogenase festgestellt, jedoch keine Aussage über mögliche Auswirkungen auf die Struktur des Enzyms getroffen werden. Die von Carius und Scheidig (Publikation in Vorbereitung) ermittelte Kristallstruktur der GatDH zeigte einen Zusammenhang zwischen den Magnesiumionen und dem C-Terminus des Proteins. Das aktive Enzym liegt dabei als Tetramer aus vier identischen Untereinheiten vor, wobei jeweils ein Magnesiumion über die zwei diagonal gegenüberliegenden, entgegengesetzt ausgerichteten C-Termini gemeinsam koordiniert wird. Innerhalb des Homotetramers sind somit insgesamt zwei Magnesiumionen komplexiert. In diesem Teil der Arbeit sollte daher eine am C-Terminus veränderte Variante hergestellt werden, um mit deren Hilfe weitere Erkenntnisse über die Struktur- und Funktionsabhängigkeit des Proteins in Bezug auf die  $\text{Mg}^{2+}$ -Koordination zu erhalten.

### 3.1. Generierung von His(6)-getagten Varianten zur vereinfachten Anreicherung

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war die Galaktitol-Dehydrogenase hinsichtlich einer elektroenzymatischen Anwendung zu optimieren (vgl. Kapitel 5). Dabei musste zuerst eine vereinfachte und vor allem schnellere Anreicherung des Enzyms im Vergleich zur bereits etablierten Anreicherungsstrategie für die native GatDH (Schneider et al., 1995 [188]) gewährleistet werden. Eine häufig verwendete und gut etablierte Methode für die Anreicherung großer Proteinmengen stellt eine Affinitätschromatographie über einen Histidin-Tag dar (Schmitt et al., 1993 [184]; Hochuli et al., 1987 [75]). Es bieten sich grundsätzlich zwei Möglichkeiten an, einen Tag an eine Proteinsequenz anzufügen, und zwar an deren C-terminales oder N-terminales Ende. Der relative kleine (sechs Histidine) und flexible Tag behindert dabei die Aktivität des Enzyms nicht, wenn die Termini an der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind.

Die Fusion der nativen GatDH (Plasmid: pET24a(+)-nGDH(D)) mit dem jeweiligen His<sub>6</sub>-Tag erfolgte anhand der spezifisch für diesen Zweck konstruierten Primer nGDH-A3-NdeI/His für den N-terminalen bzw. GDH-HIS(6)-BamHI für den C-terminalen His-Tag. Diese wurden jeweils in Kombination mit den entsprechenden Gegenprimern in einer Nested-PCR eingesetzt. Nach Bestätigung des angefügten Tags durch eine

DNA-Sequenzierungsanalyse wurden die Fusionsproteine in *E. coli* BL21-Gold(DE3) heterolog exprimiert und auf GatDH-Aktivität getestet (vgl. Tabelle 25).

Tabelle 25.: Vergleich der spezifischen Aktivitäten im Rohextrakt der mit einem His-Tag modifizierten GatDH-Varianten.

Variante	Modifikation	spez. Aktivität [U/mg]
NHis-GatDH	N-terminaler His(6)-Tag	5,8
GatDH-CHis	C-terminaler His(6)-Tag	-

Wie bereits in der Arbeit von Zimmer 2006 gezeigt wurde, besaß die Variante mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag keine GatDH-Aktivität. Dagegen konnte für die N-terminal modifizierte Variante eine spezifische Aktivität von ca. 6 U/mg in dem zellfreien Rohextrakt einer 250 ml Komplexmedium Kultur gemessen werden. Die aktive Variante konnte schließlich über eine Affinitätschromatographie (vgl. Kapitel 5.4) angereichert werden.

### 3.2. Konstruktion der C-terminal verkürzten GatDH

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, führten die am C-Terminus zusätzlich angebrachten Aminosäuren zu einer kompletten Inaktivierung des Enzyms. Da die C-Termini im Innern des Enzyms lokalisiert und anscheinend für die Komplexbildung der Mg<sup>2+</sup>-Ionen verantwortlich sind, behinderte der Tag vermutlich die korrekte Faltung des Proteins. Die aktive Konformation des Homotetramers entsteht sozusagen durch eine Dimerisierung zweier Dimere. Zum einen werden zwei benachbarte Monomere in gegensätzlicher Orientierung jeweils über das  $\beta$ -Faltblatt am C-Terminus dimerisiert (siehe Abbildung 27). Zum anderen findet die Koordinierung der Magnesiumionen über die drei letzten Aminosäuren der C-Termini (Threonin 252, Valin 253 und Tryptophan 254) jeweils zweier Dimere statt. Der N-Terminus ist an der Proteinoberfläche lokalisiert und somit nicht an der Faltung beteiligt. Wurden die zusätzlichen Aminosäuren an den N-Terminus angefügt, führte dies daher nicht zu einem Aktivitätsverlust (vgl. Tabelle 25).

Es wurde eine Deletionsvariante hergestellt, die C-terminal um die drei das Magnesiumion komplexierenden Aminosäuren verkürzt wurde (Variante GatDH251). Somit sollte nur noch eine Dimerisierung über die  $\beta$ -Faltblätter, nicht jedoch eine Koordinierung über die Magnesiumionen möglich sein. Dies könnte sich auf die Ausbildung des tetrameren Holoenzym auswirken (siehe Abbildung 27).

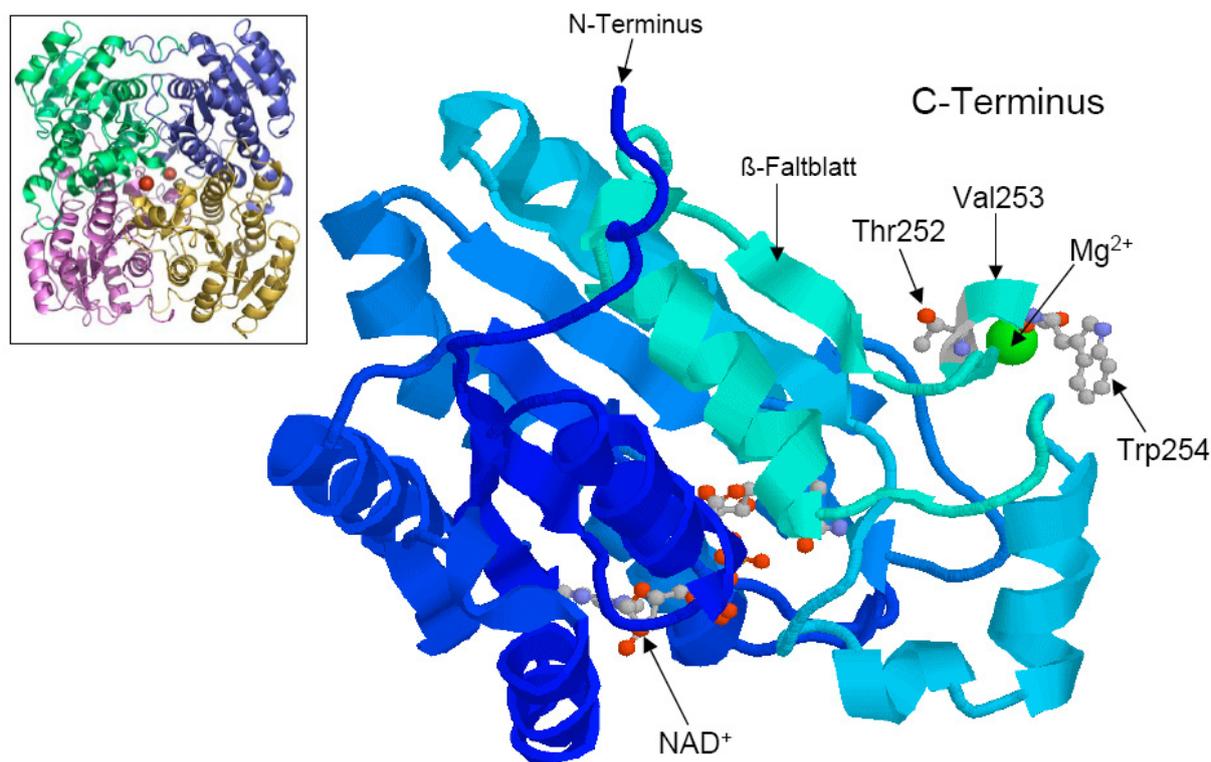


Abbildung 27.: Bändermodell der Kristallstruktur einer Enzymuntereinheit der GatDH. Dargestellt ist der im aktiven Zentrum gebundene Cofaktor  $\text{NAD}^+$ , der freiliegende N-Terminus, sowie die an der Komplexbildung eines Magnesiumions beteiligten Aminosäuren des C-Terminus. Oben links in der Abbildung ist die Tetramerstruktur des Enzyms dargestellt. Strukturdaten des Monomers von Carius und Scheidig (Publikation in Vorbereitung).

Die verkürzte Variante wurde in einer Nested-PCR mit den Primern *GDH-NdeI-f* und *nGDH-A3-251/BamHI* und dem Plasmid der nativen heterolog exprimierten GatDH als Template amplifiziert und in den Expressionsvektor *pET24a(+)* kloniert. Die Klone, für die bei der Sequenzierung die richtige Sequenz bestätigt wurde (*pET24a(+)-GatDH251*), wurden zum Test auf GatDH-Aktivität in den Wirtszellen *E. coli* BL21-Gold(DE3) unter den Standardbedingungen kultiviert. Die Abhängigkeit des funktionalen Enzyms von der Anwesenheit der  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen wurde durch eine Dialyse der nativen heterolog exprimierten GatDH gegen  $\text{Mg}$ -freien Puffer gezeigt (vgl. Tabelle 26).

Die Dialyse des aktiven Enzyms gegen Puffer ohne  $\text{MgCl}_2$  führte zu einem signifikanten Aktivitätsverlust von 69%. Die Aktivität der GatDH ließ sich jedoch bei erneuter Zugabe von  $\text{MgCl}_2$  vollständig wieder herstellen. Die Verkürzung der GatDH um die letzten drei Aminosäuren des C-Terminus führte zu einer kompletten Inaktivierung des Enzyms, auch bei Anwesenheit von 1 mM  $\text{MgCl}_2$  im Puffer. Die Löslichkeit der neuen Variante GatDH251 wurde in einer SDS-PAGE überprüft (siehe Abbildung 28).

Tabelle 26.: Vergleich der relativen Aktivitäten in [%] der angereicherten nativen GatDH vor und nach Dialyse gegen Mg-freien bzw. Mg-haltigen Puffer und des Rohextraktes der am C-Terminus um drei Aminosäuren verkürzten GatDH251. Die Ausgangsaktivität der nativen GatDH mit 82 U/ml wurde dabei gleich 100% gesetzt.

Variante	Puffer	Relative Aktivität [%]
native, heterol. expr. GatDH	20 mM BisTris, 1 mM MgCl <sub>2</sub>	100
native, heterol. expr. GatDH	dialysiert, ohne MgCl <sub>2</sub>	31
native, heterol. expr. GatDH	dialysiert, mit 1 mM MgCl <sub>2</sub>	100
GatDH251	20 mM BisTris, 1 mM MgCl <sub>2</sub>	0

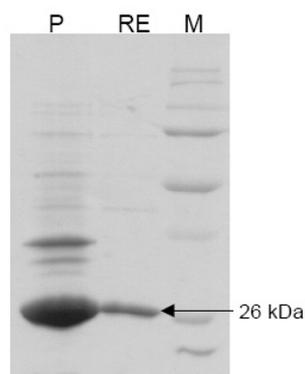


Abbildung 28.: SDS-PAGE der C-terminal verkürzten GatDH251-Variante. Als Marker (M) dienten 7  $\mu$ l des Precision Plus Protein Dual Color (Bio-Rad). Es wurden 5  $\mu$ l des Pellets (P) und 10  $\mu$ l des Rohextraktes (RE) aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

Der eindeutig größte Anteil der überexprimierten GatDH251-Variante fiel in den Zellen als *Inclusion bodies* aus (Pelletfraktion, P). Im Rohextrakt (RE) war jedoch auch eine deutliche Bande für das lösliche Protein zu erkennen. Da für die Variante keine Aktivitätsbestimmung möglich war, wurde die Identität des Proteins über eine MALDI-Analyse vorgenommen (vgl. Kapitel 3.4.1).

### 3.3. Anreicherung der verkürzten GatDH251

Eine Kristallisation der durch die Deletion der letzten drei Aminosäuren am C-Terminus verkürzten GatDH251, könnte zur Aufklärung der Struktur und der Funktionsweise der aktiven GatDH beitragen. Aufgrund der fehlenden Mg<sup>2+</sup>-Koordinationsstellen wurde vermutet, dass die GatDH251-Variante als Dimer vorliegt. Da ein Anfügen verschiedener Tags jeweils nahezu komplett zur Bildung von *Inclusion bodies* führte (Daten nicht gezeigt), sollte die von 254 auf 251 Aminosäuren verkürzte Variante GatDH251 ohne Tag angereichert werden.

### 3.3.1. Chromatographische Trennmethoden

Die Variante GatDH251 wurde unter den Standardbedingungen bei 28°C jeweils in einer 250 ml kanamycinhaltigen Komplexmedium-Schüttelkultur kultiviert. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte bei 600 nm von ca. 1, die Induktionszeit betrug 18 Stunden. Die Zellen wurden zunächst in 20 mM BisTris-Puffer pH 7,0 aufgeschlossen, 1 h bei 12.000 x g abzentrifugiert und der Rohextrakt danach auf einen pH-Wert von 7,5 titriert. Der Grund hierfür war, dass die für die Anionenaustauschchromatographie (AAC) verwendete Sepharose Q-Säule die besten Bindungseigenschaften für die Variante bei diesem pH-Wert zeigte, für die Stabilität des Proteins jedoch zunächst ein pH-Wert von 7,0 für den Aufschluss günstiger war. Nach einer Filtration wurde der Rohextrakt zu je 30 ml pro Lauf auf die Säule geladen. Nachdem nicht gebundene Proteine mit vier Säulenvolumen Bindungspuffer entfernt wurden, erfolgte die Elution der gebundenen Proteine über einen zweistufigen Salzgradienten mit dem 1 M NaCl-haltigen Elutionspuffer (pH 7,5). Der Salzgradient wurde zunächst linear von 0% auf 80% erhöht, bevor dann in einem letzten Schritt direkt mit 100% NaCl die möglicherweise noch gebundenen Proteine von der Säule entfernt wurden (siehe Abbildung 29).

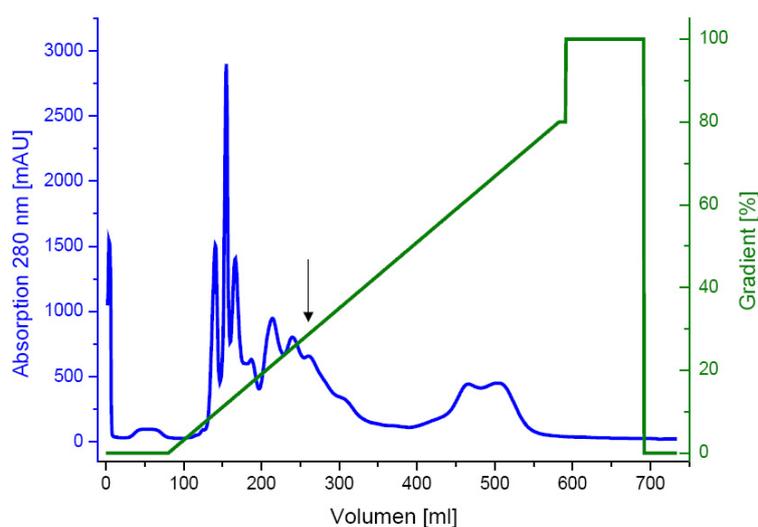


Abbildung 29.: Elutionsdiagramm der Anionenaustauschchromatographie an Sepharose Q zur Anreicherung der verkürzten Variante GatDH251. Absorption bei 280 nm [mAU] (blau), linearer Salzgradient von 0-80% (grün). Die Fraktionen wurden aufgrund der fehlenden GatDH-Aktivität in einem SDS-Gel überprüft. Der Pfeil markiert den Elutionspeak der GatDH251-Variante bei ca. 30% NaCl.

Im Elutionsdiagramm zeigten sich innerhalb des linearen Gradienten mehrere Proteinpeaks. Da die einzelnen Peakfraktionen nicht anhand eines Aktivitätsassays überprüft werden konnten, wurden alle Fraktionen (je 8 ml) auf einem SDS-Gel analysiert (Da-

ten nicht gezeigt). Die gewünschte 26 kDa Bande wurde nach einem Laufvolumen von ca. 250 ml in mehreren Fraktionen deutlich als überexprimierte Bande wiedergefunden und diese Fraktionen vereinigt. Der zugehörige Peak (schwarzer Pfeil) konnte innerhalb des Gradienten einem NaCl-Gehalt von 28% bis 30% zugeordnet werden. Aufgrund der starken Tendenz der Variante auszufallen, wurde die Probe besonders langsam und mit einer Membran einer geringen Porengröße von 5 kDa von 32 ml auf das für die anschließend durchgeführte Gelfiltration benötigte Volumen von 0,5 ml eingeeengt. Da die Probe der AAC einen Salzgehalt von etwa 30% besaß, wurde für den Laufpuffer der Gelfiltration ein 20 mM BisTris-Puffer mit 250 mM NaCl und einem pH-Wert von ebenfalls 7,5 verwendet (siehe Abbildung 30).

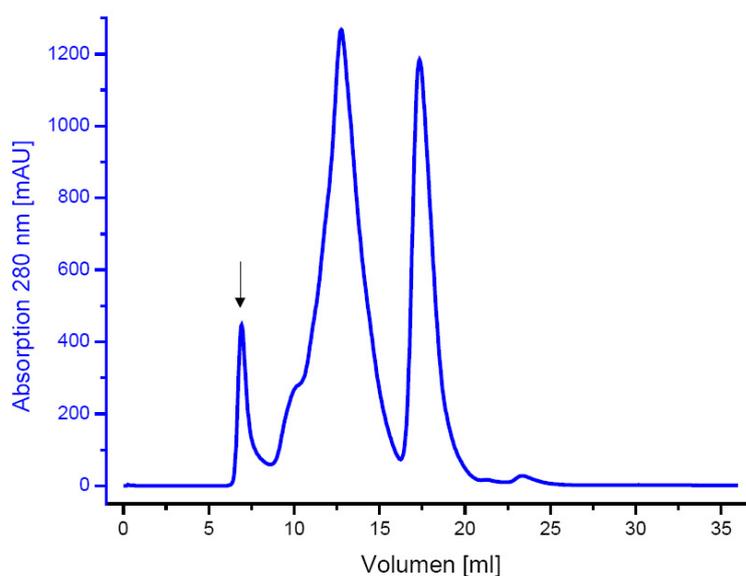


Abbildung 30.: Elutionsdiagramm der Gelfiltration an der Superdex S200-Säule zur Anreicherung der verkürzten Variante GatDH251. Absorption bei 280 nm [mAU] (blau) gegen das Elutionsvolumen [ml]. Die Fraktionen wurden aufgrund der fehlenden GatDH-Aktivität in einem SDS-Gel überprüft. Der Pfeil markiert den Elutionspeak der GatDH251-Variante nach ca. 6,7 ml.

Die Fraktionen zu je 0,75 ml, die im Elutionsdiagramm der Gelfiltration zu einem der insgesamt drei vorhandenen Peaks gehörten, wurden anhand einer SDS-PAGE auf das Vorhandensein der 26 kDa Bande der GatDH251-Variante untersucht (Daten nicht gezeigt). Die gewünschte Bande wurde in sechs Fraktionen wieder gefunden, die sich dem ersten kleineren Peak bei ca. 6,7 ml Elutionsvolumen zuordnen ließen (schwarzer Pfeil). Es wurden allerdings nur die ersten vier Fraktionen zu insgesamt 3 ml gepoolt, da der Anteil an Fremdproteinen in den restlichen beiden Fraktionen im Vergleich zur GatDH251-Proteinbande zu hoch war. Für die weiteren Untersuchungen der Probe (vgl. Kapitel 3.4) wurden die vereinigten Proben nach der Gelfiltration langsam auf ca. 0,5 ml mit 2 mg/ml Protein aufkonzentriert.

### 3.3.2. Dokumentation der Anreicherung auf einem SDS-Gel

Zur Überprüfung der Anreicherungsstrategie wurde, wie bereits erwähnt, grundsätzlich nach jedem Schritt ein Teil der entsprechenden Probe entnommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Kontrolle auf die 26 kDa große überexprimierte Bande war insofern besonders wichtig, da keine der Proben einem Aktivitätstest unterzogen werden konnten. Desweiteren wurden mit den gepoolten und eingeeengten Proben nach jeder Chromatographie eine MALDI-Analyse zur Bestätigung der Identität der GatDH251 durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4.1). Alle Proben wurden anschließend nochmals auf ein gemeinsames SDS-Gel aufgetragen (siehe Abbildung 31).

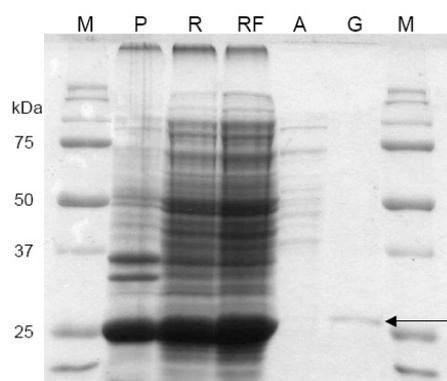


Abbildung 31.: SDS-PAGE der verschiedenen Anreicherungsschritte der C-terminal verkürzten GatDH251. Als Marker (M) dienten je 7  $\mu$ l des Precision Plus Protein Dual Color (Bio-Rad). Es wurden 5  $\mu$ l des Pellets (P) und jeweils 10  $\mu$ l des Rohextraktes (R), des filtrierten und auf pH 7,5 titrierten Rohextraktes (RF), der Probe nach dem Anionenaustausch (A) und nach der Gelfiltration (G) aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

In der SDS-PAGE war die deutlich überexprimierte Bande als lösliches Protein im Rohextrakt und als unlösliches Protein im Pellet zu erkennen. Die Filtration beziehungsweise Titration der Probe vor dem ersten chromatographischen Anreicherungsschritt führte augenscheinlich zu keinem Verlust an Enzym. Um einen möglichst kleinen Anteil der Proben einzubüßen, wurden auf diesem Gel die noch nicht eingeeengten Proben des Anionenaustausches und der Gelfiltration aufgetragen. Daher war die 26 kDa Bande der GatDH251 in diesen Proben jeweils nur schwach zu erkennen. Die aufkonzentrierten Proben zeigten im präparativen Gel für den Im-Gel-Verdau der MALDI-Analyse dagegen eindeutig die gesuchte Bande (Daten nicht gezeigt).

### 3.4. Analyse der angereicherten GatDH251

Da im SDS-Gel bereits dokumentiert werden konnte, dass der größte Anteil der Fremdproteine durch die beiden Chromatographien entfernt werden konnte, wurde kein weiterer Anreicherungsschritt mehr durchgeführt. Außerdem wurde so kein Risiko eingegangen, die Stabilität oder die Probenmenge herabzusetzen. Mit dem angereicherten Protein wurden Experimente zur Identifizierung, Größenbestimmung und erste Kristallisationsversuche durchgeführt.

#### 3.4.1. MALDI-TOF-Analyse zur Identifizierung der GatDH251

Trotz einer Überexpression des Proteins in *E. coli* ließ sich die GatDH251-Variante aufgrund ihrer fehlenden Aktivität nur schwer nachweisen. Als erster Anhaltspunkt diente eine elektrophoretische Auftrennung der Probe in einem SDS-Gel. Eine dort vorhandene Bande mit passendem Molekulargewicht, kann jedoch nicht als endgültiger Beweis für die Identität eines bestimmten Proteins ausreichen. Daher wurde beginnend mit dem Rohextrakt und danach folglich nach jedem Anreicherungsschritt eine MALDI-Analyse mit der jeweiligen Probe durchgeführt. Die verschiedenen Proben wurden dazu einem Im-Gel-Verdau unterzogen, um möglichst wenige Fremdproteine, die das Ergebnis der Identifizierung beeinflussen könnten, mit zu analysieren.

Die MALDI-Untersuchung wurde nach dem gleichen Prinzip wie bereits in Kapitel 2.5.3 ausführlich beschrieben, durchgeführt. Auch hier wurden die bei der MALDI-Analyse erhaltenen Fingerprints der einzelnen Proben mit einem theoretischen Verdau der Aminosäure-Sequenz des GatDH251-Proteins über das Internet-Tool Protein Prospector abgeglichen (vgl. Tabelle 27). Bei dem Vergleich wurden nur solche Fragmente beziehungsweise Massen berücksichtigt, die durch die MALDI-Analyse noch detektierbar waren. Die messbare Masse-/Ladungszahl lag dabei in einem Bereich zwischen 800 und 4000. Somit konnten beispielsweise sehr kleine Massen nicht gefunden werden.

Die zugehörigen Aminosäure-Sequenzen der Peptidfragmente bestätigter Massenpeaks wurden zudem der bekannten Sequenz des heterolog exprimierten GatDH251-Proteins zugeordnet. Dadurch konnte der Anteil der identifizierten Peptidfragmente am Gesamtprotein in Form einer Sequenzabdeckung ermittelt werden (siehe Abbildung 32).

Tabelle 27.: Ergebnistabelle der bei der MALDI-Analyse identifizierten Peptidmassen der verschiedenen Proben der GatDH251 Anreicherung, die mit den erhaltenen Massenpeaks bei dem theoretischen Trypsinverdau der GatDH251 über das Internet-Tool Protein Prospector übereinstimmen. Als Proben wurden die in einem SDS-Gel trypsinverdauten Proteinbanden des Rohextraktes, sowie die der aufkonzentrierten Proben nach der AAC und der Gelfiltration untersucht. Bei den verglichenen Massenpeaks wurden die Peptidfragmente mit 1-2 nicht geschnittenen Restriktionsstellen (*missed cleavages*) mit berücksichtigt. Die Peptidmassen werden als Masse-/Ladungszahl ( $m/z$ ) angegeben.

<b>Probe</b>	<b><i>missed cleavages</i></b>	<b>Peptidmassen (<math>m/z</math>)</b>
Rohextrakt	0	881,5; 944,5; 1127,6; 1542,7; 1677,9; 1710,8; 2076,0; 2108,0; 2914,5; 3367,7
	1	1087,5; 1256,7; 1468,8; 1854,0; 1965,0; 2142,0; 2395,1
	2	2670,3
AAC	0	804,3; 881,5; 944,5; 1127,6; 1542,8; 1677,9; 1710,8; 2076,1; 2108,1; 2914,5; 3226,8; 3367,8
	1	1087,6; 1468,9; 2395,2
Gelfiltration	0	804,3; 881,5; 944,5; 1127,7; 1542,7; 1677,9; 1710,8; 2108,0; 2914,5; 3367,8
	1	1468,9; 2395,2

Für den Rohextrakt konnten insgesamt 18 übereinstimmende Peptidmassen gefunden werden. Mit 91% wurden fast alle Fragmente des theoretischen Verdau ohne Fehlrestriktion ermittelt. Bei der Analyse der Sequenzabdeckung zum GatDH251-Protein wurde für diese Probe ein Wert von fast 85% erhalten. Der Peptidfingerprint der Probe nach dem ersten chromatographischen Schritt, der AAC, wies im detektierbaren Bereich sogar alle Peptidmassen des theoretischen Verdau ohne *missed cleavages* auf. Insgesamt wurden 15 Fragmente bestätigt, die eine Sequenzabdeckung von über 90% mit der GatDH251 erreichten. Für die Probe nach dem letzten Anreicherungsschritt, der Gelfiltration, konnten fast 70% der Aminosäuresequenz der verkürzten GatDH251 durch die bestätigten Peptidfragmente identifiziert werden. Bei den zugehörigen Peaks wurden 83% der erwarteten vollständig verdauten Peptidmassen im Fingerprint ermittelt. Aufgrund der jeweils hohen Übereinstimmungsrate wurden alle Proben als das heterolog exprimierte, verkürzte GatDH251-Protein identifiziert.

**MALDI-Peptidfingerprint: (Probe: Rohextrakt)**

Sequenzabdeckung GatDH251: 84,9%

```

1 MDYRTVFRLD GACAAVTGAG SGIGLEICRA FAASGARLIL IDREAAALDR AAQELGAAVA
61 ARIVADVTDA EAMTAAAAEA EAVAPVSILV NSAGIARLHD ALETDDATWR QVMAVNVDGM
121 FWASRAFGRA MVARGAGAIV NLGSMSTIV NRPQFASSYM ASKGAVHQLT RALAAEWAGR
181 GVRVNALAPG YVATEMTLKM RERPELFETW LDMPMGRCG EPSEIAAAAL FLASPAASYV
241 TGAILAVDGG Y

```

**MALDI-Peptidfingerprint: (Probe: AAC)**

Sequenzabdeckung GatDH251: 90,8%

```

1 MDYRTVFRLD GACAAVTGAG SGIGLEICRA FAASGARLIL IDREAAALDR AAQELGAAVA
61 ARIVADVTDA EAMTAAAAEA EAVAPVSILV NSAGIARLHD ALETDDATWR QVMAVNVDGM
121 FWASRAFGRA MVARGAGAIV NLGSMSTIV NRPQFASSYM ASKGAVHQLT RALAAEWAGR
181 GVRVNALAPG YVATEMTLKM RERPELFETW LDMPMGRCG EPSEIAAAAL FLASPAASYV
241 TGAILAVDGG Y

```

**MALDI-Peptidfingerprint: (Probe: Gelfiltration)**

Sequenzabdeckung GatDH251: 69,7%

```

1 MDYRTVFRLD GACAAVTGAG SGIGLEICRA FAASGARLIL IDREAAALDR AAQELGAAVA
61 ARIVADVTDA EAMTAAAAEA EAVAPVSILV NSAGIARLHD ALETDDATWR QVMAVNVDGM
121 FWASRAFGRA MVARGAGAIV NLGSMSTIV NRPQFASSYM ASKGAVHQLT RALAAEWAGR
181 GVRVNALAPG YVATEMTLKM RERPELFETW LDMPMGRCG EPSEIAAAAL FLASPAASYV
241 TGAILAVDGG Y

```

Abbildung 32.: Sequenzabdeckung der bei der MALDI-Analyse ermittelten Peptidfragmente des Rohextraktes und der Proben nach AAC bzw. Gelfiltration zum GatDH251-Protein. Die bestätigten Aminosäuren der Proteinsequenz sind jeweils rot markiert.

Darüberhinaus wurde bei einem Mascot-Datenbankabgleich für den Fingerprint der Probe der AAC eine 54%ige Sequenzhomologie zu einer *short-chain* Dehydrogenase/Reduktase SDR aus *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17029 mit einem Score von 75 gefunden. Bei der Probe nach der Gelfiltration betrug die Sequenzabdeckung zum gleichen Enzym dagegen zwar nur 36%, jedoch konnte mit 221 ein wesentlich höherer Proteinscore erreicht werden.

### 3.4.2. Größenbestimmung der angereicherten GatDH251

#### a) Größenbestimmung durch Gelfiltration

Eine Möglichkeit der Molekulargewichtsbestimmung eines Proteins ist die Gelfiltration. Daher wurden mehrere Eichproteine in einer Konzentration von 3-5 mg/ml im gleichen Puffer wie die GatDH251-Probe (20 mM BisTris, 250 mM NaCl, pH 7,5) auf die Superdex S200-Säule geladen. Aus den bekannten Molekulargewichten der Eichproteine und den ermittelten Retentionsvolumina der Läufe (vgl. Tabelle 28) ließ sich eine Eichgerade erstellen (siehe Abbildung 33).

Tabelle 28.: Verwendete Eichproteine bekannten Molekulargewichts und deren ermitteltes Retentionsvolumen von der Superdex S200-Säule zur Erstellung einer Eichgerade. Als Eichproteine dienten Ferretin, Catalase,  $\beta$ -Laktoglobulin und Ribonuklease A.

Eichprotein	Molekulargewicht [Da]	Retentionsvolumen [ml]
Ferretin	450.000	7,0
Catalase from bovine	240.000	9,9
$\beta$ -Laktoglobulin	36.500	14,0
Ribonuklease A	13.700	16,1

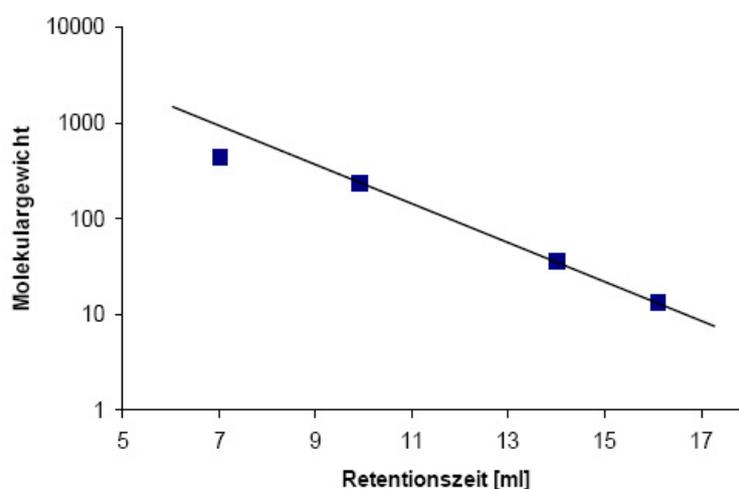


Abbildung 33.: Halblogarithmische Eichgerade der Superdex S200-Gelfiltrationssäule zur Molekulargewichtsbestimmung der angereicherten verkürzten GatDH251. Das Molekulargewicht wurde gegen die Retentionszeit als Elutionsvolumen von der Säule aufgetragen. Als Eichproteine dienten Ferretin, Catalase,  $\beta$ -Laktoglobulin und Ribonuklease A.

Anhand der bekannten Ausschlussgrenze des Säulenmaterials und der ermittelten Eichgerade ließen sich die theoretischen Retentionszeiten für die verschiedenen Polymerzustände der GatDH bestimmen. Als mögliche Strukturen kamen das Monomer

(26 kDa), ein Dimer (52 kDa) und das Tetramer (104 kDa) des Enzyms in Frage. Demnach müsste das Monomer nach 15 ml, das Dimer nach 14,5 ml und das Tetramer nach 13,4 ml von der Säule eluiert werden. Um die Genauigkeit dieser Werte und den Zustand des Säulenmaterials zu überprüfen, wurde als Vergleich ein Lauf mit der angereicherten nativen GatDH durchgeführt (siehe Abbildung 34). Das Enzym wurde dafür in den gleichen salzhaltigen Puffer der GatDH251 Gelfiltration umgepuffert.

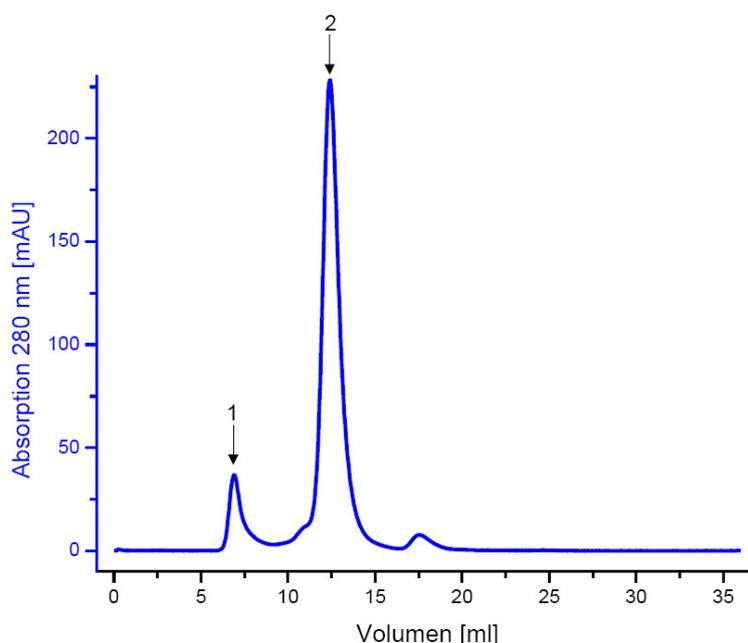


Abbildung 34.: Elutionsdiagramm der angereicherten nativen GatDH an der Superdex S200-Säule. Absorption bei 280 nm [mAU] (blau) gegen das Elutionsvolumen [ml]. Die Peakfraktionen wurden im Enzymassay auf GatDH-Aktivität getestet. Der erste schwarze Pfeil (1) gibt den Elutionspeak nach 6,7 ml an, für den keine GatDH-Aktivität bestimmt werden konnte. Der zweite Pfeil (2) markiert den Elutionspeak der nativen GatDH nach 12,5 ml.

Die native GatDH wurde nach 12,5 ml Retentionsvolumen von der Säule eluiert (2, schwarzer Pfeil). Das Protein kam somit um 0,9 ml früher von der Säule, als theoretisch für das Tetramer errechnet wurde. Die Fraktionen dieses Peaks zeigten im Enzymassay allerdings eindeutig Aktivität und konnten so dem aktiven GatDH-Protein zugeordnet werden. Dagegen wurde die verkürzte Variante bereits nach ca. 6,7 ml von der Säule eluiert (siehe Abbildung 30). Auch bei der nativen GatDH war ein zweiter kleinerer Peak bei etwa 6,7 ml vorhanden (1, schwarzer Pfeil), für dessen Fraktionen im Enzymassay jedoch keine GatDH-Aktivität gemessen werden konnte. Da das Eichprotein Ferritin mit einer Größe von 450 kDa nach 7 ml eluiert wurde, müsste demnach das Molekulargewicht der bei 6,7 ml eluierten GatDH251 sogar größer als 450.000 Da sein. Das Retentionsvolumen der Variante ließ sich somit keinem der er-

warteten Proteinstrukturen zuweisen. Die vereinigten Fraktionen dieses Peaks wurden durch die MALDI-Analyse jedoch als GatDH-Protein identifiziert. Durch die Gelfiltration konnte keine eindeutige Molekulargewichtsbestimmung der verkürzten Variante vorgenommen werden.

### b) Größenbestimmung durch eine native PAGE

Die native PAGE stellt ebenfalls eine Option dar, um das Molekulargewicht eines Proteins zu bestimmen. Dazu wird ein Gradientengel verwendet, das von oben nach unten in seinem Vernetzungsgrad zu- und somit in der Porengröße abnimmt. Kleinere Proteine können im Gel am weitesten wandern, während die großen Proteine bei einer gewissen Porengröße, die ihrem Molekulargewicht entspricht, zurückgehalten werden. Die nach der Gelfiltration aufkonzentrierte GatDH251-Probe wurde daher zusammen mit der nativen GatDH als Kontrolle auf ein 4-20%iges natives Gradientengel aufgetragen (siehe Abbildung 35).

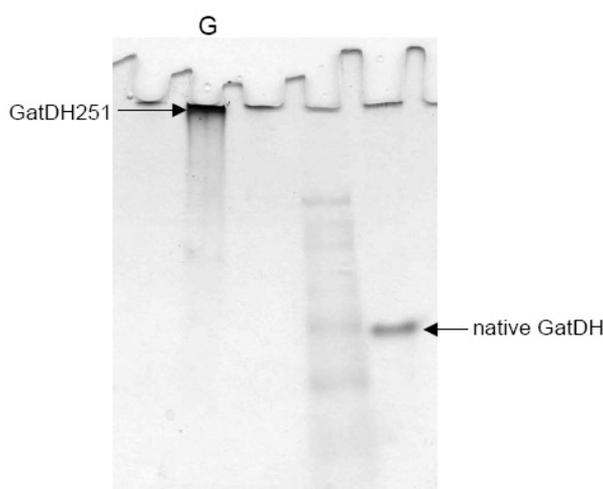


Abbildung 35.: Native PAGE der angereicherten C-terminal verkürzten GatDH251. Es wurden jeweils 30  $\mu$ l der eingeengten Probe der GatDH251 nach der Gelfiltration (G) und der nativen GatDH als Positivkontrolle (+) aufgetragen. Die Banden der beiden GatDH-Proben werden durch Pfeile markiert. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

Im Gegensatz zur nativen GatDH (Pfeil rechts) wanderte die Probe der angereicherten verkürzten GatDH251 gar nicht erst durch das Gel, sondern blieb bereits in der Tasche hängen (Pfeil links). Da das verwendete Gradientengel im Bereich der Probenapplikation eine relativ niedrige Konzentration von nur 4% besaß, wies auch diese Methode auf eine erhebliche Größe der Variante hin. Eine genaue Bestimmung des Molekulargewichts der GatDH251 war auch mit der nativen PAGE nicht möglich.

### c) Größenbestimmung durch Mikroskopie

Da aufgrund der Ergebnisse der Gelfiltration und der nativen PAGE auf ein relativ großes Molekulargewicht der verkürzten GatDH251-Variante geschlossen werden konnte, wurden wenige Mikroliter der angereicherten und aufkonzentrierten Probe nach der Gelfiltration unter dem Mikroskop untersucht (siehe Abbildung 36).

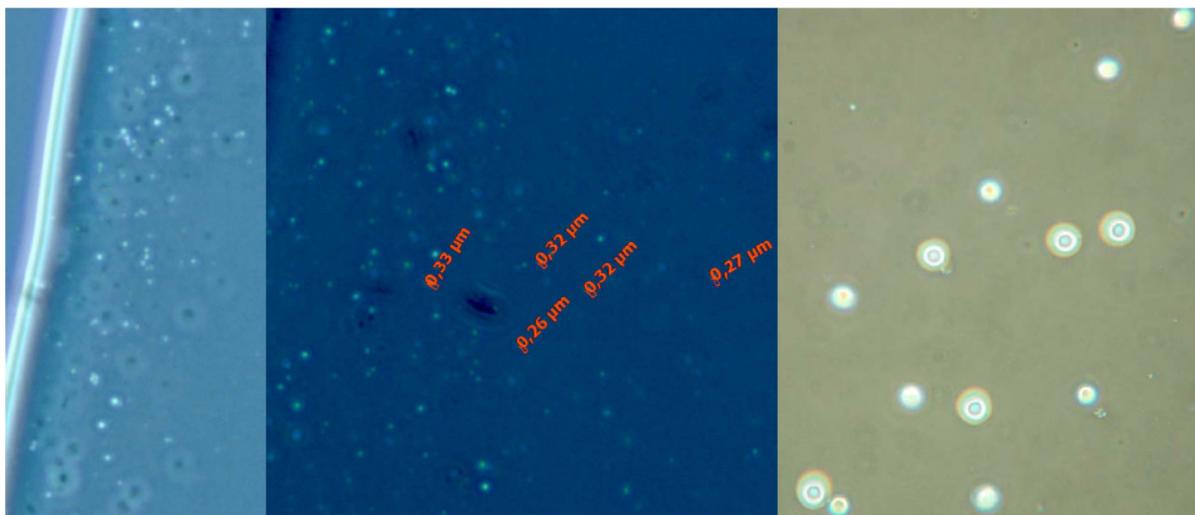


Abbildung 36.: Mikroskopische Aufnahme der angereicherten C-terminal verkürzten GatDH251. Die vermessene Größe der sichtbaren Proteinkomplexe ist in  $\mu\text{m}$  angegeben.

In der mikroskopischen Aufnahme der GatDH251-Probe zeigten sich tatsächlich sichtbare Protein-Aggregate, deren Größe sich mit der zugehörigen Software vermessen ließ. Dabei wurde für die Proteinkomplexe eine durchschnittliche Größe von  $0,34 \mu\text{m}$  bestimmt.

#### 3.4.3. Kristallisation der verkürzten GatDH251

Die angereicherte Probe, die sich nach der Gelfiltration in 20 mM BisTris-Puffer mit 250 mM NaCl befand und einen pH-Wert von 7,5 aufwies, wurde in einer Konzentration von 2 mg/ml an die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. A. Scheidig (Strukturbiologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) verschickt, um dort eine Kristallisation des Polymers der verkürzten GatDH251 durchzuführen. Erste Experimente ließen eine Kristallisation der GatDH251 allerdings noch nicht zu, da das aufkonzentrierte Protein unter den getesteten Bedingungen eine hohe Neigung zeigte, auszufallen (persönliche Mitteilung, Prof. Scheidig).

## 4. Identifizierung kompetitiver Inhibitoren

Wenn es gelänge, die GatDH mit einem gebundenen Substrat oder Inhibitor zur kristallisieren, könnten neue Erkenntnisse über die Substratbindung im aktiven Zentrum gewonnen und somit auch der katalytische Mechanismus des Enzyms besser verstanden werden. Zu diesem Zweck wurden im Oxidations- bzw. Reduktionsassay verschiedene Substanzen, von denen bereits eine schlechte Umsatzrate der GatDH bekannt war (Schneider et al., 1995 [188]; Diplomarbeit Jäkel, 1994 [88]), getestet.

Für die Reduktionsreaktion wurden zusammen mit dem Substrat Hydroxyaceton separat die Substanzen: Aceton, 2-Butanon, 2-Pentanon, 3-Hexanon, Cyclohexanon und 3-Heptanon eingesetzt. Es konnte allerdings für keine der getesteten Substanzen eine kompetitive Hemmung festgestellt werden.

Als Substrat für die Oxidationsreaktion diente 1,2-Hexandiol. Dieses wurde mit den auf einen hemmenden Effekt zu überprüfenden Substanzen: 2-Propanol, 1-Butanol, 1-Pentanol, Isoamylalkohol, Cyclopentanol, 1-Hexanol und Cyclohexanol in den Oxidationsassay eingesetzt. Von den getesteten Substanzen konnte lediglich 1-Hexanol als potenzieller Inhibitor identifiziert werden. Der Einfluss des 1-Hexanols auf die Aktivität des nativen GatDH-Enzyms wurde in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (vgl. Tabelle 29 und Abbildung 37).

Tabelle 29.: Untersuchung des Einflusses verschiedener Konzentrationen des kompetitiven Inhibitors 1-Hexanol [c(1-Hexanol)] auf die Aktivität der nativen GatDH im Oxidationsassay. Die Aktivität wurde jeweils mit 100 mM 1,2-Hexandiol als Substrat und ca. 4 mg GatDH-Protein gemessen.

$c_{1-Hexanol}$ [mM]	Volumenaktivität [U/ml]
0	77
10	66
25	56
50	32
75	18
100	13
100 (ohne 1,2-Hexandiol)	0

Besonders ab einer Konzentration von 75 mM wirkte sich das 1-Hexanol stark negativ auf die Aktivität des GatDH-Enzyms aus. Ohne 1,2-Hexandiol in der Küvette war keine Aktivität messbar. Bei einem äquivalenten Anteil beider Substanzen von 100 mM wurde die Volumenaktivität des Enzyms um 83% gesenkt. Somit konnte für 1-Hexanol ein hemmender Effekt auf die Oxidationsaktivität der GatDH nachgewiesen werden.

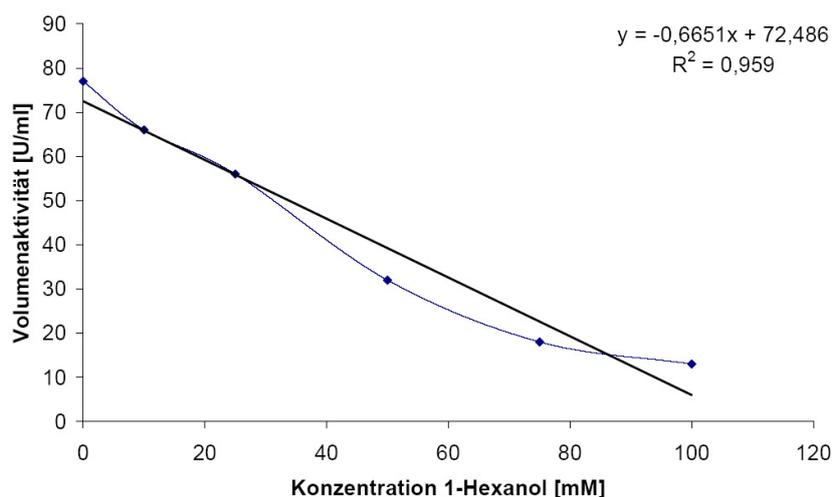


Abbildung 37.: Grafische Darstellung der Abnahme der Volumenaktivität des GatDH-Enzyms in Anwesenheit ansteigender Konzentrationen des kompetitiven Inhibitors 1-Hexanol im Oxidationsassay.

## 5. Modifizierung der Galaktitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* D zur vereinfachten Anreicherung und Immobilisierung

Die Galaktitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* D gehört dem sogenannten Izumoring an (Granström et al., 2004 [60]; Izumori, 2002 [85]), verfügt über ein relativ breites Substratspektrum und ist dazu fähig, prochirale Hydroxyketon-Verbindungen stereoselektiv zu reduzieren. Daher ist die GatDH ein sehr interessantes Enzym für die Synthese enantiomerenreiner optisch aktiver Alkohole und somit auch ein Kandidat für evolutives Proteindesign. Für Umsätze im industriellen Maßstab müssen die Enzyme in ausreichenden Mengen zur Verfügung gestellt werden. Daher ist eine schnelle und effiziente Anreicherungsmethode von Vorteil. In dieser Arbeit sollte die GatDH für eine Integration in einen enzymatischen Bioreaktor mit elektrochemischer Cofaktor Regenerierung vorbereitet bzw. optimiert werden.

### 5.1. Immobilisierung der GatDH über das GA/BSA-System

Eine Biofunktionalisierung von Metalloberflächen findet häufig Anwendung im Bereich der analytischen und klinischen Diagnostik (Portaccio et al., 2007 [157]), sowie für die Herstellung biologischer Brennstoffzellen (Heller, 2006 [72]). Elektroenzymatische Reaktionen könnten zudem in Zukunft eine wichtige Rolle bei der präparativen Synthese enantiomerenreiner Feinchemikalien für die pharmazeutische Industrie einnehmen.

men (Tienhaara and Meany, 1973 [217]). Eine Immobilisierung aller für die Reaktion benötigter Komponenten auf der Elektrodenoberfläche kann die nachfolgenden Trennungsschritte reduzieren, wenn folglich nur das Substrat und das Produkt in Lösung gehalten werden. Um auch die Biokatalysatoren an die Elektrode binden zu können, wird die Metalloberfläche üblicherweise zuvor mit einer sogenannten *self-assembled monolayer* (SAM) modifiziert (Stoica et al., 2006 [203]).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, den Cofaktor und das gewünschte Enzym über ein Glutardialdehyd/Rinderserum Albumin-System an eine Elektrode zu fixieren. Dabei wird das aktive Enzym in einem Netz aus Glutardialdehyd und damit quervernetztem BSA eingebunden. Die beiden Aldehydgruppen des Glutardialdehyds werden durch Ausbildung einer Iminbindung mit den Aminogruppen des Enzyms kovalent verknüpft (Miao et al., 2001 [134]). Um eine Veränderung der Struktur und damit eine Inaktivierung des Enzyms zu verhindern, wird BSA im Überschuss zugegeben. Dieses System wurde bereits erfolgreich für die Sorbitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* gezeigt (Gajdzik et al., 2007 [50]).

Um zu untersuchen, ob dieses Immobilisierungssystem ebenfalls für die Galaktitol-Dehydrogenase geeignet ist, musste der Einfluss des Glutardialdehyds auf die Aktivität des Enzyms vorab getestet werden. Neben den üblichen Komponenten des Oxidationsassays wurden eine BSA-Lösung (Endkonzentration 1,0% (w/v)) und verschiedene Konzentrationen des Glutardialdehyds eingesetzt. Da bei Gajdzik et al. eine GA-Endkonzentration von 0,2% (w/v) für die Immobilisierungsreaktion eingesetzt wurde, sollten im Enzymassay GA-Konzentrationen bis zu 1,0% (w/v) getestet werden (vgl. Tabelle 30 und Abbildung 38).

Tabelle 30.: Untersuchung des Einflusses verschiedener Glutardialdehyd-Konzentrationen  $[c(\text{GA})]$  auf die Volumenaktivität des angereicherten GatDH-Enzyms. Die Aktivität wurde mit 1,2-Hexandiol als Substrat und ca. 4 mg GatDH-Protein im Oxidationsassay gemessen. Im Assay war außerdem abweichend zum Standardansatz eine BSA-Lösung in einer einprozentigen Endkonzentration enthalten.

$c_{\text{GA}}$ [% (w/v)]	Volumenaktivität [U/ml]
0	81,5
0,05	29,0
0,10	13,0
0,25	2,6
0,50	0,9
1,00	-

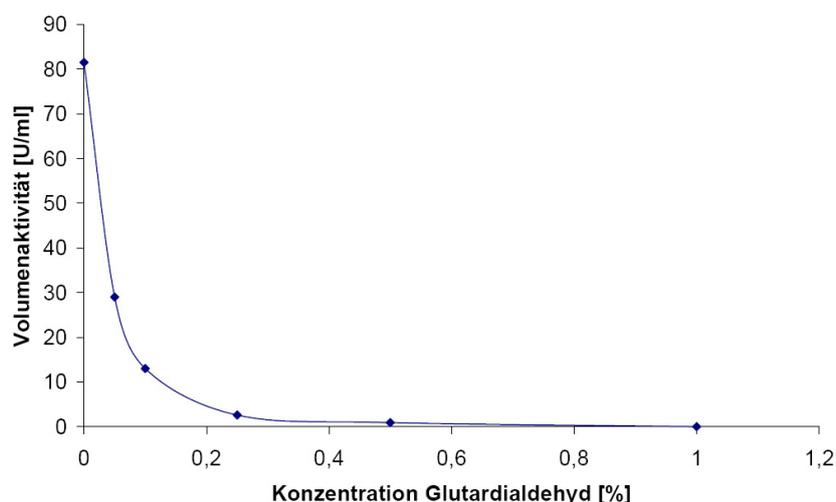


Abbildung 38.: Grafische Darstellung der Abnahme der Volumenaktivität des GatDH-Enzyms in Anwesenheit ansteigender Glutardialdehyd-Konzentrationen im Enzymassay.

Bereits bei der niedrigsten eingesetzten GA-Konzentration von 0,05% (w/v) wurde die Aktivität der GatDH mit 29,0 U/ml auf 35% der Ausgangsaktivität (81,5 U/ml ohne GA) verringert. Der Aktivitätsverlust bei 0,5% (w/v) GA in der Küvette betrug sogar 99% (0,9 U/ml). Selbst eine Inkubation der GatDH mit sehr geringen GA-Konzentrationen wirkte sich stark negativ auf die Aktivität der GatDH aus. Obwohl es der Abteilung für Physikalische Chemie gelang, eine Goldelektrode durch Auftropfen einer Lösung aus Enzym, Mediator, Cofaktor, Calciumchlorid, BSA und nur 0,05% (w/v) GA mit der GatDH zu immobilisieren (Gajdzik, 2007 [49]), zeigte die modifizierte Elektrode keine sehr gute Reproduzierbarkeit. Dies lässt sich auf die fast vollständige Denaturierung des Enzyms zurückführen, was sich in den hohen Aktivitätsverlusten äußerte. Das GA/BSA-System ist für die Immobilisierung der GatDH somit nicht geeignet.

## 5.2. Generierung von Cystein-getagten Varianten zur Immobilisierung auf Goldoberflächen

Da sich das GA/BSA-System als ungeeignet erwies, musste eine Alternative für die Immobilisierung der GatDH an eine Goldelektrode gefunden werden. Um auf den Einsatz derartiger Vernetzungssysteme oder anderer Linkermoleküle als Hilfsmittel für die Immobilisierung verzichten zu können, entstand die Idee, die GatDH direkt an die Elektrode zu binden. Voraussetzung für eine selbstständige Immobilisierung eines Enzyms ist eine hohe Affinität zur verwendeten Oberfläche, die durch Schwefelverbindungen wie Thiole und Disulfide vermittelt werden kann (Zhou et al., 1999 [241]). Da in der

Literatur Cystein-modifizierte Goldelektroden als SAM beschrieben wurden (Meng et al., 2001 [133]; Wu et al., 1999), die eine stabile Bindung zwischen der Thiolgruppe der Cysteine und der Goldoberfläche zeigten, sollte das GatDH-Enzym mit einem zusätzlichen Cystein-Tag versehen werden. Mit den zusätzlichen Cysteinresten sollte also eine direkte, gerichtete und kovalente Immobilisierung der GatDH an die verwendeten Goldelektroden ermöglicht werden, ohne dass diese zuvor mit weiteren Linkermolekülen vorbehandelt werden mussten. Um die Aktivität des Enzyms möglichst nicht zu beeinträchtigen, sollte der zusätzliche Cystein-Tag vor dem zuvor bereits etablierten His<sub>6</sub>-Tag angebracht werden (siehe Abbildung 39), da so eine Lokalisierung an der Proteinoberfläche gewährleistet werden kann. Zudem liegen im Tetramer immer zwei N-Termini nahe beieinander (siehe Abbildung 27), so dass eine stabile Verankerung des Enzyms auf der Goldoberfläche zu erwarten ist.

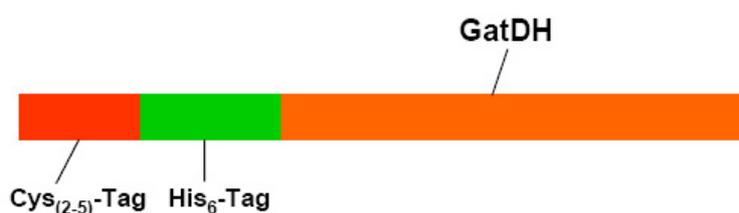


Abbildung 39.: Balkenschema des Konstruktionsprinzips eines zweiten zusätzlichen Tags aus einer verschieden großen Anzahl von Cysteinen vor dem His(6)-Tag am N-Terminus des Enzyms. Tag aus 2-5 Cysteinen zur Immobilisierung (rot), His(6)-Tag zur Anreicherung der Varianten (grün), GatDH-Sequenz (orange).

Da im Vorfeld nicht abschätzbar war, wie viele Cysteine pro Enzymuntereinheit für eine erfolgreiche Selbstadsorption des Enzyms an die Goldoberfläche notwendig waren, sollten mehrere Varianten mit einer unterschiedlichen Anzahl an Cysteinen hergestellt werden. Die verschiedenen Cystein-Varianten wurden in einer Proofstart™-PCR mit der NHis-GatDH als Template und den jeweiligen Primern GDH-*NdeI*-Cys(2-5)/His und GDH-*BamHI*-r als Gegenprimer amplifiziert. Die bei der PCR erhaltenen Amplifikate wurden auf ein Agarosegel (2,5%) aufgetragen, um die ansteigende Größe der Fragmente deutlich zu machen (siehe Abbildung 40). Die erwarteten PCR-Fragmente mit den Längen von 783 bp für die NHis-GatDH, 789 bp für die 2Cys-GatDH, 792 bp für die 3Cys-GatDH, 795 bp für die 4Cys-GatDH und 798 bp für die 5Cys-GatDH ließen sich auf dem Gel jeweils nachweisen. Die native GatDH mit einer Fragmentgröße von 765 bp diente als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion. Alle neu generierten PCR-Fragmente wurden aufgereinigt und nach einer 5 minütigen Restriktion bei 37°C mit den FastDigest Enzymen *NdeI*- und *BamHI* (Fermentas) wiederum in den Expressionsvektor pET24a(+) kloniert (siehe Abbildung 41).

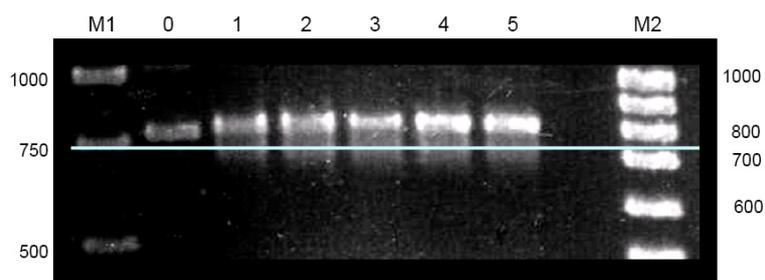


Abbildung 40.: 2,5%ige Agarose-Gelelektrophorese der mittels PCR amplifizierten, N-terminal modifizierten Varianten der GatDH. (0): native GatDH, (1): NHis-GatDH, (2): 2Cys-GatDH, (3): 3Cys-GatDH, (4): 4Cys-GatDH, (5): 5Cys-GatDH. Marker, (M1): 1 kb Leiter (Fermentas), (M2): HyperLadderIV (Bioline).

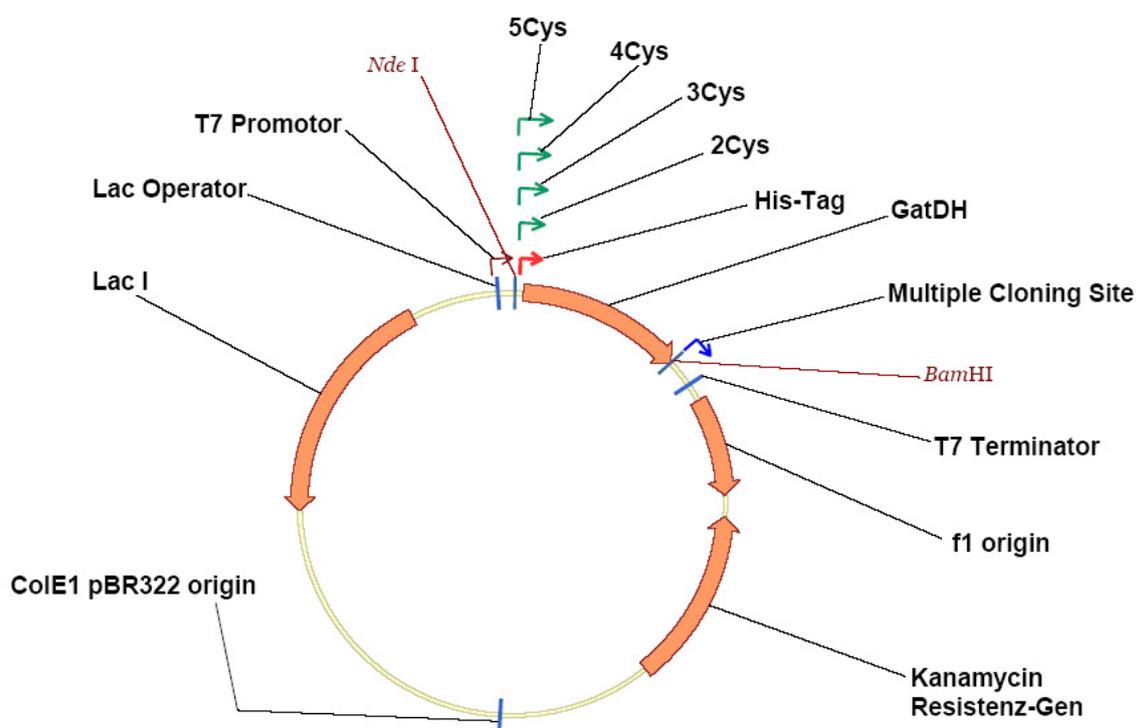


Abbildung 41.: Schema der verschiedenen GatDH-Varianten: GatDH, NHis-GatDH und 2-5Cys-GatDH, kloniert in den Expressionsvektor pET24a(+) (Novagene). Die charakteristischen Bestandteile des Vektors: MCS, Resistenz-Gen, sowie die verwendeten Restriktions-Schnittstellen und die Elemente des *Lac/T7*-Expressionssystems sind ebenfalls dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm VectorNTI Advance 10 (Invitrogen) erstellt.

Nach der Ligation wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21-Gold(DE3) jeweils mit einem der neuen Expressionsplasmide transformiert und die positiven Klonen anschließend kultiviert.

### 5.3. Vergleich der N-terminal modifizierten GatDH-Varianten

Die rekombinanten Cystein-Varianten wurden für eine erste Test-Expression zunächst in einem 25 ml Ansatz unter den Standardbedingungen kultiviert. Nach Aufschluss der Zellen wurden die zellfreien Rohextrakte und Pelletfraktionen aller Varianten in einem SDS-Gel analysiert (siehe Abbildung 42).

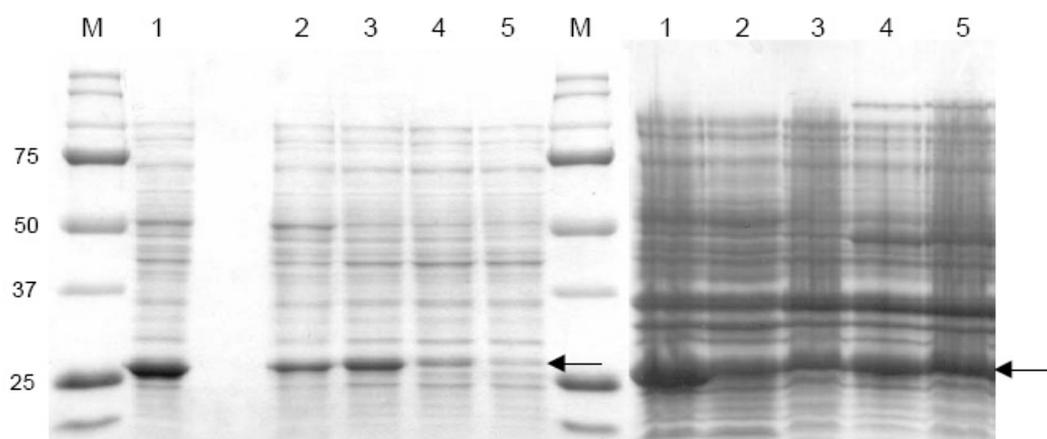


Abbildung 42.: SDS-Gelelektrophorese der Rohextrakte (links) und Pellets (rechts) der modifizierten GatDH-Varianten aus 25 ml Testansätzen. (1): NHis-GatDH, (2): 2Cys-GatDH, (3): 3Cys-GatDH, (4): 4Cys-GatDH, (5): 5Cys-GatDH. Marker (M): Dual Color (Bio-Rad). Die schwarzen Pfeile zeigen jeweils die 26 kDa große Bande des GatDH-Monomers an.

In Abbildung 42 wird deutlich, dass grundsätzlich der größte Anteil der Enzyme als *Inclusion bodies* gebildet wurde und somit als unlösliches Protein in den Zellpellet-Fractionen vorhanden war (rechts). Der kleinere Anteil befand sich als aktives lösliches Protein im Rohextrakt (links), wobei die NHis-GatDH-Variante den prominentesten Anteil im Vergleich zu den anderen Varianten zeigte. Der Anteil an aktiv exprimierter GatDH verringerte sich mit steigender Anzahl an Cysteinresten.

Um die katalytischen Aktivitäten der verschiedenen Enzyme besser vergleichen zu können, wurden alle Varianten nochmals im Anreicherungsmaßstab von je 250 ml Kulturen angezogen, abgeerntet und aufgeschlossen. Die native GatDH diente als Vergleich für die neu konstruierten Varianten und erreichte im Rohextrakt eine Gesamtaktivität von 1387 Units (vgl. Tabelle 31). Für die NHis-GatDH und die 2Cys-GatDH wurden mit 1204 Units bzw. 1108 Units ähnlich hohe Gesamtaktivitäten erhalten. Die Varianten mit einer größeren Anzahl an Cysteinresten zeigten verringerte Aktivitäten (3Cys-GatDH: 735 Units, 4Cys-GatDH: 441 Units, 5Cys-GatDH: 79 Units), was in der SDS-PAGE bereits an den niedrigeren Expressionslevel an löslichem Prote-

in zu sehen war. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den spezifischen Aktivitäten der Rohextrakte des nativen Enzyms (5,4 U/mg), der NHis-GatDH (5,8 U/mg), der 2Cys-GatDH (6,2 U/mg) und der Varianten mit dem größeren Cystein-Tag der 3Cys-GatDH (3,4 U/mg), der 4Cys-GatDH (2,3 U/mg) und der 5Cys-GatDH (0,6 U/mg) wieder.

Tabelle 31.: Gesamt- und spezifische Aktivitäten der rekombinanten GatDH-Varianten aus 250 ml Kulturen. Alle Aktivitäten wurden mit 1,2-Hexandiol als Substrat bestimmt. (\*): Die nicht-modifizierte, native GatDH wurde nicht über eine HisTrap-Säule angereichert, sondern wie bei Schneider et al., 1995 beschrieben. Von den Varianten mit sehr geringer Gesamtaktivität, 4Cys- und 5Cys-GatDH, wurden die spezifischen Aktivitäten des angereicherten Proteins nicht bestimmt (n.b.).

Variante	Modifikation	Gesamtaktivität [Units]	Spezifische Aktivität [U/mg]	
			Rohextrakt	HisTrap
native GatDH (heterol. expr. in <i>E. coli</i> )	keine	1387	5,4	19,0*
NHis-GatDH	N-terminaler His(6)-Tag	1204	5,8	14,8
2Cys-GatDH	Cys(2)-Tag, N-terminaler His(6)-Tag	1108	6,2	12,2
3Cys-GatDH	Cys(3)-Tag, N-terminaler His(6)-Tag	735	3,4	10,6
4Cys-GatDH	Cys(4)-Tag, N-terminaler His(6)-Tag	441	2,3	n.b.
5Cys-GatDH	Cys(5)-Tag, N-terminaler His(6)-Tag	79	0,6	n.b.

Die Rohextrakte der His-getagten Varianten wurden bis zur Homogenität mittels einer Affinitätschromatographie angereichert (vgl. nächstes Kapitel 5.4). Dabei konnte gezeigt werden, dass sich mit steigender Anzahl zusätzlicher Aminosäurereste am N-Terminus die spezifische Aktivität des angereicherten Proteins verringert. Die Varianten 4Cys-GatDH und 5Cys-GatDH wurden wegen ihrer zu geringen Gesamtaktivität im Rohextrakt nicht angereichert. Die native GatDH ohne N-terminale Modifikation zeigte mit 19,0 U/mg die höchste spezifische Aktivität im Vergleich zu 14,8 U/mg der NHis-GatDH, 12,2 U/mg der 2Cys-GatDH und 10,6 U/mg der 3Cys-GatDH. Diese Ergebnisse wiesen die 2Cys-GatDH als die beste Variante für die Immobilisierungsexperimente an den Goldelektroden aus, da sie noch über eine genügend hohe Aktivität verfügte und sich über den His-Tag leicht in größeren Mengen anreichern ließ.

## 5.4. Anreicherung der His-getagten Varianten

Da alle modifizierten Varianten, mit oder ohne zusätzlichen Cystein-Tag, über einen N-terminalen His-Tag verfügten, wurden sie mittels einer Affinitätschromatographie angereichert. Wegen der hohen Affinität der His<sub>6</sub>-getagten Proteine zu der mit Nickelionen beladenen HisTrap-Säule ließ sich das Anreicherungsprotokoll der modifizierten Varianten auf zwei chromatographische Schritte beschränken.

### 5.4.1. Anreicherung der NHis-GatDH

Die rekombinanten Zellen wurden zunächst als eine 25 ml große Vorkultur über Nacht bei 28°C in kanamycinhaltigem Komplexmedium angezogen. Diese Kultur diente als Inokulum für die 250 ml große Hauptkultur mit dem gleichen Medium. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 wurden die Zellen mit IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) induziert. Die Induktionszeit betrug 18 h bei 28°C, danach wurden die Zellen pelletiert. Der für den Zellaufschluss verwendete Arbeitspuffer enthielt bereits eine geringe Menge an Imidazol (20 mM), um Fremdproteine mit einer geringen Metallionenaffinität an einer Bindung an die Säule zu hindern. Dagegen waren die für die Aktivität der GatDH notwendigen Magnesiumionen in Form von MgCl<sub>2</sub> nicht in diesem Puffer enthalten, da diese Ionen die Nickelionen auf der HisTrap-Säule kompetitiv verdrängen und somit die Effizienz dieser Anreicherungsstrategie hätten herabsetzen können.

Die für die Chromatographie verwendeten Puffer wurden auf denselben pH-Wert von 6,5 titriert, da sich dieser positiv auf die Stabilität der GatDH auswirkte. Ein pH-Wert, der leicht ins saure Milieu verschoben ist, unterdrückt zudem eine unspezifische Bindung von Fremdproteinen an die Säule. Der Bindungspuffer, mit dem die Säule vorab äquilibriert und nach Auftragen der Probe gewaschen wurde, enthielt ebenfalls schon eine geringe Menge an Imidazol von 30 mM. Eine niedrige Imidazolkonzentration in diesem Puffer stellt eine Alternative zu einem zweistufigen Elutionsprogramm dar, bei dem für die erste Stufe, vor der eigentlichen Elution, ein relativ niedriger Imidazol-Gradient aus dem Elutionspuffer und einem Bindungspuffer ohne Imidazol gemischt wird. Der Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten Methode war eine kürzere Laufzeit des Programms, sowie die bereits vor dem Auftragen der Probe erfolgte Äquilibration der Säule mit dem imidazolhaltigen Puffer. Der Anteil unspezifisch gebundener Fremdproteine ließ sich somit nochmals verringern. Der zellfreie Extrakt wurde in einem Verhältnis von 1:2 mit Arbeitspuffer verdünnt und nach Filtration mit einer Gesamtproteinmenge von maximal 140 mg pro Lauf auf die Ni-Sepharosesäule geladen. Das

His-getagte Protein wurde in einem Einstufengradienten mit 0,5 M Imidazol eluiert (siehe Abbildung 43).

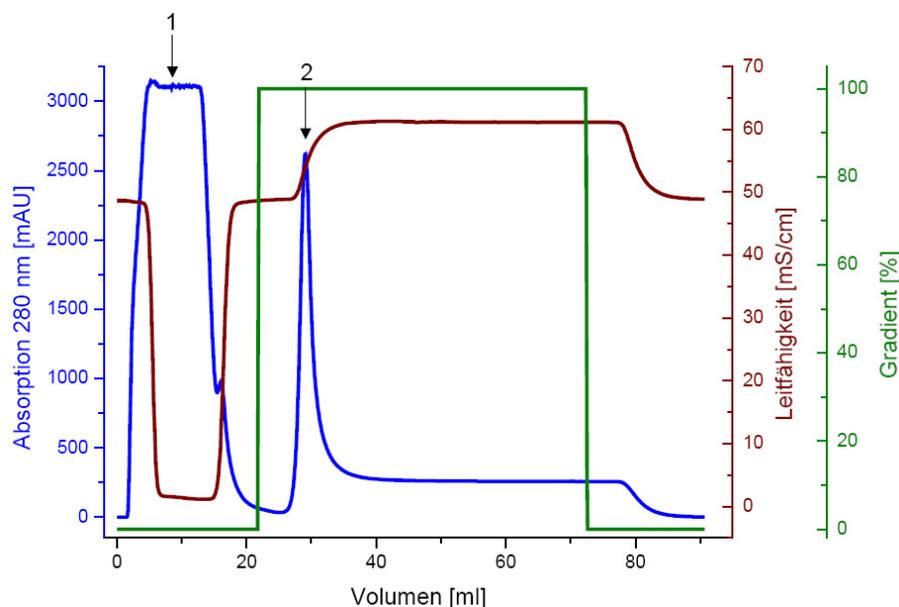


Abbildung 43.: Anreicherung der NHis-GatDH an Nickelsepharose. Absorption bei 280 nm [mAU] (blau), Leitfähigkeit [mS/cm] (braun), Stufengradient von 0 auf 100% Eluent B mit 0,5 M Imidazol (grün). Die GatDH-Aktivität wurde in den 2 ml Fraktionen mit dem Standard-Enzymassay bestimmt. Der erste Pfeil (1) zeigt den Absorptionspeak der Fremdproteine beim Auftragen der Proben auf die Säule an. Der Elutionspeak der aktiven NHis-GatDH Fraktionen wird durch den zweiten Pfeil (2) markiert.

Das Chromatogramm in Abbildung 43 zeigt, dass beim Auftragen der Probe eine große Menge Protein nicht an die HisTrap-Säule binden konnte (1. Pfeil). Hierbei handelte es sich ausschließlich um Fremdprotein, da das entsprechende Eluat keine GatDH-Aktivität im Enzymassay zeigte. Nach dem Auswaschen der ungebundenen Proteinmenge konnte mit einem Stufengradient das an die Nickelionen gebundene Enzym von der Säule eluiert werden. Dabei ließ sich nach Einsetzen von 100% Eluent B, dem imidazolhaltigen Elutionspuffer, nur ein einziger Peak im Diagramm erkennen (2. Pfeil). Die Peakfraktionen wurden im Enzymassay untersucht und die Fraktionen mit GatDH-Aktivität gepoolt. Da die Aktivität des GatDH-Enzyms bei einer längeren Inkubation im Elutionspuffer der Affinitätschromatographie stetig abnahm, musste die Probe der vereinigten aktiven Fraktionen direkt einem Pufferwechsel unterzogen werden. Die einfachste und schnellste Methode mit den geringsten Verlusten stellte das chromatographische Umpuffern dar. Es stellte sich zudem heraus, dass die GatDH beim Wechsel von einem Puffer mit relativ hohem Salzgehalt in einen Puffer ohne Salz, oder mit einem sehr niedrigen Salzgehalt, eine starke Tendenz zeigte, auszufallen. Dies ließ

sich anhand niedrigerer Aktivitätswerte bzw. eines deutlichen weißen Niederschlags in der Probe feststellen. Der Elutionspuffer enthielt einen insgesamt 1 M hohen Salzgehalt (500 mM Imidazol, 500 mM NaCl). Um die Aktivitätsverluste möglichst gering zu halten, wurde die Probe daher in einen Puffer mit erhöhter BisTris-Konzentration (100 mM), einem NaCl-Gehalt von ebenfalls 100 mM und 1 mM MgCl<sub>2</sub> umgepuffert. In Tabelle 32 sind die Ergebnisse der angereicherten NHis-GatDH dargestellt.

Tabelle 32.: Anreicherung der N-terminal His-getagten GatDH (NHis-GatDH) aus einer 250 ml Kultur (bzw. ca. 2 g feuchte Zellen).

	<b>Gesamtaktivität [U]</b>	<b>Gesamtprotein [mg]</b>	<b>Spez. Aktivität [U/mg]</b>	<b>Anreicherung [-fach]</b>	<b>Ausbeute [%]</b>
Rohextrakt	1204	207	5,8	1	100
Ni-Sepharose	1047	-	-	-	87
Umpufferung	995	67,2	14,8	2,6	83

Der Verlust an Gesamtaktivität nach der Umpufferung betrug 17%, wobei die spezifische Aktivität um den Faktor 2,6 von 5,8 U/mg auf 14,8 U/mg erhöht wurde. Nach der HisTrap waren noch 87% der Ausgangsunits vorhanden. Die Gesamtproteinmenge und damit auch die spezifische Aktivität sowie der Anreicherungsfaktor konnten für diese Probe nicht bestimmt werden, da das Imidazol im Elutionspuffer die Proteinbestimmung beeinflusst. Der Aktivitätsverlust bei der Umpufferung konnte auf 3-15% beschränkt werden. Um die Effizienz der Anreicherungsstrategie für die His<sub>6</sub>-getagten Proteine zu überprüfen, wurde eine SDS-PAGE mit den Proben angefertigt (siehe Abbildung 44), die eine reine Enzympräparation dokumentierte.

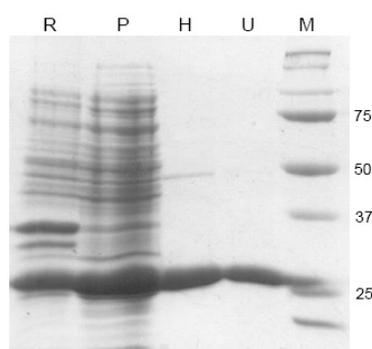


Abbildung 44.: SDS-PAGE der angereicherten NHis-GatDH. Als Marker (M) dienten 7  $\mu$ l des Precision Plus Protein Dual Color (Bio-Rad). Es wurden 5  $\mu$ l des Pellets (P) und jeweils 10  $\mu$ l des Rohextraktes (R), der HisTrap (H) und der Umpufferung (U) auf das Gel geladen. Von der angereicherten NHis-GatDH wurden 28  $\mu$ g aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

Durch die hohe Affinität der Histidine für die Nickelionen ist somit eine einzige chromatographische Trennmethode für das Entfernen der Fremdproteine ausreichend. Die Anreicherung der Variante aus einer Fermentation erfolgte äquivalent. Das pelletierte Zellmaterial wurden dazu in jeweils ca. 2 g Portionen pro Anreicherung aufgeteilt.

#### 5.4.2. Anreicherung der 2Cys-GatDH

Nach dem Prinzip der Anreicherung der NHis-GatDH ließen sich auch die mit einem zusätzlichen Cystein-Tag versehenen GatDH-Varianten anreichern. Da aufgrund der höheren Gesamt- und spezifischen Aktivität (vgl. Tabelle 31) die 2Cys-GatDH zur Immobilisierung verwendet werden sollte, wird in diesem Abschnitt nur die Anreicherung dieser Variante dargestellt. Das Elutionsdiagramm der 2Cys-GatDH mit dem entsprechenden Elutionspeak (2. Pfeil) ist in Abbildung 45 zu sehen.

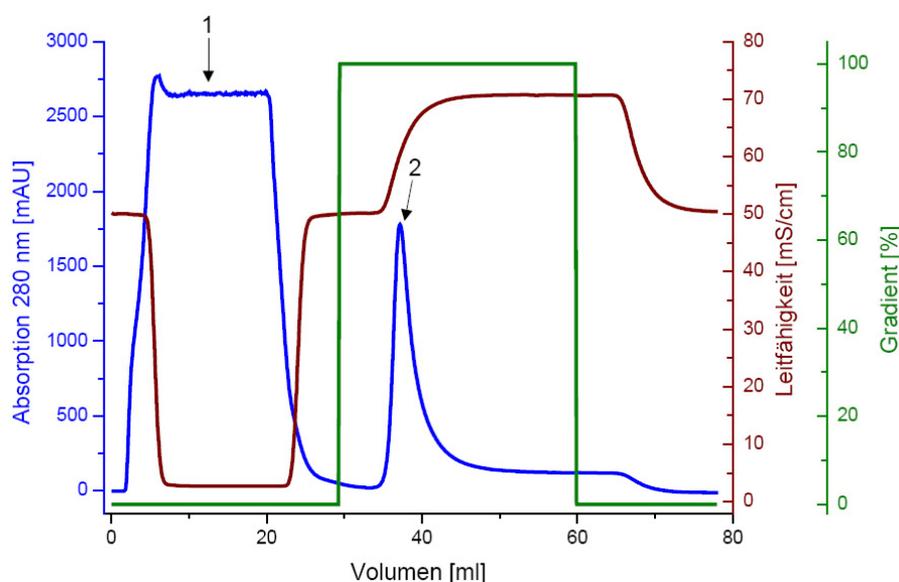


Abbildung 45.: Anreicherung der 2Cys-GatDH an Nickelsepharose. Absorption bei 280 nm [mAU] (blau), Leitfähigkeit [mS/cm] (braun), Stufengradient von 0 auf 100% Eluent B mit 0,5 M Imidazol (grün). Die GatDH-Aktivität wurde in den 2 ml Fraktionen mit dem Standard-Enzymassay bestimmt. Der erste Pfeil (1) zeigt den Absorptionspeak beim Auftragen der Proben auf die Säule an. Der Elutionspeak der aktiven 2Cys-GatDH Fraktionen wird durch den zweiten Pfeil (2) markiert.

Bei der Affinitätschromatographie gingen 7% der Gesamtaktivität der 2Cys-GatDH verloren. In Tabelle 33 sind die Ergebnisse der Anreicherung der 2Cys-GatDH zusammengefasst. Die Gesamtaktivität der 2Cys-GatDH im Rohextrakt einer 250 ml Komplexmedium-Kultur schwankte in der Regel zwischen 1000 und 1100 Units, die spezifische Aktivität betrug im Mittel 5,0 U/mg. Nach der Umpufferung betrug die Aus-

beute noch insgesamt 80% bei gleichzeitigem Entfernen von 75% Fremdprotein und einer Steigerung der spezifischen Aktivität um Faktor 3,2 auf 12,6 U/mg.

Tabelle 33.: Anreicherung der N-terminal mit zwei Cysteinen modifizierten und His-getagten GatDH (2Cys-GatDH) aus einer 250 ml Kultur (bzw. ca. 2 g feuchte Zellen).

	Gesamt- aktivität [U]	Gesamt- protein [mg]	Spez. Aktivität [U/mg]	Anreicherung [-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	1037	259	4,0	1	100
Ni-Sepharose	964	-	-	-	93
Umpufferung	829	65,8	12,6	3,2	80

Die Reinheitskontrolle durch eine SDS-PAGE (siehe Abbildung 46) zeigte eine reine 2Cys-GatDH-Präparation. Die Ergebnisse der Anreicherung der Variante mit einem zusätzlichen Cystein-Tag sind mit den Ergebnissen der NHis-Variante vergleichbar.

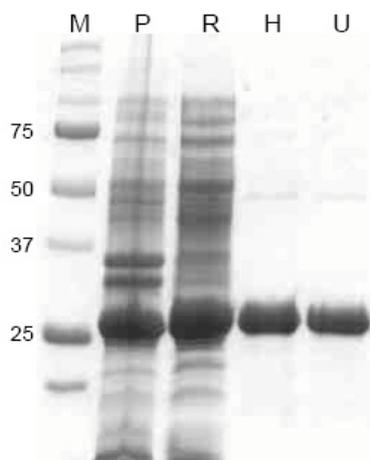


Abbildung 46.: SDS-PAGE der angereicherten 2Cys-GatDH. Als Marker (M) dienten 7  $\mu$ l des Precision Plus Protein Dual Color (Bio-Rad). Es wurden 5  $\mu$ l des Pellets (P) und jeweils 10  $\mu$ l des Rohextraktes (R), der HisTrap (H) und der Umpufferung (U) auf das Gel geladen. Von der angereicherten 2Cys-GatDH wurden 27  $\mu$ g aufgetragen. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

#### 5.4.3. Isoelektrische Fokussierung der NHis- und 2Cys-GatDH

Der isoelektrische Punkt der nativen Galaktitol-Dehydrogenase wurde von Schneider et al., 1995 bei einem pI-Wert von 4,2 beschrieben. Dagegen wurde anhand der Internet-Software Protein Prospector und dem Programm VectorNTI Advance 10 (Invitrogen) ein pI-Wert von 5,1 für die GatDH berechnet. Mit den gleichen Programmen wurden für die mit den Aminosäure-Tags verlängerten Varianten, NHis- und 2Cys-GatDH, ein pI-Wert von 5,9 errechnet. Um zu untersuchen, ob sich die modifizierten

Varianten in ihrem isoelektrischen Punkt von der unmodifizierten GatDH unterscheiden, wurde eine isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt (siehe Abbildung 47).

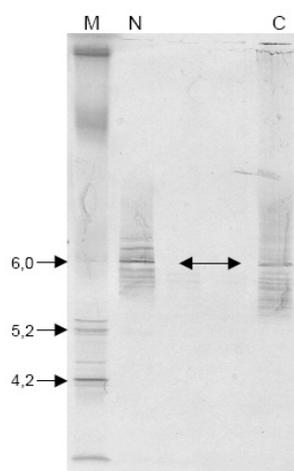


Abbildung 47.: Isoelektrische Fokussierung der angereicherten NHis- und 2Cys-GatDH. Die Varianten wurden in einem pH-Gradienten-Gel (pH 3-10) aufgetrennt. Als Marker (M) diente Protein 9 von Serva. Unverdünnte Proben der NHis-GatDH (N) und 2Cys-GatDH (C).

Im pH-Gradientengel (pH 3-10) wurde der pI-Wert beider Enzyme bei 6,0 ermittelt, da dort jeweils die prominenteste Bande zu erkennen war. Obwohl die Proteine elektrophoretisch rein waren, traten bei der IEF mehrere distinkte Banden auf. Die N-terminale Modifizierung der GatDH hatte im Vergleich zum nativen Enzym auf jeden Fall eine Änderung der Oberflächenladung um mehrere pH-Einheiten zur Folge.

## 5.5. Immobilisierung der 2Cys-GatDH auf einer polykristallinen Goldelektrode

### 5.5.1. Überprüfung der Adsorptionsfähigkeit durch SPR Spektroskopie

Der Cystein-Tag sollte eine gerichtete kovalente Immobilisierung der GatDH durch Bildung von Thiolbindungen auf der Goldelektrode ermöglichen, ohne dass es dabei einer weiteren Modifizierung der Elektrodenoberfläche bedarf. Die erfolgreiche Immobilisierung der 2Cys-GatDH ließ sich anhand einer SPR (**s**urface **p**lasmon **r**esonance)-Messung in der Abteilung für Organische Makromolekulare Chemie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Wenz) bestätigen (siehe Abbildung 48). Bei der SPR-Spektroskopie handelt es sich um eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Schichtdicken, wobei es zur einer kollektiven Anregung freier Elektronen in Metallen zu Plasmaschwingungen kommt (Plasmonen).

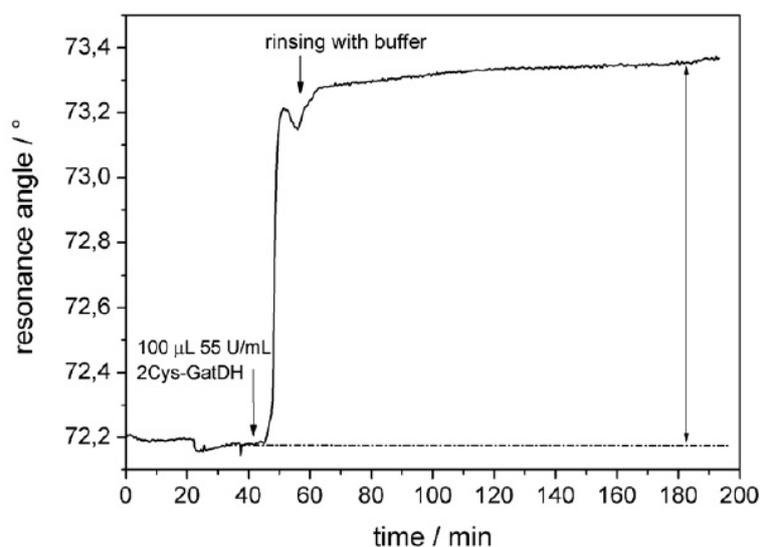


Abbildung 48.: SPR-Messung einer Goldelektrode nach Zugabe von 55 U/ml 2Cys-GatDH. Die Addition des Enzyms sowie der Beginn des Waschprozesses sind durch einen Pfeil angezeigt. Der Resonanzwinkel [°] wurde gegen die Zeit [min] aufgetragen. Abbildung aus Kornberger et al., 2009 [111].

Ein Goldblättchen mit bekanntem Brechungsindex wurde in einer Durchflusszelle zunächst etwa 40 min mit BisTris-Puffer gespült und anschließend 100  $\mu\text{l}$  2Cys-GatDH eingespritzt (erster Pfeil). Die Änderung des Resonanzwinkels wurde in Abhängigkeit der Zeit bestimmt. Durch Adsorption des Enzyms an die Goldoberfläche änderte sich der Brechungsindex und es kam zu einem Anstieg des Winkels um etwa 1,0 Grad. Der zweite Pfeil zeigt den Beginn des Waschschrittes mit BisTris-Puffer für insgesamt ca. 3 h an. Da der vergrößerte Winkel beim Spülen als gleichbleibendes Plateau vorhanden blieb, konnte auf eine kovalente Adsorption des Enzyms an die Elektrode geschlossen werden. Eine lediglich elektrostatische Bindung des Enzyms hätte einen Abfall des Winkels zum Ausgangswert zur Folge haben müssen. Unter der Annahme, dass der Brechungsindex der GatDH dem der HRP (Horseradish Peroxidase) ähnelt ( $n = 1,55$ ) (Arakawa et al., 1997 [8]), wurde eine Schichtdicke von 6-7 nm mit dem Programm Winspall, Version 2.10 (Prof. Dr. Knoll, Max-Planck-Institut für Polymerforschung, Mainz) ermittelt. In Anlehnung daran, dass 1 Da eines kugelförmigen Proteins etwa einer Größe von  $1,37 \cdot 10^{-3} \text{ nm}^3$  entspricht (Zipper et al., 1971 [244]), ließ sich für die aktive 2Cys-GatDH als Tetramer mit 110 kDa ein Durchmesser von 6,6 nm errechnen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass von der 2Cys-GatDH eine Monolayerschicht auf der Goldoberfläche gebildet wurde.

### 5.5.2. Überprüfung der Aktivität anhand Cyclischer Voltammetrie (CV)

Die Modifizierungen erfolgten am N-Terminus der GatDH, da die Kristallstruktur des Enzyms (Carius und Scheidig, Publikation in Vorbereitung) dessen Lokalisation an der Proteinoberfläche zeigte. Der Cystein-Tag sollte das aktive Zentrum des Enzyms somit nicht beeinflussen und eine freie Bindungsoption für die gerichtete Adsorption an die Elektrode ermöglichen.

Die Aktivität des immobilisierten Enzyms ließ sich durch Cyclische Voltammetrie (CV) demonstrieren. Alle CV-Messungen wurden von Dr. Gajdzik aus der Physikalischen Chemie (Arbeitskreis Prof. Dr. R. Hempelmann) durchgeführt. In dem verwendeten System wurde ein Redoxmediator (CTFM) benötigt, um die Elektronentransferrate zu erhöhen und gleichzeitig ein Überpotential der elektrochemischen Cosubstrat-Regenerierung zu minimieren. Der Cofaktor  $\text{NAD}^+$  und der Mediator CTFM (4-carboxy-2,5,7-trinitrofluorenylid-malonnitril) wurden dabei in Lösung gehalten. Das in der enzymatischen Reaktion reduzierte NADH kann mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine Calciumbrücke zum Mediator bilden und so seine Elektroden wieder abgeben. Der reduzierte Mediator diffundiert zur Elektrode und wird dort reoxidiert. Der gemessene Stromanstieg lässt sich auf die elektrochemische Regenerierung des Cofaktors zurückführen (siehe Abbildung 49). Voraussetzung für diese Reaktion ist die vorherige enzymatische Oxidation des Substrats 1,2-Hexandiol unter gleichzeitiger Reduktion des  $\text{NAD}^+$  zu NADH.

Eine mit der 2Cys-GatDH modifizierte Goldelektrode wurde in eine elektrochemische Zelle mit einer Lösung aus 1,85 mM  $\text{NAD}^+$ , 18,52 mM  $\text{CaCl}_2$  und 0,74 mM CTFM in 100 mM BisTris-Puffer mit 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,5) getaucht. Die Mediatormoleküle wurden durch cyclische Voltammetrie aktiviert (Gajdzik et al., 2007 [50]; Mano and Kuhn, 1999 [127]). Die Nitrogruppen werden dabei zu dem reversiblen Redoxpaar  $\text{NHOH}/\text{NO}$  umgesetzt. In Abbildung 49a) ist zu erkennen, dass der irreversible Oxidationspeak der Cofaktor-Regenerierung bei +100 mV erst nach einer zusätzlichen, sogenannten kathodischen Vorpolarisierung von +200 mV bis -300 mV bei einer Scangeschwindigkeit von 100 mV/s zu beobachten war (gepunktete Linie). Ohne diese Vorreaktion war selbst nach Substratzugabe (gestrichelte Linie) im Vergleich zur Messung ohne Hexandiol (durchgezogene Linie) kein Stromanstieg zu verzeichnen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich die Mediatormoleküle in diesem Ansatz als frei diffundierende Moleküle in Lösung befanden und durch die Vorpolarisierung sozusagen in Richtung der Elektrode gedrückt wurden. Dadurch wurden noch mehr Moleküle als zuvor aktiviert, wodurch sich die Elektronentransferrate erhöhte.

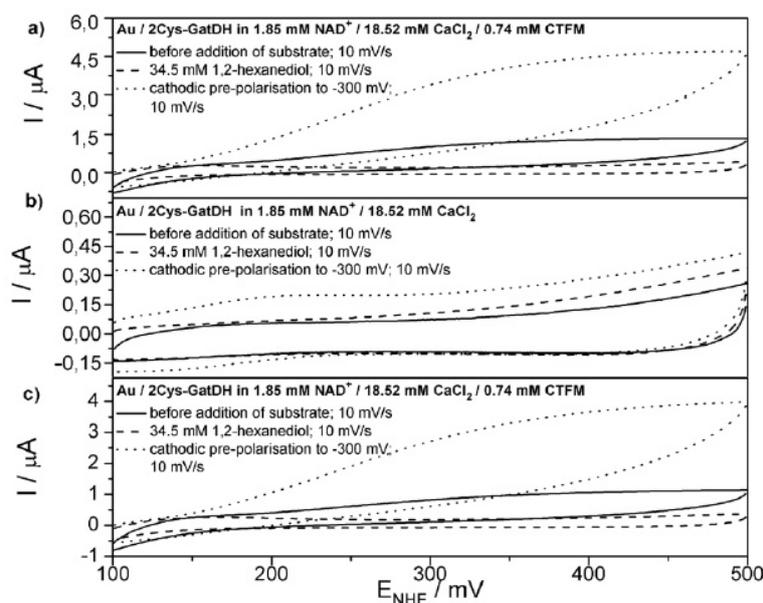


Abbildung 49.: Modifizierte Enzymelektrode mit 1,85 mM  $\text{NAD}^+$  und 18,52 mM Calciumchlorid vor (durchgezogene Linie) und nach (gestrichelte Linie) Zugabe von 34,5 mM 1,2-Hexandiol, sowie nach der kathodischen Vorpolarisierung (gepunktete Linie). Die CVs wurden a) mit, b) ohne und c) wieder mit 0,74 mM CTFM bei 10 mV/s gegen Ag/AgCl und gegen die normale Wasserstoffelektrode (NHE) gerechnet aufgenommen. Abbildung aus Kornberger et al., 2009 [111].

In einem weiteren Experiment wurde zudem festgestellt, dass eine Vorpolarisierung notwendig war, um den irreversiblen Oxidationspeak bei +100 mV zu erhalten. Diese erfolgte entweder von +200 mV bis -300 mV um zwei Nitrogruppen, beziehungsweise von +200 mV bis -500 mV, um alle drei Nitrogruppen des Mediators zu aktivieren. Da im gemessenen Potentialbereich die oxidierten CTFM-Moleküle nur durch das bei der enzymatischen Reaktion entstandene NADH reduziert werden können, beweist die Reoxidierung des Cofaktors indirekt die katalytische Aktivität der immobilisierten 2Cys-GatDH.

Da der Mediator über freie Cyanogruppen verfügt und über diese ebenfalls an die Goldelektrode adsorbieren könnte, wurden die Messungen nochmals ohne die Mediatormoleküle wiederholt (Abbildung 49b). Auch bei einer erneuten Vorpolarisierung wurde keine elektrochemische Cofaktor-Regenerierung mehr erhalten. Auf diese Weise ließ sich eine mögliche Coimmobilisierung ausschließen. Die Messungen wurden anschließend nach den Bedingungen von a) wiederholt und genau die gleichen Ergebnisse erhalten (Abbildung 49c)). Dies ist ein Beweis dafür, dass das Enzym während aller Prozeduren an der Elektrode gebunden blieb und dabei keine Aktivität einbüßte.

Bei einer Langzeitmessung wurde ein Aktivitätsverlust der adsorbierten 2Cys-GatDH von nur 1,3% nach fünf Tagen festgestellt (siehe Abbildung 50).

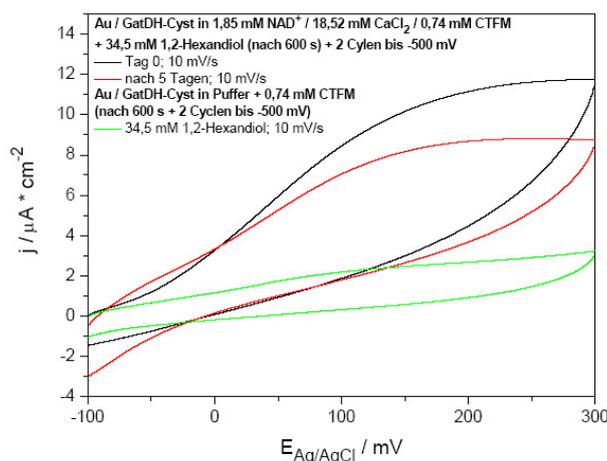


Abbildung 50.: Vergleich der CVs der mit 2Cys-GatDH modifizierten Goldelektrode bei 10 mV/s mit 1,85 mM  $\text{NAD}^+$ , 18,52 mM Calciumchlorid und 0,74 mM CTFM in Lösung nach Zugabe von 34,5 mM 1,2-Hexandiol und kathodischer Vorpolarisierung bis -500 mV bei direkter Messung (schwarz), ohne Cofaktor  $\text{NAD}^+$  (grün) und nach 5 Tagen (rot). Abbildung aus Gajdzik, 2007 [49].

Die mit der 2Cys-GatDH modifizierte Elektrode wurde dabei in 100 mM BisTris-Puffer bei 4°C gelagert und nach fünf Tagen unter gleichen Bedingungen gemessen (rot). Die katalytische Aktivität des adsorbierten Enzyms blieb somit auch über einen längeren Zeitraum erhalten. Die gleiche Messung wurde zudem ohne die Anwesenheit des Cofaktors  $\text{NAD}^+$  durchgeführt (grün), um eine nicht-enzymatisch katalysierte Oxidation des Substrats 1,2-Hexandiol auszuschließen. Ohne Cofaktor wurde kein Oxidationspeak erhalten.

In einem weiteren Experiment wurde eine Goldelektrode zunächst mit der 2Cys-GatDH und anschließend in einer CTFM-Lösung inkubiert. Die Elektrode wurde nach der bereits beschriebenen Methode in mediatorfreier Lösung gemessen. Da kein Stromanstieg zu verzeichnen war, konnte eine Coimmobilisierung des Mediators auf die enzymfunktionalisierte Elektrode ausgeschlossen werden. Auch eine gleichzeitige Inkubation in Enzym-Mediator-Lösungen unterschiedlicher Mischungsverhältnisse führte zu keiner nachweisbaren Coimmobilisierung. Eine Adsorption aller für die Reaktion benötigten Elemente ist daher zur Zeit noch nicht möglich. Eine Adsorption der GatDH unter gleichzeitigem Erhalt der katalytischen Aktivität konnte allerdings erfolgreich gezeigt werden, sofern dabei der Mediator in Lösung gehalten wurde.

## IV. Diskussion

### 1. Untersuchungen zur modifizierten

#### **GatDH-Genexpression in *Rhodobacter sphaeroides* Stamm D gegenüber Stamm Si4**

In der Natur sind Bakterien den ständigen Veränderungen in ihrer unmittelbaren Umgebung ausgesetzt. Für die meisten Mikroorganismen ist daher ein Nährstoffmangel in ihrem Ökosystem normal (Schlegel, 1992 [182]). Zum Überleben müssen sie sich den vielfältigen und wechselnden Umweltbedingungen anpassen können. Das initiale Ereignis für einen evolutionären Adaptionsprozess stellt die Entstehung neuer genetischer Varianten durch ein oder mehrere spontane Mutationsereignisse dar (Hall, 1988 [66]). Nach Hall, 1989 [67] existieren für die Evolution neuer metabolischer Funktionen drei Hauptstrategien. Zum einen kann ein Gen durch regulatorische Mutationen unter ungewöhnlichen Bedingungen exprimiert werden, wenn dieses ein Genprodukt bereits zu einer Verwertung des neuen Substrates führt (Hall, 1981 [65]). Zum anderen können strukturelle Mutationen innerhalb eines Gens die katalytischen Eigenschaften eines Enzyms verändern. Schließlich können durch Mutationen oder bewegliche Genelemente auch ganze Operons aktiviert werden. Zu den möglichen Mutationsarten zählen Basenpaaraustausche, Deletionen, Insertionen, Inversionen und Transpositionen von Genabschnitten (Brock, 2003 [21]). Dabei können transposable Insertionselemente neue Promotorsequenzen für andere Gene enthalten (Prentki et al., 1986 [158]; Ciampi et al., 1982 [28]) und kryptische Gene durch eine Insertion in *upstream* lokalisierte Regionen aktivieren (Reynolds et al., 1981 [164]). Kryptische Gene kodieren zwar für funktionsfähige Proteine, können von dem jeweiligen Organismus aber normalerweise nicht exprimiert werden. Ändern sich die Umweltbedingungen, können diese Gene aktiviert werden und dem Organismus einen Selektionsvorteil verleihen, daher bleiben diese Gene auch als solche im Genpool erhalten.

Der Organismus *Rhodobacter sphaeroides* Si4 kann aufgrund verschiedener Polyoldehydrogenasen ein breites Spektrum an Zuckern und Zuckeralkoholen als Koh-

lenstoffquelle nutzen. Allerdings kann er nicht auf dem Zuckeralkohol der Galaktose, dem Galaktitol wachsen. Die zum *smo*-Operon (Stein et al., 1997 [202]) gehörende Sorbitol-Dehydrogenase (SDH) (Philippsen et al., 2005 [156]; Schauder et al., 1995 [179]) und Mannitol-Dehydrogenase (MDH) (Schäfer et al., 1997 [181]; Schneider and Giffhorn, 1994 [187]; Schwartz et al., 1994 [192]; Schneider and Giffhorn, 1989 [186]) wurden bereits isoliert und charakterisiert und können das Galaktitol nur zu einer geringen Rate umsetzen (Schneider et al., 1995 [188]). Außerdem wurde noch eine Ribitol-Dehydrogenase (RDH) beschrieben (Kahle et al., 1992 [97]). Bei einer Kultivierung des Stammes Si4 in einer kontinuierlichen Chemostatenanzucht mit D-Glucitol in wachstumsbegrenzender Konzentration und Galaktitol im Überschuss, konnte aufgrund des herrschenden Selektionsdruckes nach 54 Tagen eine Galaktitol-metabolisierende Mutante, *Rhodobacter sphaeroides* Stamm D, isoliert werden. Die oxidative Umsetzung des Galaktitols zur L-Tagatose konnte einer neu exprimierten, von den bereits bekannten Enzymen des Wildtypstammes zu unterscheidende, Polyoldehydrogenase zugeordnet werden. Anhand einer vollständigen Sequenzbestimmung des *type-strains Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 (Zhou et al., 2003 [240]) konnte schließlich durch einen Abgleich mit den Ergebnissen einer MALDI-Fingerprint-Analyse und einer N-terminalen Anequenzierung des neuen Enzyms, ein homologer ORF identifiziert werden (Zimmer, 2006 [242]). Das Gen der Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) wurde heterolog exprimiert und zeigte die erwartete GatDH-Aktivität im Enzymassay. Durch die Identifizierung des Gens ließ sich bestätigen, dass es sich bei dem Protein nicht um eine evolutiv veränderte Variante einer der bereits beschriebenen Polyoldehydrogenasen handelte, sondern im Mutationsstamm ein stillgelegtes kryptisches Gen wieder aktiviert wurde (Zimmer 2006 [242]). Von Zimmer 2006 wurde der ORF des Gens, sowie die das Gen flankierenden Sequenzen auf Sequenzunterschiede in den verschiedenen *Rhodobacter sphaeroides* Stämmen untersucht. Auffällig war eine 21 Basenpaar große Verdopplungssequenz im 5'-Sequenzbereich des GatDH-Gens, die ausschließlich im Stamm D zu finden war. Ansonsten zeigten sich keine weiteren Unterschiede zwischen dem Parentalstamm Si4 und dem Mutationsstamm D, nur zum *type strain* 2.4.1 wurden einige Basenaustausche gefunden.

Da die kodierende Sequenz des GatDH-Gens in den Stämmen Si4 und D identisch war, kann die lediglich im Stamm D vorhandene konstitutive Expression der GatDH nur auf einer Veränderung in der Gensequenzumgebung beruhen. Daher wurde zum einen der bereits von Zimmer 2006 ermittelte Sequenzeinschub im Stamm D nochmals genauer untersucht und zum anderen der bekannte Sequenzabschnitt *upstream* des GatDH-Gens erweitert und ebenfalls auf Unterschiede in den Stämmen analy-

siert. Zur Ermittlung der unbekanntenen Sequenzbereiche wurde die von Tan et al. 2005 erstmals beschriebene SiteFinding-Methode verwendet. Dabei handelt es sich um eine PCR-Methode, mit der es anhand einer Kombination aus sequenzunspezifischen SiteFinding-Primern und genspezifischen Primern möglich ist, relativ große unbekannte Sequenzabschnitte schnell und einfach zu amplifizieren (vgl. Kapitel 6.3). Im Prinzip handelt es sich bei dieser Methode um ein *Chromosome-Walking*, das eine kostengünstige Alternative zu einem *Whole-Genome-Sequencing* darstellt, vor allem, wenn nur bestimmte Sequenzbereiche vorrangig von Interesse sind. Zur Isolierung unbekannter DNA-Fragmente, unmittelbar vor bekannten Sequenzabschnitten, wurden bereits verschiedene andere PCR-Methoden entwickelt und beschrieben. Dazu gehören beispielsweise die hoch spezifische Inverse PCR (Keim et al., 2004 [105]; Arweiler and Porteous, 1991 [10]; Huckaby et al., 1991 [78]; Ochman et al., 1988 [144]; Triglia et al., 1988 [219]), Ligations-vermittelte PCRs (Dai et al., 2000 [32]; Warshawsky and Miller, 1994 [225]; Rosenthal and Jones, 1990 [168]) und die zufallsbasierten *primed* PCRs (Antal et al., 2004 [6]; Singer and Burke, 2003 [196]; Terauchi and Kahl, 2000 [215]). Im Gegensatz zur SiteFinding bringen diese Methoden jedoch auch einige Nachteile mit sich. Dazu gehören eine begrenzte Produktlänge von weniger als 1 kb, komplizierte Manipulationsprozesse oder eine Amplifizierung von nicht zu den Zielmolekülen gehörenden Fragmenten (Tan et al., 2005 [214]). Dagegen lässt sich die SiteFinding-PCR als effiziente, verlässliche, kostengünstige und zeitsparende Methode für Moleküle einsetzen, für die schon genspezifische Primer verfügbar sind.

Grundsätzlich wurden in dieser Arbeit zwei mögliche Ursachen für die konstitutive Expression der GatDH im Stamm D gegenüber den Stämmen Si4 und 2.4.1 untersucht. Der Einfluss eines in allen Stämmen kodierten GntR-ähnlichen Proteins, als möglicher Regulator der GatDH-Expression, und die Entstehung neuer genetischer Elemente durch die Einschubsequenz, wie eine Promotorsequenz und ribosomale Bindungsstellen, zur veränderten genetischen Regulation der GatDH-Expression im Mutationsstamm *Rhodobacter sphaeroides* D. Beide Theorien werden im Folgenden getrennt voneinander diskutiert.

### **1.1. Möglicher Einfluss des GntR-Proteins auf die Expression**

Mikroorganismen müssen auf die Konzentration vieler Metabolite in ihrer Umgebung ansprechen und ihre Stoffwechselwege über mannigfaltige Mechanismen entsprechend anpassen können (Stryer, 2007 [207]). Wichtig für die Bestimmung des Ablaufs zellulärer Prozesse ist die Kontrolle der Genexpression, wobei die Syntheserate ei-

niger Proteine entsprechend dem Nahrungsangebot oder der Umweltveränderungen variiert wird. Die Genaktivität wird dabei in erster Linie auf der Ebene der Transkription reguliert. In Bakterien werden viele Gene in sogenannten Operons zusammengefasst und deren koordinierte Transkription kann durch Regulatorproteine beeinflusst werden (Stryer, 2007 [207]). Man unterscheidet zwischen der positiven Kontrolle, bei der ein Aktivatorprotein die Transkription induziert und der negativen Kontrolle, bei der ein Repressorprotein konstitutiv die Transkription eines Gens verhindert, bis ein Induktor die Initiation der Transkription induziert. Dabei spielen sogenannte *cis-acting* Kontrollelemente eine Rolle, die meist nur die Regulation von Genen beeinflussen können, die sich auf dem selben DNA-Molekül befinden. Interaktionen zwischen diesen spezifischen, palindromartigen DNA-Sequenzen und regulatorischen *trans-acting* Faktoren, die als Proteine frei diffundieren können, sind bekannt dafür die Genexpression zu steuern (Drew et al., 2000 [38]). Einer der bekanntesten und am besten untersuchten *trans-acting* Faktoren, der ein bestimmtes Gen hemmt, von diesem aber nicht selber kodiert wird, ist der Repressor des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens (Straney and Crothers, 1987 [206]; Deuschle et al., 1986 [34]). Jacob und Monod publizierten 1961 anhand des Laktose-Metabolismus in *E. coli* das erste Modell für eine genetische Regulation (Jacob and Monod, 1961 [86]). Wurde dem Wachstumsmedium Laktose oder dessen Analogon zugegeben, wurde der Repressor inaktiviert und die Expression der Enzyme des Laktose-Operons induziert. Neben Bindemotiven wie Zinkfinger, Leucinzipper, Homeodomänen und  $\beta$ -Faltblättern findet sich bei vielen prokaryotischen Regulatoren ein N-terminales Helix-Turn-Helix Motiv zur Protein-DNA-Wechselwirkung (siehe Abbildung 51). Dieses Motiv wurde erstmals für das  $\lambda$ Cro-Protein beschrieben (Pabo and Sauer, 1984 [146]). Die spezifische DNA-Bindung beruht darauf, dass eine der beiden Helices genau in die große Furche der DNA passt (Stryer, 2007 [207]). Anhand ähnlicher Funktionsweisen, gleicher Abstammung und Sequenzidentitäten ließen sich die bekannten Regulatorproteine in verschiedene Superfamilien einteilen, wie z.B. die  $\lambda$ Cro-, LysR- und CRP-Familie (Schell, 1993 [180]). Haydon und Guest klassifizierten zuvor die GntR-Familie als eine neue Familie der bakteriellen Regulatorproteine, welche als Helix-Turn-Helix (HTH) DNA-Bindeproteine charakterisiert wurden (Haydon and Guest, 1991 [71]). Die Familie wurde nach dem Repressor des Gluconat-Operons (GntR) von *Bacillus subtilis* benannt (Fujita and Miwa, 1989 [48]; Fujita and Fujita, 1987 [47]). Desweiteren zählen die Regulatoren der Histidin-Verwertung (HutC) aus *Pseudomonas putida* bzw. *Klebsiella aerogenes*, der Repressor (FadR) des Fettsäureabbaus, KorA und die drei weiteren Proteine GenA, P30 und PhnF aus *Escherichia coli* (Buck and Guest, 1989 [22]) zu dieser Familie. Von Rigali et al. wurde die mittlerweile aus über 1300 sequenzierten, bakteriellen Regulatoren be-

stehende HTH-GntR-Superfamilie weiter in die vier Hauptfamilien FadR, HutC, MocR und YtrA (Rigali et al., 2004 [166]; Rigali et al., 2002 [165]) und zwei weitere Nebenfamilien AraR und PlmA (Lee et al., 2003 [121]; Mota et al., 1999 [138]) unterteilt. Da die HTH-Regulatorproteine ein hoch konserviertes N-terminales Bindemotiv besitzen, wurden sie anhand einer dagegen relativ variablen C-terminalen Effektor- bzw. Oligomerisierungsdomäne klassifiziert.

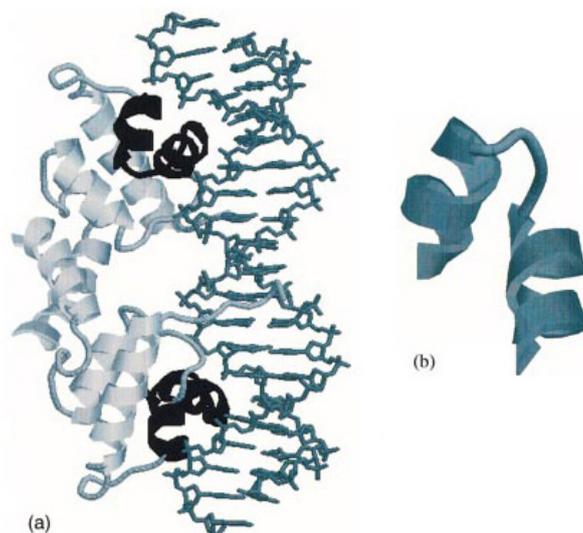


Abbildung 51.: Darstellung des  $\lambda$ -Repressor/Operator-Dimerkomplexes. Das Helix-Turn-Helix-Motiv beider Proteinuntereinheiten ist schwarz markiert. (a): Das Protein ist als Cartoon dargestellt, das DNA-Molekül im Stickmodell. (b): Detaillierte Rasmoldarstellung des HTH-Motivs. Abbildung aus Jones et al., 2003 [90].

In dem vollständig sequenzierten *type strain Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 ist in direkter Sequenzumgebung *upstream* des *GatDH*-Gens ein ORF für einen Transkriptionsregulator der GntR-Familie (RSP\_2362) hinterlegt. Bei Zimmer 2006 wurde bereits versucht anhand degenerierter Primer, abgeleitet aus konservierten Sequenzbereichen, das GntR-Gen aus der genomischen DNA von Stamm Si4 und D zu amplifizieren und somit nachzuweisen. Da dies nicht gelang, wurde eine mögliche Deletion des Gens vorgeschlagen, die einen Einfluss auf die konstitutive *GatDH*-Expression im Stamm D haben könnte. Da das Gen jedoch im Stamm Si4 ebenfalls nicht nachweisbar war, konnte diese Annahme nicht als alleinige Erklärung dienen.

Mit Hilfe der SiteFinding-PCR wurde in dieser Arbeit ein über 1 kb großer neuer Sequenzabschnitt *upstream* des *GatDH*-Gens für beide Stämme Si4 und D erhalten und analysiert. Etwa 200 bp 5'-wärts der *GatDH* wurde ein ORF ermittelt, der eine hohe Homologie zu dem GntR-Regulator aus dem *type strain* zeigte. Eine Datenbankanalyse der jeweiligen 783 bp großen kodierenden Sequenz aus Stamm Si4 und D

ergab je eine Übereinstimmung von 95% zu Transkriptions-Regulatoren anderer *Rhodobacter sphaeroides* Stämme. Bei einem genauen Sequenzvergleich von Stamm Si4 und Stamm 2.4.1 wurden 34 Basenunterschiede ermittelt, die in drei Aminosäureaustauschen resultierten. Ein Datenbankabgleich der Aminosäuresequenz lieferte sogar eine 98%ige Sequenzhomologie zu Transkriptions-Regulatoren der GntR-Familie anderer *Rhodobacter sphaeroides* Stämme. Auch die weiteren, weniger gut übereinstimmenden Datenbanktreffer lieferten fast ausschließlich Ähnlichkeiten zu Transkriptions-Repressoren der GntR-Familie anderer Organismen. Beim Vergleich der Sequenz des Parentalstammes Si4 zum Mutationsstamm D zeigte sich nur ein Basenunterschied im GntR-Gen, der an Position 26 den Austausch der Aminosäure Prolin im Stamm Si4 gegen Leucin im Stamm D zur Folge hat. Der *type strain* hat an gleicher Position ebenfalls wie Stamm Si4 ein Prolin, der Austausch ist also lediglich im Stamm D zu finden. Prolin kommt als zyklische Aminosäure innerhalb von Proteinen sowohl in *cis*- als auch in *trans*-gebundener Konfiguration vor. Es kann aufgrund einer *cis*-Amidbindung Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter unterbrechen und somit einen erheblichen Einfluss auf die Faltung von Proteinen nehmen.

Der Aminosäureaustausch könnte eine unterschiedliche Funktionalität des GntR-Proteins und somit womöglich eine veränderte Regulation der GatDH-Expression in den Stämmen zur Folge haben. Um dies zu überprüfen, wurde für beide Stämme Si4 und D eine Quikchange-Mutante hergestellt, die den jeweiligen Aminosäureaustausch in der GntR-Sequenz enthielt. Die veränderten GntR-Proteine wurden, genau wie die GntR-Proteine ohne den jeweiligen Aminosäureaustausch, gemeinsam mit dem GatDH-Enzym als Coexpressionsvarianten in *E. coli* exprimiert. Die GntR-Proteine waren für die Varianten beider Stämme als lösliches Protein in einem SDS-Gel nachzuweisen. Ihre Identität wurde anhand einer MALDI-Fingerprintanalyse bestätigt und dabei wiederum gute Homologien zu anderen Transkriptions-Repressoren der GntR-Familie gefunden. Für die coexprimierten Varianten von Stamm D konnten im Enzymassay eindeutig eine GatDH-Aktivität bestimmt werden. Im SDS-Gel konnte direkt unterhalb der etwa bei 28 kDa liegenden Bande des GntR-Proteins die 26 kDa Bande der GatDH identifiziert werden. Dass das GatDH Enzym in einer niedrigeren Konzentration als beispielsweise bei der NHis-GatDH Variante (vgl. Kapitel 3.1) gebildet wurde, könnte daran liegen, dass es als zweites Gen auf dem cotranskribierten Konstrukt lag (siehe Abbildung 52). Das GntR-Protein unterliegt als erstes Gen direkt dem starken Promotor und der ribosomalen Bindestelle (RBS) des Vektors. Die GatDH wird zwar auf der gemeinsamen mRNA transkribiert, als RBS kommen jedoch nur die möglichen RBS der Originalsequenz aus *Rhodobacter sphaeroides* in Frage, die sich zwischen den

kodierenden Bereichen beider Gene befinden. Dabei lässt sich nur schwer abschätzen, inwiefern die für den Organismus *R. sphaeroides* geeigneten RBS auch von dem Wirt *E. coli* erkannt und verwendet werden können.

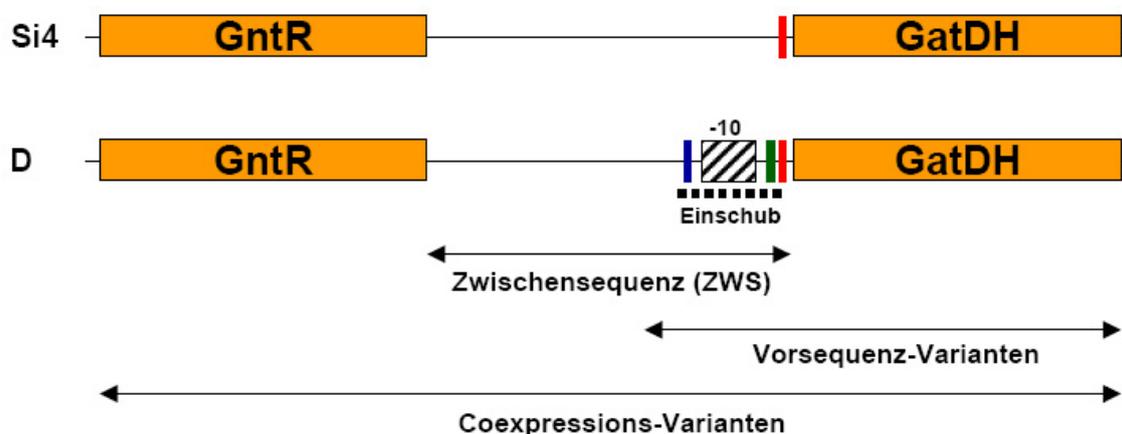


Abbildung 52.: Schematische Darstellung der verschiedenen Konstrukte aus *Rhodobacter sphaeroides* Si4 und D im Expressionswirt *E. coli*. Die kodierenden Sequenzen des GntR- und GatDH-Gens sind als orangefarbene Balken dargestellt. Die Einschubsequenz im Stamm D wird durch die gepunktete schwarze Linie markiert, die Sequenz der putativen -10-Region ist als schwarz/weiß-gestrichelter Balken gekennzeichnet. Die potenziellen RBS sind in den Farben blau, grün und rot dargestellt, wobei die rote RBS in beiden Stämmen zu finden ist. Die Vorsequenz-Varianten wurden so kloniert, dass die vektoreigene RBS nicht mehr vorhanden ist. Alle Elemente sind in ihrer Größe bzw. Position nicht im getreuen Maßstab dargestellt.

Für die coexprimierten Varianten aus Stamm Si4 konnte weder eine Aktivität, noch eine GatDH-Bande im SDS-Gel bestimmt werden. Das GntR-Protein könnte also auch in der Wirtszelle eine Expression der GatDH in der Si4-Sequenz blockieren, wohingegen beim Konstrukt aus Stamm D wegen der veränderten Sequenz keine Bindung mehr möglich ist. Dieses Ergebnis spiegelt somit die Expressionssituation in den ursprünglichen Stämmen wieder. Da sich bei den Aminosäureaustausch-Varianten keine Unterschiede zeigten, lassen sich die Ergebnisse nicht auf eine unterschiedliche Funktionalität des GntR-Proteins aus Stamm Si4 gegenüber Stamm D zurückführen. Vielmehr spricht dieses Ergebnis dafür, dass das GntR-Protein nur im Stamm Si4 an eine entsprechende Operatorsequenz binden kann und dadurch die Transkription des GatDH-Gens verhindert. Die bekannte Sequenz aus Stamm Si4 und Stamm D unterscheidet sich außer in der Punktmutation im GntR-Gen ansonsten nur noch in der Verdopplungssequenz im Stamm D. Durch den Einschub an der Stelle vor dem GatDH-Gen könnte das passende *cis*-aktive Element unterbrochen und somit inaktiviert sein. Eine passende Bindesequenz für das GntR-Regulatorprotein ließ sich aber anhand bereits bekannter Repressor-Erkennungssequenzen (Frunzke et al., 2008 [44]; Colson

et al., 2007 [29]; Rigali et al., 2002 [165]) noch nicht nachweisen. Die gute Übereinstimmung bei den verschiedenen Homologievergleichen zu anderen Transkriptions-Repressoren lässt darauf schließen, dass es sich bei dem GntR-Protein um einen Regulator der Transkription und nicht um einen Repressor der Translation handelt.

Dagegen zeigte das Konstrukt der Si4-Variante aus einem Teilstück der zwischen beiden Genen lokalisierten Sequenz und dem GatDH-Gen (Vorsequenz-Variante) GatDH-Aktivität. Dies ließe sich dadurch erklären, dass in diesem Konstrukt kein GntR-Protein exprimiert wird, welches die GatDH-Transkription ansonsten wie in der Coexpressionsvariante unterdrücken würde. Dass diese Aktivität nur sehr gering ausfiel, lässt sich sowohl auf die unbekannte Effizienz der einzig möglichen RBS in diesem Konstrukt aus *R. sphaeroides* in *E. coli*, als auch auf deren ungünstigen Position zurückführen. Warum beim äquivalenten Konstrukt aus Stamm D keine Aktivität und nur ein vergrößertes inaktives GatDH-Protein nachgewiesen werden konnte, muss andere Gründe haben und wird später erläutert. Dass bei der Anzucht der Coexpressionsvarianten ohne IPTG-Induktion trotzdem GatDH-Aktivität in den Konstrukten von Stamm D gemessen wurde, ließe sich für die Theorie der Regulation durch den GntR-Repressor nur dadurch erklären, dass trotz der spezifischen *LacI*-T7-Expressionskontrolle des Vektors eine Basalexpression der beiden Gene stattfindet. Der Anteil der gemessenen Volumenaktivität ohne Induktion ist mit bis zu über 50% jedoch im Vergleich zu den Werten unter IPTG-Zugabe als zu hoch für eine Basalexpression anzusehen. Außerdem konnte anhand weiterer Kontrollexperimente grundsätzlich ein Nachweis einer durch eine Basalexpression hervorgerufenen Aktivität nicht erbracht werden, da weder die SDH noch die NHis-GatDH unter den nicht-induzierenden Bedingungen exprimiert wurde.

Anhand der Gesamt-RNA beider Stämme Si4 und D sollte mit Hilfe der Reversen Transkription auf die jeweilige mRNA des GntR- und/oder des GatDH-Gens getestet werden. Der Nachweis einer solchen mRNA wäre ein Beweis dafür, dass das entsprechende Gen in dem jeweiligen Stamm exprimiert wird. Dabei ließe sich auch zeigen, ob sich beide Gene auf einer polycistronischen mRNA befinden und somit zu einem Operon gehören könnten oder auf getrennten mRNAs transkribiert werden. Ein Hinweis auf letztere Möglichkeit wäre die Determination einer Terminatorsequenz *downstream* des GntR-Gens, die einen Stopp der Transkription und die Freisetzung der gebildeten mRNA einleitet (Alberts, 2005 [3]). Eine solche Sequenz ließ sich in dem bekannten Sequenzstück zwischen den beiden Genen des GntR und der GatDH jedoch nicht bestimmen. Eine gemeinsame mRNA spräche allerdings dafür, dass auch beide Ge-

ne translatiert werden und würde die Theorie der Regulation durch das GntR-Protein unterstützen. Dabei bestände die Möglichkeit, dass der GntR-Regulator über eine Autoregulation verfügt, seine eigene Transkription also beim Erreichen eines bestimmten Expressionslevels wieder herunter regulieren kann. Jedoch konnte auch innerhalb der GntR-Sequenz keine Terminationssequenz ermittelt werden. Würden beide Gene auf einer polycistronischen mRNA transkribiert, müsste sich zudem eine Promotorsequenz und eine eigene RBS vor dem GntR-Gen finden lassen. Dies würde gegen die Expression der GatDH durch einen neuen Promotor sprechen. In dem sequenzierten Bereich von Stamm D, der aus der Sitefinding-PCR erhalten wurde, ließen sich diese regulatorischen Elemente allerdings nicht bestimmen. Bei der RT-PCR wurde für keinen der beiden Stämme die Bande eines gemeinsamen Amplifikats erhalten, was das Vorhandensein einer polycistronischen mRNA als unwahrscheinlich erscheinen lässt. Durch die Analyse der Gesamt-RNA des Stammes Si4 konnte weder die mRNA des GntR-Gens, noch die des GatDH-Gens nachgewiesen werden. Da dieser Stamm nachweislich nicht auf Galaktitol wachsen kann und sich beim Aufschluss der Zellen auch keine GatDH-Aktivität messen lässt, sollte auch keine mRNA für das GatDH-Gen zu finden sein. Wäre eine mRNA vorhanden, würde diese auch unweigerlich in das GatDH-Protein translatiert. Die Regulation müsste dann auf der Ebene der Translation stattfinden, was aber aufgrund der hohen Übereinstimmungen der GntR-Sequenz zu anderen Transkriptions-Regulatoren als wenig wahrscheinlich erscheint. Diese Situation wäre zudem für die Zelle ökonomisch ungünstig, da die Transkription des Gens dann unnötig erfolgen würde. Die mRNA des GntR-Gens, die einen Beweis für die Expression des GntR-Proteins und somit womöglich auch für die Repression der GatDH im Stamm Si4 erbringen könnte, wurde aber ebenfalls nicht gefunden. Dies spricht gegen die Repressortheorie, jedoch kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass sich das negative Ergebnis auf die verwendete Versuchsmethode zurückführen lässt. Eine erfolgreiche Präparation der Gesamt-RNA lässt sich nur schwer überprüfen, da beim Messen der Nukleinsäure-Konzentration gegebenenfalls noch vorhandene DNA-Rückstände mitvermessen werden. Zudem ist die RNA im Allgemeinen sehr instabil und kann selbst bei einer sorgfältigen und zügigen Verarbeitung schnell zersetzt werden. Mittels der RT-PCR konnte im Stamm D ein Amplifikat für das GatDH-Gen nachgewiesen werden. Außerdem wurde ein Amplifikat für das GntR-Protein erhalten. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass das GntR-Protein im Stamm D zwar funktional gebildet wird, auf die Expression des GatDH-Gens aber keinen Einfluss nehmen kann. Da in der Negativkontrolle für DNA-Verunreinigungen jedoch ebenfalls ein, wenn auch viel schwächeres, Signal für das GntR-Gen sichtbar war, kann der Nachweis einer GntR-kodierenden mRNA nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Anhand der RT-PCR ließ

sich aber zumindest die Existenz der mRNA für das GatDH-Gen im Stamm D nachweisen.

Für das Gram-positive Bodenbakterium *Corynebacterium glutamicum* konnte eine koordinierte Regulation des Gluconat-Katabolismus und der Glukose Aufnahme durch Transkriptions-Regulatoren der GntR-Familie gezeigt werden (Frunzke et al., 2008 [44]). Dabei reprimieren die beiden Regulatorproteine GntR1 und GntR2 in Abwesenheit von Gluconat die Expression der Gene des Gluconat-Metabolismus und aktivieren gleichzeitig die Gene für die Glukose- und Sucroseaufnahme. Für eine Reihe anderer GntR-Regulatoren, wie den MatR aus *Rhizobium leguminosarum*, konnte auch eine Aktivierung der Genexpression gezeigt werden (Rigali et al., 2002 [165]). Durch ein einfaches Anzuchtsexperiment der Stämme 2.4.1, Si4 und D sollte getestet werden, ob sich eine mögliche funktionale und konstante Repressorwirkung des GntR-Proteins in den Stämmen 2.4.1 und Si4 aufheben und dadurch eine Expression des GatDH-Enzyms induzieren lässt. Dazu wurden die Stämme jeweils auf Mineralmedium mit Gluconat als einziger Kohlenstoffquelle angezogen, um zu überprüfen, ob dieses Substrat eine ähnliche Wirkung auf den GntR-Regulator besitzt, wie die von Laktose oder IPTG auf den *Lac*-Repressor. Ein regulatorisches Protein erfährt durch die Bindung eines sogenannten Coregulator-Moleküls eine allosterische Veränderung und kann seine Bindungsfunktion an die DNA nicht mehr ausüben (Brock, 2003 [21]). Theoretisch wäre auch eine Aktivierung eines Aktivatorproteins durch das Gluconat denkbar, das erst nach seiner Bindung an die DNA eine Transkription durch die RNA-Polymerase möglich macht. Für den verwandten Organismus *Rhodobacter capsulatus* wurde beispielsweise eine Aktivierung der Expression der Gene des Taurin-Metabolismus durch den Regulator TauR beschrieben, der zur MocR Unterfamilie der GntR-Regulatoren gehört (Wiethaus et al., 2008 [230]). Alle Stämme wurden zunächst zur Reinheitskontrolle unter aeroben und anaeroben Bedingungen auf MV-Medium mit Galaktitol angezogen. Wie erwartet, konnte lediglich der Stamm D auf diesem Medium wachsen. Es wurden Kulturen aller Stämme auf Malatmedium bis zu einer optischen Dichte von 1 angezogen und diese schließlich nach einem Pelletieren und mehrfachen Waschen der Zellen in das Gluconatmedium überimpft. Alle Stämme konnten das Gluconat als Kohlenstoffquelle metabolisieren. Die Stämme Si4 und 2.4.1 zeigten dabei allerdings keine GatDH-Aktivität. Auch die im Stamm D gemessene Aktivität ließ keine Rückschlüsse auf eine veränderte Expressionsrate des GatDH-Enzyms zu. Die Expressionsrate des GatDH-Enzyms blieb in den Stämmen im Vergleich zur normalen Anzucht auf Malat gleich und hätte sich bei einer Bindung des Gluconats an das Regulatorprotein jeweils umgekehren müssen. Für Stamm D war im Prinzip auch keine

Änderung zu erwarten, da das GatDH-Enzym konstitutiv exprimiert wird. Somit konnte kein Nachweis auf einen Einfluss von Gluconat auf die Expression der GatDH erbracht werden. Das Kultivierungsexperiment der verschiedenen Stämme auf dem die Funktion des Regulators als Coregulator möglicherweise beeinflussenden Substrat Gluconat, konnte also weder eine negative Repressor-Regulation im Stamm Si4, noch eine positive Aktivatorfunktion für die Expression der GatDH im Stamm D bestätigen.

Die Ergebnisse, der mit IPTG induzierten Coexpressionsvarianten stimmten mit der GntR-Repressor-Hypothese überein, da genau wie in den jeweiligen *Rhodobacter*-Stämmen nur im Stamm D GatDH-Aktivität zu messen war. Dass in dem Konstrukt mit der nicht vollständig klonierten Sequenz aus Stamm Si4 Aktivität vorhanden war, kann so interpretiert werden, dass die reprimierende Wirkung des hier nicht exprimierten GntR-Proteins fehlte. Allerdings kann anhand der GntR-Regulationstheorie nicht erklärt werden, warum im gleichen Konstrukt aus Stamm D, im Vergleich zur coexprimierten Variante, keine GatDH-Aktivität mehr gemessen werden konnte. Zudem ist durch diese Theorie nicht zu begründen, wieso bei der Anzucht ohne IPTG-Induktion in den coexprimierten Varianten aus Stamm D immer noch eine relativ hohe GatDH-Aktivität zu bestimmen war, obwohl eine Basalexpression vorher ausgeschlossen wurde. Insgesamt können die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zwar einen Einfluss des GntR-ähnlichen Proteins auf die GatDH-Expression in den *Rhodobacter sphaeroides* Stämmen nicht widerlegen, lassen aber eine derartige Regulation als unwahrscheinlich erscheinen. Die jeweiligen Argumente für bzw. gegen die GntR-Regulationstheorie sind in Tabelle 34 zusammengefasst.

Tabelle 34.: Aus den durchgeführten Experimenten erhaltene Argumente für und gegen eine Repression der GatDH-Expression im Stamm *Rhodobacter sphaeroides* Si4 durch das GntR-ähnliche Protein.

<b>GntR-Theorie</b>	
<b>pro</b>	<b>contra</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coexpressionsvarianten in <i>E.coli</i> aus Stamm D mit Aktivität, aus Stamm Si4 ohne Aktivität</li> <li>- Aktivität der Si4 Variante in <i>E.coli</i> ohne GntR-Expression</li> <li>- keine Terminationssequenz hinter GntR-Gen gefunden</li> <li>- mRNA des GntR im Stamm D möglicherweise vorhanden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- kein Unterschied der QuikChange-Mutanten mit einzigem AS-Austausch im GntR</li> <li>- keine GntR-Erkennungssequenz gefunden</li> <li>- Aktivität der Coexpressionsvarianten aus Stamm D, obwohl keine Basalexpression bei Anzucht ohne IPTG nachweisbar</li> <li>- keine mRNA des GntR im Stamm Si4 gefunden</li> <li>- keine polycistronische mRNA im Stamm D nachweisbar</li> </ul>

In Zukunft könnten noch Experimente zur Aufklärung der Funktion des GntR-Proteins durchgeführt werden. Um mögliche Erkennungssequenzen für das GntR-Protein zu identifizieren, könnten sogenannte Gel-Mobilitäts-Shift-Assays durchgeführt werden (Frunzke et al., 2008 [44]). Das Regulatorprotein muss dazu zunächst überexprimiert und bis zur Homogenität angereichert werden. Der Bindungstest für eine direkte Interaktion des Proteins erfolgt *in vitro* mit der DNA-Sequenz in unmittelbarer Sequenznachbarschaft des zu regulierenden Gens. Das Protein wird dabei in unterschiedlichen Konzentrationen mit den zu analysierenden DNA-Fragmenten inkubiert. Das Ergebnis lässt sich dann auf einem nativen Trenngel überprüfen. Zur Bestimmung der Operatorsequenz ließe sich ein Gemisch aus DNA-Fragmenten und dem Regulatorprotein auch durch eine Nitrocellulosemembran filtrieren (Stryer, 2007 [207]), wobei nicht gebundene DNA-Fragmente den Filter passieren und die DNA-Protein-Komplexe gebunden werden. Nach einer Dissoziation der Proteine können die DNA-Fragmente analysiert werden. Anhand bereits bekannter Erkennungssequenzen lassen sich auch über verschiedene Algorithmen mit speziellen Computerprogrammen DNA-Bindestellen für ein Protein ermitteln bzw. vorhersagen (Stormo, 2000 [204]). Das angereicherte GntR-Protein könnte auch zur Aufklärung dessen Struktur kristallisiert werden. Anhand der Proteinstruktur ließe sich das HTH-Motiv der GntR-Regulatoren identifizieren, analysieren und so das Protein einer der GntR-Unterfamilien zuordnen. Über eine GntR-Knockout-Mutante ließe sich womöglich ebenfalls der Einfluss des GntR-Proteins auf die GatDH-Expression in den *Rhodobacter sphaeroides*-Stämmen testen. Dabei könnten mittels einer DNA Microarray-Analyse Veränderungen in dem Expressionsmuster der Knockout-Mutante gegenüber dem Wildtypstamm durch einen Vergleich des mRNA-Levels bestimmt werden (Gao et al., 2008 [52]). Eine Inaktivierung der chromosomalen Kopie eines Regulatorproteins kann dabei zu einer konstitutiven Expression des von ihm reprimierten Gens führen (Penfold and Pemberton, 1994 [149]). Gelingt es die Zellen kompetent zu machen, könnten Zellen des Stammes Si4 auch mit einem Plasmid transformiert werden, das den entsprechenden Sequenzbereich mit der Einschubsequenz aus Stamm D trägt. Findet eine homologe Rekombination statt, können die Si4-Zellen die Fähigkeit das GatDH-Gen zu exprimieren übernehmen.

## **1.2. Konstitutive Expression der GatDH durch eine neue putative Promotorsequenz im Stamm D**

Neben der Theorie einer unterschiedlichen Expression des GatDH-Gens in den betrachteten *Rhodobacter sphaeroides*-Stämmen durch den Einfluss eines GntR-Regu-

lactorproteins, wird die Entstehung einer neuen Promotorsequenz durch den Einschub im Stamm D postuliert. Die bekannten Sequenzbereiche in den Stämmen Si4 und D unterscheiden sich insgesamt nur an zwei Stellen, nämlich in einer Punktmutation innerhalb des GntR-kodierenden Gens und einer Duplikationssequenz in der 5'-Region des GatDH-Gens, die lediglich im Stamm D zu finden ist (siehe Abbildung 53). Daher wurde die Insertionssequenz auf neu entstandene regulatorische Elemente, wie Promotor- oder Operatorsequenzen und ribosomale Bindestellen (RBS) untersucht, die eine konstitutive Expression der GatDH im Stamm D gegenüber den Stämmen Si4 und 2.4.1 erklären könnte. Ein *cis*-aktives Element für die Bindung eines Regulatorproteins ließ sich in der unmittelbaren Sequenznachbarschaft des GatDH-Gens weder im Stamm Si4 noch im Stamm D identifizieren. Innerhalb der Duplikationssequenz im Stamm D konnten jedoch zwei neue RBS gefunden werden (siehe Abbildung 53). Die erste RBS (blau) ist in der Sequenz vor dem GatDH-Gen nun zweimal vorhanden und lässt sich auch in der Sequenz von Stamm Si4 finden. Direkt vor dieser AGGAA-Sequenz befindet sich im Stamm D durch den Einschub die neuartige RBS AGGAG (grün). Diese Sequenz stellt nicht nur eine der idealsten ribosomalen Erkennungssequenzen dar, sondern ist auch in der optimalen Position von acht bis zehn Basenpaaren vor dem Translationsstart lokalisiert (Suzek et al., 2001 [211]).



Abbildung 53.: Vergleich der möglichen genetischen Regulationselemente in der Vorsequenz der untersuchten Stämme Si4 und D. Die -35- und -10-Region einer putativen neuen Promotorsequenz im Stamm D wurde mit den in der Literatur für *Rhodobacter sphaeroides* beschriebenen Promotoren *puf*, *puc*, *bchC*, *cycA* und mit der Konsensussequenz  $\sigma$ -abhängiger *E. coli*-Promotoren verglichen. Die Insertionssequenz wird durch die langen Pfeile, der Translationsstart durch die kleinen Pfeile angegeben. Die Promotorsequenzen sind unterstrichen, zusätzlich sind alle Basen, die mit der Sequenz von Stamm D übereinstimmen rot markiert. Die vorhandenen RBS sind blau und grün gefärbt.

In der Insertionssequenz lässt sich zudem eine passende -10-Region eines Promotors identifizieren, welche mit den in der Literatur beschriebenen Pribnow-Boxen verschiedener anderer Promotoren aus *Rhodobacter sphaeroides*: *puf*, *puc*, *bchC* (Bauer, 1995 [12]) und *cycA* (Karls et al., 1999 [101]; Nickens and Bauer, 1998 [141]) hinreichend übereinstimmt. Die Promotoren *puc* (LH-II-Antennenkomplex), *puf* (LH-I-AK) und *bchC* (Bakteriochlorophyll) sind für die Regulation verschiedener Operons zuständig, die alle Teil des Photosynthese-Apparates des fakultativ anaeroben Organismus sind und unter reduzierten Sauerstoffbedingungen aktiviert werden (Bauer et al., 1988 [13]). Der *cycA*-Promotor kontrolliert die Expression des Elektronen-Carrier-Proteins Cytochrom  $c_2$  (Karls et al., 1999 [101]). Die Nukleotid-Erkennungssequenz eines Promotors, an die die RNA-Polymerase binden und somit die Transkription eines Gens erfolgen kann, besteht insgesamt aus zwei Elementen, der -35-Region und der Pribnow-Box (-10-Region) (Alberts, 2005 [3]). Die Synthese der mRNA beginnt wenige Basen nach der Pribnow-Box und endet, nachdem die Polymerase auf ein Stopp-Signal trifft und sich von dem DNA-Matrixstrang wieder ablöst. Die 5'-Sequenz der entstandenen mRNA muss ein Sequenzmotiv enthalten, welches dem 3'-Ende der 16S rRNA der Ribosomen komplementär ist, um von diesen in eine Proteinsequenz translatiert werden zu können. Auch für die -35-Region ließ sich vor dem Einschub ein passender Sequenzbereich finden, auch wenn dieser keine so guten Übereinstimmungen zu den anderen Promotoren wie die putative -10-Region zeigte. In der Vorsequenz aus Stamm Si4 ließen sich dagegen, mit Ausnahme der einen RBS, keine weiteren regulatorischen Elemente bestimmen.

Es ist grundsätzlich in Frage zu stellen, ob sich die Bedingungen, die einem Organismus vorzufinden sind, in einer Wirtszelle nachstellen lassen. So kann nicht garantiert werden, dass die genetischen Elemente, die in *Rhodobacter sphaeroides* funktional sind, auch genauso in *E. coli* erkannt und abgelesen werden. Von Subudhi et al., 2008 [208] konnte allerdings gezeigt werden, dass ein isolierter Promotor für das D6D-Gen aus *Spirulina* in *Escherichia coli* funktional war. Um die Funktionalität der neuen genetischen Elemente analysieren zu können, wurden die in Abbildung 53 dargestellten Sequenzen als sogenannte Vorsequenz-Varianten in *E. coli* kloniert. Die vektoreigene ribosomale Bindestelle wurde dabei über Verwendung bestimmter Restriktionsschnittstellen entfernt. Bei Anzucht der Varianten mit IPTG-Zugabe konnte lediglich auf die RBS getestet werden, da der starke T7-Promotor unter induzierenden Bedingungen die Wirkung eines sequenzeigenen Promotors überlagert. Für die Si4-Variante konnte unter diesen Bedingungen eine geringe GatDH-Aktivität gemessen werden, was sich nur auf die einzige RBS AGGAA direkt vor dem GatDH zurückführen lässt. Die sehr

geringe Aktivität kann entweder von einer ungünstigen Lokalisation oder einem nicht optimalen Sequenzmotiv verursacht werden. Für die gleiche Variante aus Stamm D konnte unter identischen Bedingungen keine Aktivität gemessen werden. Es wurde jedoch ein vergrößertes GatDH-Protein identifiziert. Dieses kann nur dadurch entstanden sein, dass die erste mögliche RBS AGGAA der Einschubsequenz abgelesen und so das *in frame* liegende ATG der Insertion als alternatives Startcodon verwendet wurde. Es wäre aber eigentlich zu erwarten gewesen, dass alle drei möglichen RBS sozusagen in Konkurrenz zueinander abgelesen werden und dadurch auch die aktive GatDH-Variante gebildet würde. Diese Vermutung ließ sich aufgrund einer fehlenden GatDH-Aktivität allerdings nicht bestätigen. Wäre die vektoreigene RBS nicht entfernt worden, wäre vermutlich ebenfalls die inaktive GatDH-Variante gebildet worden, da die RBS des Vektors auch *upstream* des ersten ATG lokalisiert gewesen wäre. Gerade weil aber die Sequenz AGGAG grundsätzlich in Kombination mit einer Position ca. 10 Basenpaare vor dem Translationsstart als eine der idealsten RBS in *E. coli* beschrieben wurde (Suzek et al., 2001 [211]), lässt sich nicht erklären, warum nicht auch diese RBS in der Vorsequenz-Variante aus Stamm D zur Translation des GatDH-Gens genutzt wurde. In diesem Fall hätte aufgrund der Lage *downstream* des ersten ATG die Translation in einem aktiven GatDH-Enzym resultiert. Genauere Kenntnisse über die Funktionalität der RBS und die daraus resultierenden Enzymprodukte könnten dann erhalten werden, wenn es gelänge, die einzelnen RBS gezielt abzuschalten. Da die Sequenzumgebung der drei möglichen RBS jedoch sehr ähnlich ist, gelang eine Herstellung entsprechender Quikchange-Varianten bisher nicht.

Da für das *LacI*/T7-Kontrollsystem des Expressionsvektors bzw. der Wirtszellen keine Basalexpression nachgewiesen werden konnte, ließ sich auf einen sequenzeigenen Promotor einfach dadurch testen, dass die plasmidtragenden Zellen ohne IPTG-Induktion kultiviert wurden. Der *Lac*-Repressor ist in Abwesenheit des Induktors an den Operator gebunden und blockiert somit die Transkription (Stryer, 2007 [207]). Die Si4-Variante zeigte ohne die Aktivierung des T7-Promotors entsprechend auch keine GatDH-Aktivität mehr. Allerdings konnte für die Variante aus Stamm D immer noch keine Aktivität gemessen werden, obwohl hier die potenzielle Promotorsequenz zur Verfügung stand. Die Sequenz aus Stamm D wurde direkt hinter den *Lac*-Operator des Vektors kloniert, der auf dem Plasmid *downstream* des T7-Promotors lokalisiert ist (siehe Abbildung 21). Unter nicht-induzierenden Bedingungen sind die *LacI*-Homotetramere, mit einem Molekulargewicht von je 37 kDa pro Untereinheit, an diesen Operator gebunden. In der Variante aus Stamm D ist zwischen dem *LacI*-Operator und der putativen -35-Region des neuen GatDH-Promotors lediglich noch eine 42 Basenpaar

große Sequenz lokalisiert. Die nicht zum T7-System gehörenden RNA-Polymerasen der Wirtszelle könnten aufgrund sterischer Hinderungen, verursacht durch die gebundenen *LacI*-Moleküle, keinen Zugang zu der Promotorsequenz finden. In den coexprimierten Varianten aus Stamm D konnte dagegen unter identischen Bedingungen GatDH-Aktivität gemessen werden. Zwischen dem potenziellen Promotor und dem Operator befand sich in diesen Varianten jedoch eine wesentlich größere Sequenz, die aus dem vollständigen Zwischenbereich beider Gene und dem *GntR*-Gen bestand. Da im gleichen Experiment für die Si4-Varianten keine Aktivität zu verzeichnen war, kann die Aktivität nur auf die neue Promotorsequenz in der Einschubsequenz von Stamm D zurückzuführen sein. Für die coexprimierten Varianten schien auch die konkurrierende Situation der RBS zuzutreffen, da auch bei der Anzucht mit IPTG-Induktion Aktivität zu messen war. Diese Aktivität fiel jedoch wesentlich geringer aus als in den anderen klonierten GatDH-Varianten. Aufgrund des sehr ähnlichen Molekulargewichts des aktiven und des inaktiven, vergrößerten GatDH-Enzyms ließen sich allerdings keine unterschiedlichen Protein-Varianten im SDS-Gel bestimmen bzw. wegen der gleichen Aminosäurekomposition auch keine sinnvolle MALDI-Analyse durchführen. Die verdoppelte N-terminale Sequenz lässt sich über den üblicherweise verwendeten Trypsinverdau nicht nachweisen, da Trypsin innerhalb dieser Sequenz schneiden kann. Eine funktionale Erkennung der Promotorsequenz und einer entsprechenden RBS, die zu einer messbaren GatDH-Aktivität führten, war somit nur in dem wesentlich größeren Coexpressionskonstrukt nachzuweisen. Um auszuschließen, dass das *GntR*-Protein dabei nicht doch einen Einfluss auf die Expression nimmt, könnte das Coexpressionskonstrukt zunächst so verändert werden, dass das *GntR*-Protein nicht mehr exprimiert werden kann. Dies könnte beispielsweise durch ein Mutieren des Start- oder Stoppcodons erfolgen. Die Sequenz müsste dann nach und nach verkürzt werden, um einen endgültigen Beweis dafür zu erhalten, dass die neuen genetischen Elemente, entstanden durch die Duplikation der 21 bp großen Sequenz, für die Expression des GatDH-Gens im Stamm D verantwortlich sind.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bezüglich der Untersuchung der veränderten GatDH-Expression im *Rhodobacter sphaeroides* Stamm D gegenüber Stamm Si4 ließen noch keinen endgültigen Beweis für eine der beiden Theorien, eine negative Repression über ein Regulatorprotein im Stamm Si4 oder eine positive Regulation über eine neue Promotorsequenz im Stamm D, zu. Beide Möglichkeiten können auf der durch Mutation entstandenen Einschubsequenz im Stamm D beruhen und für die modifizierte Regulation verantwortlich sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch die konstitutive Bildung der GatDH in *Rhodobacter*

*sphaeroides* D als Folge der neuen Promotorsequenz als wahrscheinlicher erscheinlicher. Ob die neue potenzielle Promotorsequenz im Stamm D auch als solche erkannt wird, ließe sich durch *in vitro* Experimente zur DNA-Bindung dieses Bereichs anhand der verschiedenen RNA Polymerase Holoenzyme aus *Rhodobacter sphaeroides* aufklären. Karls et al., 1993 [100] analysierten Ähnlichkeiten in der Proteinstruktur und von Promotor-Erkennungssequenzen der RNA-Polymerasen aus *Rhodobacter sphaeroides* zu denjenigen aus *Escherichia coli*. Für die Expression des Cytochrom  $c_2$ -Gens ließ sich auf diese Weise bereits die notwendige Kernerkenungssequenz für den entsprechenden *cycA* P1 Promotor und das passende RNA Polymerase Holoenzym identifizieren (MacGregor et al., 1998 [123]).

## 2. Untersuchung der Magnesiumionen-Abhängigkeit der GatDH

Die Kristallstruktur der nativen Galaktitol-Dehydrogenase wurde mit einer Auflösung von 1,25 Å bereits von Carius und Scheidig (Publikation in Vorbereitung) aufgeklärt. Als Modell diente dabei die Kristallstruktur der Gluconat-5-Dehydrogenase (TM0441) aus *Thermotoga maritima*. Die Kristallstruktur des aktiven GatDH-Proteins zeigte eine homotetramere Konformation über die Komplexierung zweier Magnesiumionen (siehe Abbildung 54A). Die Tertiärstruktur des Enzyms kommt somit durch eine Dimerisierung zweier Dimer zustande. Die jeweils benachbarten Monomere A1 und A2 bzw. B1 und B2 interagieren über hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoff- und Salzbrücken miteinander. Auch die Wechselwirkungen am Interface der Untereinheiten A1/B1 und A2/B2 wirken sich stabilisierend auf die Struktur aus. Die diagonal gegenüberliegenden Monomere A1 und B2 sowie B1 und A2 koordinieren über die Carboxylgruppen ihrer C-Termini je ein Magnesiumion (siehe Abbildung 55). Das komplexierte  $Mg^{2+}$ -Ion wird dabei von einer oktaedrischen Koordinationssphäre umgeben, die aus vier Wassermolekülen und der Carboxylgruppe der letzten Aminosäure (Tryptophan 254) von beiden Monomeren besteht (Carius, 2009).

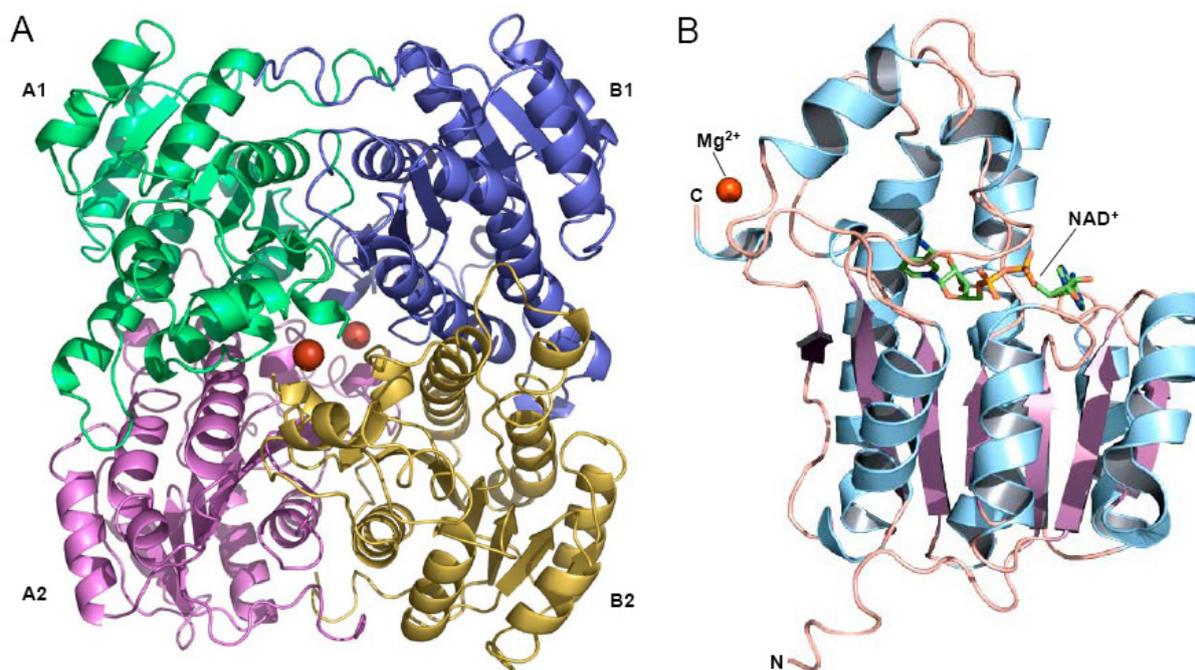


Abbildung 54.: Cartoon-Darstellung des aktiven Tetramers (A) und eines Monomers (B) der Galaktitol-Dehydrogenase. A: Die einzelnen Monomere sind unterschiedlich gefärbt. Die beiden Magnesiumionen, die die Monomere A1 mit B2 sowie B1 mit A2 komplexieren, sind als rote Kugeln dargestellt. B: Das Monomer besteht aus einem sieben-strängigen  $\beta$ -Faltblatt (violett), welches von sieben  $\alpha$ -Helices (hellblau) umgeben ist. Der Cofaktor NAD(H) ist in Stäbchenkonfiguration dargestellt und bindet in einer Tasche oberhalb der Faltblattstränge. Am C-Terminus (C) bindet ein Mg-Ion (rote Kugel). Der N-Terminus (N) liegt frei an der Peripherie des Enzyms. Abbildungen aus Carius, 2009 [24].

Die GatDH wurde gemeinsam mit ihrem Cofaktor NAD<sup>+</sup> kokristallisiert, der in einer tiefen Tasche oberhalb der  $\beta$ -Faltblattstränge bindet (siehe Abbildung 54B). Die Kristallstruktur des Monomers besteht insgesamt aus einem siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatt, welches wiederum auf jeder Seite von drei  $\alpha$ -Helices umgeben ist. Das alternierende Auftreten von Faltblättern und Helices entspricht der für *short-chain*-Dehydrogenasen typischen Rossmann-Faltung (Kavanagh et al., 2008 [104]; Rossmann et al., 1974 [169]; Rao and Rossmann, 1973 [161]).

Die meisten *short-chain*-Dehydrogenasen sind nur als Dimer oder Tetramer aktiv. So ist beispielsweise die Glucose-Dehydrogenase aus *Bacillus megaterium* lediglich als Tetramer aktiv, nicht jedoch in der monomeren Form (Yamamoto et al., 2001 [234]). Auch die Sorbitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* zeigt nur als Dimer Aktivität (Philippsen et al., 2005 [156]; Schauder et al., 1995 [179]).

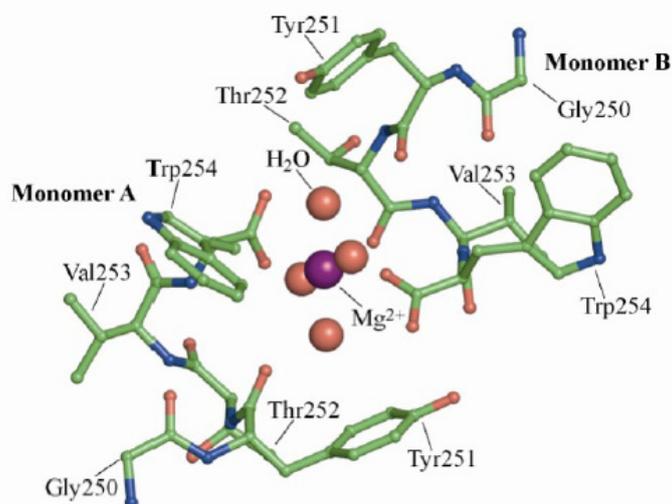


Abbildung 55.: Bindung eines Magnesiumions über die C-Termini zweier diagonal gegenüberliegender Monomere. Es sind die jeweils fünf letzten Aminosäurereste dargestellt, wobei die Kohlenstoff-Atome grün, die Sauerstoff-Atome rot, die Stickstoff-Atome blau und das Magnesiumion violett eingefärbt sind. Das Magnesiumion besitzt eine oktaedrische Koordinationssphäre, die aus vier Wassermolekülen und jeweils einem Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe an beiden C-Termini gebildet wird. Abbildung aus Carius, 2009 [24].

Um den Einfluss der koordinierten Magnesiumionen auf die Struktur und die Aktivität der Galaktitol-Dehydrogenase aufzuklären, wurden in der Variante GatDH251 die letzten drei Aminosäuren (Threonin 252, Valin 253 und Tryptophan 254) am C-Terminus entfernt. Wie die Daten der Kristallstruktur zeigen, sind jene Aminosäuren an der Dimerisierung der diagonalen Monomere (B1 und A2) über die Komplexbildung der Magnesiumionen beteiligt (siehe Abbildung 56A). Durch die Verkürzung sollte die Bindung der  $Mg^{2+}$ -Ionen und folglich die daraus resultierende Dimerisierung nicht mehr möglich sein.

Dagegen könnte jedoch immer noch ein Dimer über die  $\beta$ -Faltblätter (Pfeil) an den C-Termini der benachbarten Monomere (B1 und B2) entstehen (siehe Abbildung 56B). Die verkürzte Variante GatDH251 könnte somit entweder als Monomer und/oder als Dimer vorliegen. Eine Kristallisation der Deletionsvariante sollte grundsätzlich die Abhängigkeit des Faltungsmechanismus und der Aktivität des Enzyms von der Anwesenheit der Metallionen verständlicher machen.

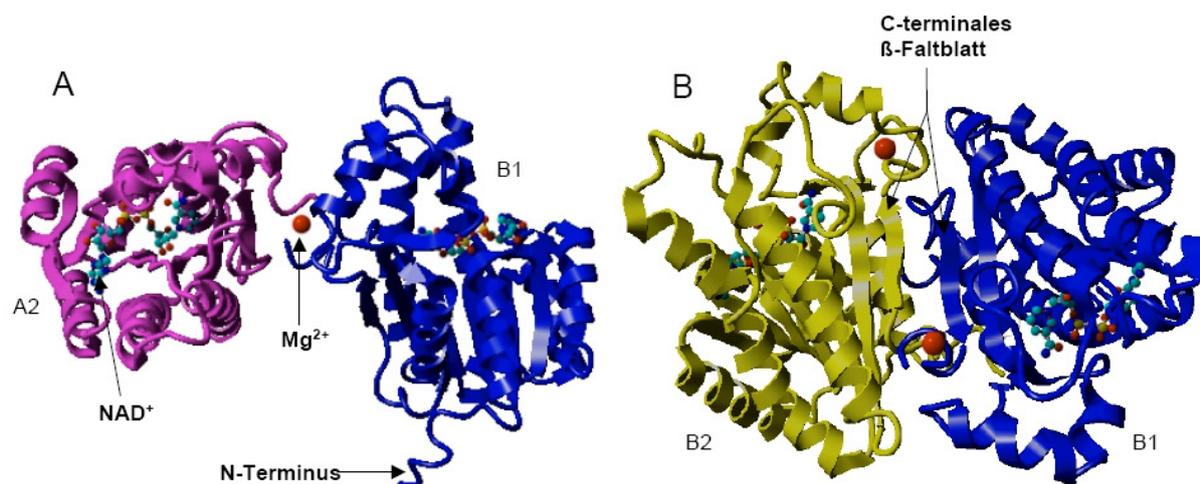


Abbildung 56.: Cartoon-Darstellung der möglichen Dimerstrukturen der Galaktitol-Dehydrogenase. A: Dimerisierung der Monomere B1 und A2 über ein Magnesiumion, welches als rote Kugeln dargestellt ist. B: Eine Dimerisierung kann ebenso über die  $\beta$ -Faltblätter (Pfeil) an den C-Termini benachbarter Monomere (B1 und B2) erfolgen. Die Abbildungen wurden aus den Strukturdaten von Yvonne Carius erstellt.

## 2.1. Einfluss auf die Aktivität der GatDH

Für die um drei Aminosäuren verkürzte GatDH251 konnte keine Aktivität gemessen werden. Jedes Monomer bzw. Enzymuntereinheit verfügt über ein aktives Zentrum, welches sich bei dem in Abbildung 56A dargestellten NAD<sup>+</sup>-Molekül befindet. Die Variante muss somit mindestens über ein aktives Zentrum verfügen. Das native GatDH-Enzym zeigt dagegen auch, wie bereits für andere Enzyme der SDR-Familie beschrieben, nur als Tetramer Aktivität. Obwohl sich die aktiven Zentren des Holoenzym nicht an der Koordinationsstelle der Magnesiumionen befinden, scheinen die Mg<sup>2+</sup>-Ionen dem GatDH-Enzym eine für die Aktivität notwendige Konformation zu verleihen bzw. diese zumindest zu stabilisieren. Die verkürzte Variante, bei der eine Koordination der Magnesiumionen nicht mehr möglich sein sollte, konnte somit keine GatDH-Aktivität aufweisen. Diese Schlussfolgerung wurde dadurch bestätigt, dass bei einer Dialyse der aktiven nativen GatDH gegen Mg-freien Phosphatpuffer ebenfalls die Aktivität stark zurück ging, nach Zugabe von Magnesiumchlorid sich jedoch wieder vollständig herstellen ließ. Die Ergebnisse bestätigen die bereits in der Literatur beschriebene Eigenschaft der GatDH, nur in Anwesenheit bivalenter Kationen aktiv zu sein (Kohring et al., 2003 [110]; Schneider et al., 1995 [188]). Eine weitere *short-chain*-Dehydrogenase für die in der Struktur C-terminale Ionen-Bindungsstellen und eine strikte Abhängigkeit der Aktivität von Magnesiumionen gefunden wurde, ist die R-Alkohol Dehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (Niefind et al., 2000 [143]).

Alternativ die native GatDH komplett ohne Magnesiumionen anzureichern, zu analysieren und somit Erkenntnisse über die Struktur und Funktionsweise zu erhalten, dürfte sich allerdings als ebenso schwierig erweisen. Magnesium-freie Medien und Lösungen lassen sich wegen Verunreinigungen praktisch nicht herstellen. Da sich die Ionen nach einer bereits erfolgten Komplexierung im Enzym wahrscheinlich nicht wieder vollständig entfernen lassen, könnte bei einer so nachgewiesenen Struktur eine vollständige Abwesenheit von Magnesiumionen nicht garantiert werden. Wie schwierig es sich gestaltet die Magnesium-Komplexierung aufzuheben, zeigte ein Experiment, bei dem der Metallionenfänger EDTA in einem molaren Überschuss (bis 10 mM) zu einer GatDH-Enzymlösung gegeben wurde. Im nachfolgenden Aktivitätsassay war praktisch kein Verlust an GatDH-Aktivität zu verzeichnen. Nur durch die bereits erwähnte Dialyse ließ sich die Aktivität verringern, jedoch nicht vollständig aufheben.

## 2.2. Einfluss auf die Struktur der GatDH

Um die möglicherweise über die  $\beta$ -Faltblätter der C-Termini verknüpften Dimere nachzuweisen, wurde die verkürzte Variante GatDH251 angereichert. Bereits bei der Variante ohne His-Tag wurde der größte Anteil des Proteins als *Inclusion bodies* gebildet. Beim Anfügen eines Tags steigerte sich die Rate an unlöslichem Protein sogar auf praktisch 100%. Auch eine Coexpression mit verschiedenen Chaperonen, unterschiedliche Induktionskonzentrationen und eine Verlangsamung des Zellwachstums durch Temperaturerniedrigung konnten den Anteil löslichen Proteins nicht erhöhen. Somit wurden die Varianten mit N-terminalem His-Tag und einem N-terminalen His-Tag mit einer zusätzlicher TEV-Schnittstelle, zum Entfernen des Tags zur Kristallisation der Variante, nicht weiter verwendet. Von einer Rückfaltung der *Inclusion bodies* wurde abgesehen, da aufgrund der grundsätzlich fehlenden Aktivität der Variante eine Überprüfung der korrekten Rückfaltung nicht gewährleistet werden konnte. Zudem konnte Carius 2009 zeigen, dass die Rückfaltung der unmodifizierten GatDH nicht erfolgreich war, da sich für die rückgefalteten Proteine keine Aktivität bestimmen ließ.

Die Proteinvariante neigte grundsätzlich zur Aggregatbildung, wie in der Gelfiltration durch die Elution des Proteins im Ausschlussvolumen der Säule gezeigt wurde. Dies machte den Nachweis von Dimeren unmöglich. Auch bei der nativen PAGE ließ sich die eingeeengte Fraktion nach der Gelfiltration nicht auftrennen, da die Probe nicht in das Gel einwanderte, sondern bereits in der Tasche hängen blieb. Eine Größenbestimmung durch die Gelfiltration oder native PAGE, wie sie sich normalerweise für globuläre Proteine durchführen lässt, war somit für die GatDH251 nicht möglich. Durch den Ver-

gleich der bei der MALDI-Analyse erhaltenen Fingerprints der einzelnen Proben mit dem *in silico* verdauten GatDH251-Protein konnten der Rohextrakt, die Probe nach der AAC und nach der Gelfiltration als GatDH identifiziert werden. Bei insgesamt allen MALDI-Analysen des GatDH-Proteins in dieser Arbeit wurde der dem C-Terminus zugeordnete Massenpeak nur ein einziges Mal gefunden und zwar in der Probe nach der AAC. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Peptidfragment des C-Terminus im MALDI-Flugzeitanalysator grundsätzlich nicht gut fliegt und daher nicht detektiert werden kann. Bei den nicht-verkürzten Varianten könnte eine Erklärung für diese Beobachtung sein, dass ein Magnesiumion immer noch über die C-Termini zweier Monomere komplexiert war.

Die veränderte Aminosäure-Sequenz am C-Terminus und die dadurch fehlende Komplexierung der Magnesiumionen könnte bewirkt haben, dass bei der verkürzten Variante bestimmte Domänenbereiche an der Oberfläche des Proteins als Interaktionsflächen für die Zusammenlagerung weiterer Untereinheiten zur Verfügung standen, die bei der Tetramerstruktur im Innern geschützt liegen. Dadurch könnte ein relativ großes Proteinaggregat entstanden sein, was auch die Tendenz der Variante, zum Beispiel beim Einengen der Probe schnell auszufallen, erklären könnte. Ein weiterer Hinweis für diese Interpretation lieferte die Betrachtung der Probe unter dem Mikroskop, bei der sich Proteinaggregate mit einer Größe von durchschnittlich  $0,3 \mu\text{m}$  erkennen ließen. Da sich die verkürzte Variante in den Experimenten grundsätzlich nicht wie ein globuläres Protein verhielt, wurde das Molekulargewicht nicht berechnet. Die erwartete Dimerstruktur oder auch Monomere der verkürzten Varianten konnten nicht nachgewiesen werden. Die Aggregatbildung ist wahrscheinlich auch der Grund dafür, dass bisher keine Kristalle für die Strukturaufklärung der GatDH251-Variante erhalten wurden.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse lassen insgesamt darauf schließen, dass die beiden in der Kristallstruktur komplexierten  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen sowohl die Tertiärstruktur des Enzyms stabilisieren, als auch der GatDH die für die Aktivität notwendige Konformation verleihen. Die funktionale Tertiärstruktur der GatDH besteht aus einer Dimerisierung zweier Dimere. Es bestünde die Möglichkeit, dass zur Bildung der aktiven Konformation zunächst die Dimerbildung der diagonal gegenüberliegenden Untereinheiten erfolgen muss, bevor die antiparallel ausgerichteten, benachbarten Monomere über das  $\beta$ -Faltblatt in einer zweiten Dimerisierung stabilisiert werden. Dies könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum für sich für die verkürzte Variante kein Dimer nachweisen ließ, obwohl eine Dimerfusion über die C-terminalen Faltblätter weiter-

hin möglich gewesen sein sollte. Anhand der durchgeführten Experimente ließ sich nicht abschließend klären, ob die Magnesium-Komplexierung für die funktionale Bildung der Tertiärstruktur unbedingt notwendig ist, oder diese nur stabilisiert. Da die vorletzten drei Aminosäuren Y251, T252 und V253 des C-Terminus eine  $\pi$ -Helix bilden (Carius, 2009 [24]), könnte die Deletion zweier dieser Aminosäuren bei der verkürzten Variante GatDH251 zusätzlich zur Destabilisierung der Tetramerstruktur beigetragen haben. Um die Koordination der Magnesiumionen genauer zu untersuchen, könnte der C-Terminus nach und nach um einzelne Aminosäuren verkürzt werden, anstatt alle drei Aminosäuren auf einmal zu entfernen. So könnte ermittelt werden, welche der Aminosäuren des C-Terminus genau für die Komplexierung der Magnesiumionen verantwortlich sind. Die Deletion nur einer oder zweier Aminosäuren könnte zudem die Konformation der Variante weniger beeinflussen, die Stabilität des Proteins erhöhen und somit auch die Anreicherung erleichtern.

### 2.3. Inhibitor-Studie für die nicht-verkürzte GatDH

Von Yvonne Carius (Carius, 2009 [24]) wurden bereits Kristallisationsversuche mit verschiedenen putativen Inhibitorsubstanzen für die GatDH durchgeführt. Allerdings handelte es sich bei den getesteten Substanzen nur um eher schwach bindende Inhibitoren, für die zudem keine Aussage über einen kompetitiv hemmenden Effekt getroffen werden konnte.

In dieser Arbeit konnte dagegen eine kompetitive Hemmung von über 80% für die potenzielle Inhibitorsubstanz 1-Hexanol auf die Aktivität der GatDH im Oxidationsassay nachgewiesen werden. Der Vorteil einer Cokristallisation mit einem Inhibitor anstatt mit einem Substrat besteht darin, dass der Inhibitor-Protein-Komplex aufgrund der fehlenden Katalyse vermutlich stabiler ist, als ein potenzielles Gemisch aus Edukt und Produkt bei der Substratumsetzung. Grundsätzlich wäre eine genaue Kenntnis des Reaktionsmechanismus der GatDH für eine gerichtete Enzymevolution hinsichtlich biotechnologischer Anwendungen interessant.

## 3. Gerichtete Modifizierung des GatDH-Enzyms

In der chemischen Industrie steigt der Bedarf an enzymatisch katalysierten Produktionsprozessen immer weiter an. Die Anzahl bedeutender Biotransformationen erhöhte sich dabei in den letzten Jahrzehnten bis zum Jahr 2002 auf über 130 (Straathof et al., 2002 [205]) und der weltweite Marktwert an industriellen Enzymen lag bereits im Jahr 2000 bei 1,5 Milliarden US-Dollar (McCoy, 2000 [131]). In einer Marktstudie wur-

de für das Jahr 2010 ein Anteil von 20% an der Herstellung von Chemieprodukten für die biotechnologische Produktion in einer Größenordnung von rund 310 Mrd. US-Dollar vorausgesagt (Festel et al., 2004 [41]). In der grünen und weißen Biotechnologie wird auf nachhaltige und umweltverträgliche biochemische Reaktionsschritte gesetzt. Die enzymatischen Synthesen bieten gegenüber den chemischen Katalysen Vorteile bezüglich ihrer hohen Stereo- und Enantioselektivität (Anastas and Kirchhoff, 2002 [5]). Da kommerziell erhältliche Enzyme allerdings oft in ihrer Langzeitstabilität unter den gegebenen Reaktionsbedingungen limitiert sind, fehlende Aktivität in organischen Lösungsmitteln zeigen oder nur ein begrenztes Substratspektrum besitzen, gibt es einen konstanten Bedarf nach neuen Biokatalysatoren zu *screenen* oder eine Proteinevolution bekannter Enzyme durchzuführen (Arnold and Moore, 1997 [9]; Hummel, 1997 [81]).

Die zu der Enzymklasse der Oxidoreduktasen gehörenden Dehydrogenasen stellen aufgrund ihrer hohen Regiospezifität und Enantioselektivität bei der Oxidation von Hydroxylgruppen bzw. Reduktion von Ketonverbindungen eine besonders interessante Enzymfamilie für die Produktion von Feinchemikalien und reaktiven *building blocks* für die pharmazeutische und agrochemische Industrie dar. Der Einsatz von Dehydrogenase in der industriellen Produktion, beim Design von Biosensoren und in der Konstruktion biologischer Brennstoffzellen hat in den letzten Jahren daher stark an Bedeutung zugenommen. Für katalytische Umsätze werden allerdings die für die Dehydrogenasen notwendigen Cofaktoren benötigt, die einen hohen Kostenfaktor für die Biotransformation darstellen. Daher muss ein geeignetes Regenerierungssystem für das Cosubstrat in den Produktionsprozess integriert werden.

Die Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) ist aufgrund ihres relativ breiten Substratspektrums in der Lage eine Vielzahl von Polyolen zu oxidieren bzw. prochirale Verbindungen stereoselektiv zu reduzieren. Daher ist das Enzym beispielsweise für eine asymmetrische Synthese enantiomerenreiner Dirole interessant, wobei bei kurzkettigen Diolen bevorzugt die S-Konfiguration gebildet wird. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit die GatDH zum Anreichern des R-Enantiomers aus racemischen Gemischen zu verwenden, in dem lediglich das S-Enantiomer stereoselektiv oxidiert wird (Kohring et al., 2003 [110]).

Im Rahmen des *Seventh Framework Programme* des EU-Projektes ERUDES: *Development of Electrochemical Reactor Using Dehydrogenases for Enantiopure Synthon Preparations* sollte die GatDH in einer Weise modifiziert werden, um diese für

präparative Anwendungen an mesostrukturierte Oberflächen binden zu können. Um die präparative Effizienz des Katalysatorsystems zu optimieren, müssen möglichst alle an dem Reaktionsmechanismus beteiligten Moleküle, das Enzym, das Cosubstrat und die Mediatoren, als Monoschicht auf einer Goldelektrode immobilisiert werden, wobei der Cofaktor elektrochemisch regeneriert wird. Dabei sollte das Enzym so an die Oberfläche adsorbiert werden, dass seine katalytische Aktivität nicht beeinträchtigt wird. Nach diesem Prinzip könnte ein elektroenzymatischer Mikroreaktor aufgebaut werden, der eine enzymatische Synthonsynthese unter elektrochemischem Cofaktor Recycling im Durchflussbetrieb darstellt. In dieser Arbeit wurde die GatDH derart modifiziert, dass diese selbständig und gerichtet, ohne Verwendung von Linkermolekülen, an eine Goldoberfläche adsorbiert (siehe Abbildung 57).

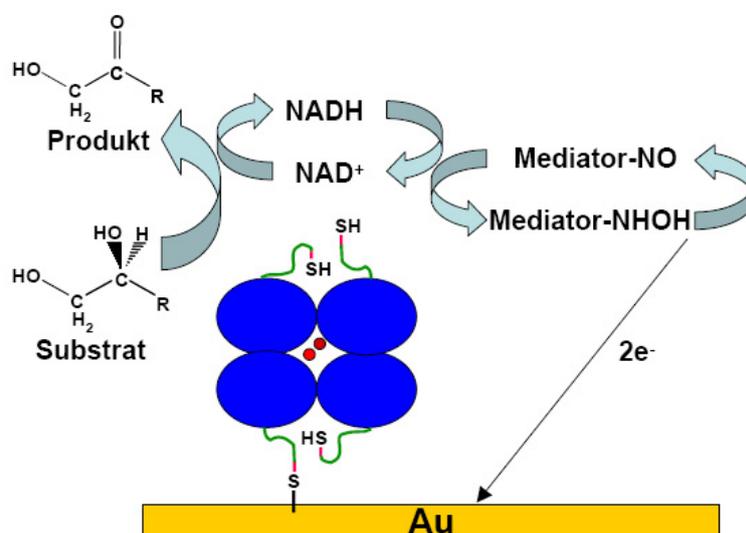


Abbildung 57.: Schematisches Prinzip der Immobilisierung der cysteinmodifizierten GatDH mit elektrochemischer Cosubstrat Regenerierung. Dargestellt ist die Oxidation eines Substrates unter gleichzeitiger Regenerierung des reduzierten Cofaktors NAD(H) über einen Mediator an einer Goldoberfläche. Das über zwei Magnesiumionen komplexierte Homotetramer der GatDH verfügt pro Unter-einheit über die angefügten Modifizierungen.

Der Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode erfolgt meist nicht auf direktem Wege, sondern wird durch die Mediator-Moleküle vermittelt. Diese sorgen zudem für einen niedrigeren Potentialbereich und können dadurch eine mögliche Überspannung verhindern. Voraussetzung für die Messung eines elektrischen Signals, z.B. eines Stromanstiegs, ist die katalytische Substratumsetzung durch das immobilisierte Enzym. Dabei kann, wie bei dem in dieser Arbeit verwendeten System, das reduzierte Cosubstrat NADH über Calciumbrücken an den Mediator binden, seine Elektronen an diesen abgeben und so regeneriert werden. Der reduzierte, in diesem Ansatz in Lösung befindliche Mediator diffundiert zur Elektrodenoberfläche und wird durch die

dortige Abgabe der Elektronen wieder reoxidiert. Die enzymatische Reaktion lässt sich also indirekt über die elektrochemische Regenerierung des Cofaktors in Form eines irreversiblen Oxidationspeak in einem Cyclovoltamogramm beobachten.

### 3.1. Anreicherung über einen Histidin-Tag

Zur einfachen und schnellen Anreicherung wurde die GatDH zunächst mit einem His-Tag versehen. Die GatDH gehört zu der Enzymfamilie der *short-chain*-Dehydrogenasen und besitzt am N-Terminus das für diesen Dehydrogenase-Typ charakteristische NAD-Bindemotiv GXXXGXG (Jornvall et al., 1995 [94]). Der N-Terminus erschien daher zunächst für das Anfügen des Tags als ungeeignet. Da jedoch die Kristallstruktur der GatDH zur Verfügung stand (Carius und Scheidig, Publikation in Vorbereitung) wurde deutlich, dass der N-Terminus an der Oberfläche des Proteins lokalisiert ist, wohingegen der C-Terminus an der Konformation der Tertiärstruktur des Enzyms massgeblich beteiligt zu sein scheint (siehe Abbildungen 54 und 56).

Das C-terminal His(6)-getagte Protein resultierte dem entsprechend in einer inaktiven Enzymvariante. Es kann davon ausgegangen werden, dass die zusätzlichen Aminosäuren die Dimerisierung über den  $\beta$ -Faltblattstrang am C-Terminus beeinträchtigen, beziehungsweise die stabilisierenden Wechselwirkungen der  $\pi$ -Helix stören. Möglicherweise wird durch Anfügen des Tags auch die Koordinierung der Magnesiumionen beeinflusst. Die sechs Histidine könnten dabei die Magnesiumionen aufgrund ihrer hohen Affinität für zweiwertige Metallionen abfangen. Diese ständen dann für die Stabilisierung der Tetramerstruktur des Enzyms nicht mehr zur Verfügung. Bereits von Jäkel 1994 konnte gezeigt werden, dass sich ohne verfügbare Magnesiumionen keine GatDH-Aktivität messen lässt.

Dagegen zeigte die Variante mit N-terminalem His-Tag im Rohextrakt eine hohe GatDH-Gesamtaktivität (ca. 1200 Units pro 250 ml Kultur) und ließ sich über den Tag mit einer guten Effizienz aufreinigen. Die Variante konnte somit in wesentlich größeren Mengen als im nativen Organismus *Rhodobacter sphaeroides* D exprimiert und mit einer höheren spezifischen Aktivität ( $\sim 15$  U/mg gegenüber 5,2 U/mg) sowie einer besseren Ausbeute (über 80% gegenüber 36%) angereichert werden (Schneider et al., 1995 [188]). Bei einer Verringerung des immer noch relativ hohen Anteils an gebildeten *Inclusion bodies* und gleichzeitiger Erhöhung des Anteils an löslichen Proteins, ließe sich die Ausbeute der NHis-Variante sogar noch weiter steigern. Auch im Vergleich zur Anreicherung der unmodifizierten, heterolog exprimierten GatDH ließ sich durch

die His-Tag Anreicherung eine höhere Ausbeute erzielen (nGatDH: ~50% Ausbeute). Für die unmodifizierte GatDH wurde allerdings innerhalb der Arbeitsgruppe eine höhere spezifische Aktivität von 19 U/mg erreicht. Dagegen wurde in dieser Arbeit bei der Anreicherung der unmodifizierten Variante jedoch nur ein Wert von etwa 13 U/mg ermittelt.

Bei der Anzucht der rekombinanten Zellen wurde die Expression der Enzymvariante bei einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 statt bei einer  $OD_{600} = 1$  mit IPTG induziert. Durch die etwas frühere Induktion konnte die Gesamtaktivität im Rohextrakt bis zu 30% gesteigert werden. Bei der HisTrap-Chromatographie wurden jedoch geringe Enzymverluste erhalten. Wegen der Metallionen-Abhängigkeit des aktiven GatDH-Enzyms und der im magnesiumfreien Puffer vorliegenden Probe, könnten die Magnesiumbindstellen der C-Termini mit den  $Ni^{2+}$ -Ionen der Säule besetzt werden. Dadurch könnte ein Teil des Enzyms irreversibel an der Säule hängen bleiben. Darüberhinaus zeigte die GatDH die Tendenz im Elutionspuffer der HisTrap-Anreicherung zunehmend mit der Inkubationsdauer an Aktivität zu verlieren. Dieses Problem konnte durch eine zügige Weiterverarbeitung der Probe in Form einer Umpufferung gelöst werden. Doch auch bei der Umpufferung wurden zunächst große Enzymverluste erhalten, da die GatDH beim Übergang von dem sehr salzhaltigen Elutionspuffer (0,5 M Imidazol) in den normalen Arbeitspuffer (20 mM BisTris, 1 mM  $MgCl_2$ ) ausfiel. Diese Verluste ließen sich wiederum durch eine Erhöhung der Ionenstärke im Arbeitspuffer (100 mM BisTris, 100 mM NaCl, 1 mM  $MgCl_2$ ) minimieren. Ebenso wie Imidazol dissoziiert Kochsalz (NaCl) sehr stark. Möglicherweise erfährt das Protein unter diesen Bedingungen eine leichte Konformationsänderung. Die Tendenz der GatDH auszufallen, lässt sich aber vermutlich auf eine veränderte Hydrathülle bzw. Ladung des Proteins in der hochkonzentrierten Salzlösung zurückführen. Das Enzym zeigt normalerweise eine negative Ladung auf seiner Oberfläche, wodurch sich die einzelnen Moleküle abstoßen. Durch den hohen Ionenanteil im Imidazolpuffer verändert sich vermutlich die Ladung des Proteins so, dass sie sich seinem  $pI$  annähert. In diesem Zustand können sich die Moleküle nicht mehr abstoßen und es kommt zu einem Ausfallen der Proteine, wenn die Ionen durch den Pufferwechsel wieder entfernt werden. Das NaCl im an diese Situation angepassten Arbeitspuffer kann das Imidazol beim Umpuffern ersetzen und das Enzym so stabilisieren. Da das GatDH-Enzym jedoch grundsätzlich in salzfreiem BisTris-Puffer aktiv und stabil ist, sollte es möglich sein, wiederum in diesen Puffer durch einen zweiten Pufferwechsel umzupuffern. Für die native unmodifizierte GatDH wurde in vorherigen Arbeiten (Schneider et al., 1995 [188]; Jäkel, 1994 [88]) ein  $pI$  von 4,2 bestimmt. Anhand verschiedener Software-Programme wurde für das Enzym in

dieser Arbeit jedoch ein um fast einen pH-Wert höherer pI von 5,1 errechnet. In gleicher Weise wurde für die modifizierten Varianten ein im Vergleich zur nativen GatDH veränderter pI von 5,9 bestimmt, der durch eine isoelektrische Fokussierung bei einem pI von etwa 6 bestätigt werden konnte.

### 3.2. Immobilisierung über einen Cystein-Tag

Der Cystein-Tag zur gerichteten Immobilisierung der GatDH auf einer polykristallinen Goldoberfläche wurde als Verlängerung des His-Tags ebenfalls an den N-Terminus angefügt. Die Adsorption der Variante beruht dabei auf einer natürlichen Affinität zwischen Schwefelverbindungen wie Thiolen oder Disulfiden und Metalloberflächen, wobei besonders oft Gold für elektrochemische Anwendungen verwendet wird (Zhou et al., 1999 [241]). Zwei Aminosäuren verfügen über ein Schwefelatom in ihrer unpolaren Seitenkette, Methionin und Cystein. Da beim Methionin eine weitere Methylgruppe an das Schwefelatom gebunden ist, beim Cystein der Schwefel dagegen als Thiolgruppe (-SH) vorliegt, wurde Cystein statt Methionin für den Affinitäts-Tag verwendet. Zudem wurden in der Literatur bereits Cystein-modifizierte Goldelektroden beschrieben (Wu et al., 1999 [233]), die eine stabile Gold-Schwefel-Bindung zwischen den Thiolgruppen der Cystein-Moleküle und der Goldoberfläche zeigten (Meng et al., 2001 [133]). Um eine kovalente Bindung der GatDH an das Gold zu gewährleisten, dabei aber gleichzeitig die katalytische Aktivität des Enzyms möglichst wenig zu beeinträchtigen, wurden Varianten mit verschiedenen langen Cystein-Tags (2 bis 5 Cysteine) hergestellt. Alle Varianten zeigten GatDH-Aktivität, jedoch verminderte sich die Expressionsrate und damit auch die Aktivität des Enzyms, je mehr Aminosäuren zusätzlich an den bereits etablierten His-Tag angefügt wurden. Durch die eingebauten Cysteine könnten neue mögliche Disulfidbrücken innerhalb der Proteinstruktur gebildet werden und damit die Expressionsrate herab und gleichzeitig die Aggregationsneigung herauf setzen. Bei einer Addition von bis zu drei Cysteinen konnte die oxidative Aktivität des GatDH-Enzyms in Lösung allerdings noch aufrecht erhalten werden. Das Enzym mit zwei Cysteinen (2Cys-GatDH) stellte schließlich die beste Variante für die Immobilisierungsexperimente dar. Alternativ könnte noch eine Variante mit lediglich einem Cystein pro Untereinheit kloniert werden, um zu testen, ob dieses für die kovalente Adsorption ausreicht und dabei noch weniger Aktivität im Vergleich zur 2Cys-Variante einbüßt. In einer aktuellen Arbeit wird dieser Ansatz mit einer Sorbitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* getestet, die nach dem Vorbild dieser Arbeit mit den verschiedenen Tags modifiziert wurde.

Anhand der SPR-Messung ließ sich zeigen, dass die GatDH an der Goldoberfläche der Elektrode selbständig haften blieb, da nach Zugabe des Enzyms trotz mehrstündigem Spülen der Durchflusszelle der Resonanzwinkel auf gleichem Niveau blieb und sich nicht wieder verringerte. Durch die kovalente Immobilisierung an die Goldoberfläche könnte das Enzym eine Konformationsänderung erfahren oder aufgrund einer ungünstigen Orientierung des aktiven Zentrums keine Aktivität vorhanden sein. Die katalytische Aktivität des gebundenen Enzyms konnte jedoch durch die cyclischen Voltammetriemessungen indirekt nachgewiesen werden. Auch hier wurde die Elektrode zunächst sorgfältig gespült, um nicht gebundenes Enzym zu entfernen. In den CVs ließ sich nach einer vorherigen Vorpolarisierung, die zur Erhöhung der Anzahl genügt vorhandener Mediator-Moleküle notwendig war, der charakteristische irreversible Oxidationspeak der Cofaktor Regenerierung nachweisen. Grundbedingung für diesen Stromanstieg war die enzymatische Oxidation des Substrates 1,2-Hexandiol, wobei das über Wasserstoffbrücken mit dem Enzym interagierende Cosubstrat gleichzeitig aufgrund des Reaktionsgleichgewichts reduziert wurde. Das NADH kann über die im Puffer vorhandenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen elektrostatisch an die aktivierten CTFM-Mediator-Moleküle binden, seine Elektronen an diese abgeben und somit regeneriert werden. Die reduzierten Mediator-Moleküle werden wiederum an der Elektrodenoberfläche recycelt, was sich in dem messbaren Stromanstieg zeigt. Durch die verwendeten Methoden konnte jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, über welche und über wie viele Cysteinreste bzw. Untereinheiten das modifizierte GatDH-Protein an die Goldoberfläche adsorbiert. Da die GatDH mit jeweils zwei Cysteinen pro Unterheit ausgestattet wurde und in aktiver Konformation als Homotramer vorliegt, stehen theoretisch acht Thiolgruppen für die Immobilisierung zur Verfügung. Bei Betrachtung der Kristallstruktur und der Orientierung der flexiblen N-Termini kommen prinzipiell zwei Möglichkeiten in Frage, wobei nur eine als wahrscheinliche Alternative erscheint (siehe Abbildung 58A).

Bei der Kristallisation erwies sich der N-terminale Tag aufgrund seiner Flexibilität als störend. Daher wurde das Enzym ohne den Tag kristallisiert. In dem Bändermodell der GatDH-Struktur wurde die erste Aminosäure Methionin (rot) als *Balls and Sticks* dargestellt, um trotzdem auf die ungefähre Position der jeweiligen Cysteine der modifizierten Variante rückschließen zu können. Eine Adsorption über die benachbarten Monomere A1/B1 oder A2/B2 lässt sich gegenüber der Immobilisierung über die diagonal verbundenen Monomere A1/B2 bzw. B1/A2 favorisieren, da letztere aufgrund der Konformation des Tetramers als sterisch ungünstiger erscheint (siehe Abbildung 58B). Durch die in der Abbildung dargestellte Lokalisation der N-Termini lässt sich ver-

muten, dass die 2Cys-GatDH über zwei Untereinheiten an die Goldoberfläche bindet. Anhand der Experimente ließ jedoch nur bestätigen, dass das Enzym mindestens über ein Monomer kovalent adsorbiert.

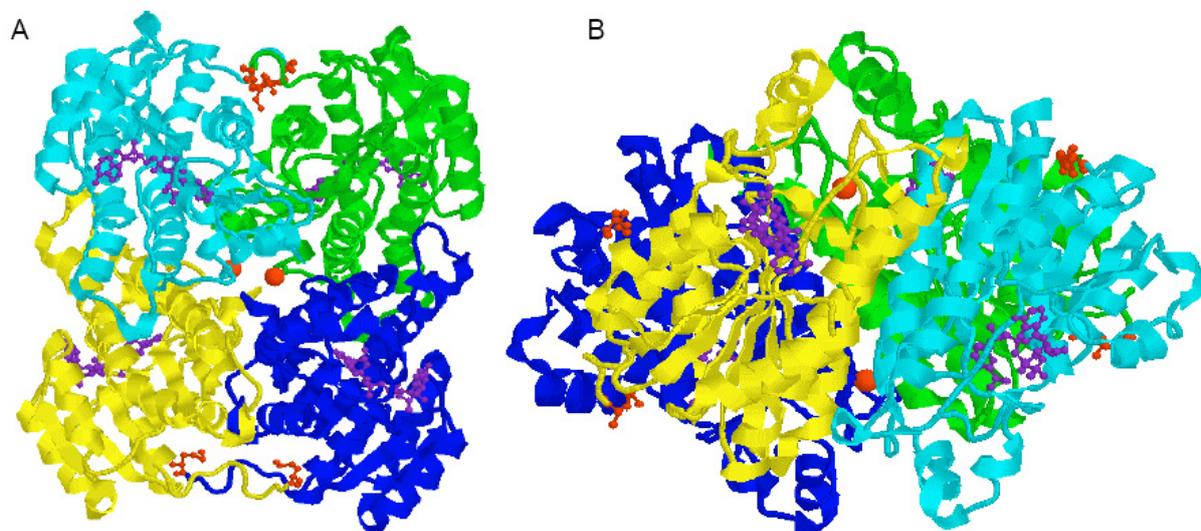


Abbildung 58.: Cartoon-Darstellung der möglichen Bindungsalternativen der immobilisierten, cysteinmodifizierten GatDH. Die komplexierten Magnesiumionen sind als rote Kugeln dargestellt. Die Cosubstrate NAD(H) sind lila, die erste Aminosäure Methionin des unmodifiziert kristallisierten N-Terminus ist jeweils rot im *Balls and Sticks*-Modell zu sehen. A: Immobilisierung über die benachbarten Monomere A1 und B1 oder A2 und B2. B: Immobilisierung über die diagonal über die Mg-Ionen koordinierten Monomere A1 und B2 oder B1 und A2. Die Abbildungen wurden aus den Strukturdaten von Yvonne Carius erstellt.

Die mit Cysteinen modifizierte GatDH-Variante stellt eine erfolgreiche und neuartige Methode zur gerichteten Enzymimmobilisierung an Goldelektroden dar, die in dieser Form bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Der Cystein-Tag ermöglicht dabei eine selbständige, gerichtete und kovalente Adsorption, ohne dabei weitere Linkermoleküle zu benötigen. In bereits bekannten Systemen ist dagegen eine vorherige Modifikation der Metalloberflächen mit einer sogenannten *self-assembled monolayer* (SAM) notwendig, um die gewünschten Biomoleküle an die Elektrode zu binden (Mano et al., 2001 [129]; Zimmermann et al., 2000 [243]; Mano and Kuhn, 1999 [127]; Song et al., 1993 [198]). Im Allgemeinen basieren diese Immobilisierungstechniken entweder auf einer Adsorption bzw. kovalenten Immobilisierung angereicherter Proteine auf chemisch aktivierten Oberflächen oder der Expression eines Proteins mit einem Fusionspolypeptid, welches die Immobilisierung an eine entsprechend derivatisierte Oberfläche vermittelt (Kindermann et al., 2003 [109]). Eine Expression rekombinanter Proteine mit einem Oligohistidin-Tag an einem ihrer Termini stellt eine gebräuchliche Methode zur schnellen Anreicherung eines Proteins über eine Metallionen-Affinitäts-

chromatographie in einem einzigen Schritt dar. Die Histidine ermöglichen darüber hinaus in Gegenwart von  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen eine Immobilisierung über eine reversible Chelatbindung des Proteins an einen NTA (N-Nitrilotriessigsäure)-Liganden, der an der Oberfläche einer Biosensor-Durchflusszelle gebunden vorliegt (Gershon and Khilko, 1995 [54]). Doch auch diese Modifizierung bedingt eine vorherige Funktionalisierung der Elektrodenoberfläche mittels eines Thiols. Das konventionelle NTA/His-Tag Chelatsystem wurde daher zu selbständig adsorbierenden, mehrwertigen Thiol-Chelator-Chips weiter entwickelt, um die Langzeitstabilität und einheitliche Orientierung der immobilisierten His-getagten Proteine zu ermöglichen (Tinazli et al., 2005 [218]). Diese Methode hat jedoch den Nachteil, dass für die Immobilisierung mehrere Modifizierungsschritte der Elektrodenoberfläche notwendig sind, die die katalytische Aktivität der Enzyme negativ beeinflussen können. Außerdem ist die Bindung der Proteine reversibel und lässt sich durch einen niedrigen pH-Wert oder durch die Zugabe von Imidazol oder EDTA wieder aufheben.

Alternative Methoden zur Immobilisierung der GatDH, wie über eine Quervernetzung mit Glutardialdehyd oder den Einschluss über eine Nafionmembran, die bereits in der Arbeit von Gajdzik 2007 beschrieben wurden, konnten sich dagegen nicht durchsetzen. So zeigten die mit Glutardialdehyd und BSA modifizierten Elektroden keine gute Reproduzierbarkeit. Zudem wurde die katalytische Aktivität des Enzyms selbst bei niedrigsten GA-Konzentrationen, wie sie bei Gajdzik et al. 2007 zur Immobilisierung der SDH verwendet wurden, fast vollständig inhibiert. Grundsätzlich lassen sich Elemente auch durch Einschluss in eine Nafionmembran auf eine Elektrodenoberfläche fixieren. Die Elektroden werden dazu mit einer 2,5%igen Nafionlösung durch ein Air-Brush-Verfahren besprüht. Nafion (Firma DuPont) ist ein sogenanntes Ionomer und besteht aus einem sulfonierten Tetrafluorethylen-Polymer (PTFE). Über anionische Säuregruppen kann es als Membranmaterial Protonen leiten. Obwohl derartig beschichtete Elektroden sich als relativ stabil erwiesen, besteht der Nachteil dieser Methoden jedoch darin, dass die Enzyme nicht gerichtet an die Elektrode fixiert werden können.

Die Integration der GatDH über den Cystein-Tag in eine Art Vorstufe eines Minireaktorsystems repräsentiert ein *proof of concept* für die Entwicklung elektrochemischer Reaktoren zur Erzeugung enantiomerenreiner Feinchemikalien als *building blocks* für pharmazeutische und agrochemische Produkte. Im bisher etablierten System war jedoch eine Coimmobilisierung aller an der Reaktion beteiligter Komponenten noch nicht möglich. Der verwendete Mediator CTFM besitzt aufgrund vorhandener Cyano-

Gruppen zwar eine eigene Affinität zur Goldoberfläche, eine Coimmobilisierung könnte aber aufgrund sterischer Effekte, wegen des im Vergleich viel größeren Enzyms, verhindert werden. Der reduzierte Mediator kann somit zwar noch in die Nähe der Elektrodenoberfläche gelangen und seine Elektronen abgeben, nicht jedoch selber an die Oberfläche adsorbieren. Eine weitere Erklärung dafür, dass bei einer versuchten Coimmobilisierung kein Stromanstieg mehr gemessen werden konnte, wäre, dass zwar beide Moleküle an die Elektrode adsorbieren, das Enzym mit seinem an den Mediator gebundenen Cosubstrat  $\text{NAD}^+$  aber aufgrund ungünstiger Abstände und einer fehlenden Mobilität nicht mehr interagieren kann. Um dieses Problem zu lösen, könnte ein anderer Mediator verwendet werden, der in diesem System womöglich besser für eine Coimmobilisierung geeignet ist. Die entsprechenden Moleküle könnten aber auch über Linkermoleküle an die Elektrode gebunden werden, wodurch sich eine günstigere Flexibilität der Moleküle für eine Enzym-Cosubstrat-Interaktion gewährleisten ließe. In einem coimmobilisierten System sollte der Mediator aufgrund einer vorher notwendigen Aktivierung der Moleküle unter relativ hohen Spannungsverhältnissen zuerst adsorbiert werden. Dabei müsste außerdem eine Kontrolle darüber möglich sein, in welchem Abstand und Verhältnis die Enzym- und Mediator-Moleküle zueinander immobilisiert werden. Desweiteren war im Rahmen dieser Arbeit bisher nur die elektrochemische Reoxidierung des reduzierten Cosubstrates  $\text{NADH}$  möglich. Die Etablierung der elektrochemischen Regenerierung des für die Reduktionsreaktion benötigten Cofaktors  $\text{NADH}$  wäre für eine enantioselektive Reduktion prochiraler Ketone für die Herstellung desoxygener Zucker und optisch reiner Alkoholverbindungen interessant. Aktuell wird daran gearbeitet einen passenden Mediator für den Reduktionsansatz zu finden. An einen solchen Mediator werden jedoch, aufgrund der Schwierigkeit eine direkte Reduktion des Cofaktors zu erhalten, verschiedene Anforderungen gestellt. So müsste ein solcher Mediator ein Hydridion oder zwei Elektronen in einem Schritt auf den Cofaktor übertragen und seine elektrochemische Aktivierung müsste bei weniger negativen Potentialen als  $-0,9\text{ V}$  gegen eine gesättigte Kalomelektrode erfolgen, um eine Dimerbildung zu vermeiden (Steckhan, 1994 [199]). Der Elektronen- bzw. Hydridionentransfer sollte zudem nur an das  $\text{NAD}^+$  und nicht an das Substrat erfolgen und nur das enzymatisch aktive  $1,4\text{-NADH}_2$  gebildet werden. Als Mediatoren dieser Art wurden beispielsweise verschiedene Rhodium-Komplexe beschrieben, deren Anwendbarkeit sich für die elektrochemische Regenerierung von  $\text{NADH}_2$  bereits bewährte (Beley and Collin, 1993 [14]).

Für eine optimierte Funktionsweise der GatDH in dem elektroenzymatischen Reaktor ist ein weiteres *Engineering* des Enzyms notwendig. Im vorgestellten Ansatz war das

adsorbierte Enzym noch mehrere Tage lang stabil und zeigte nur einen geringfügigen Aktivitätsverlust. Der Nachweis des Reaktionsproduktes war allerdings aufgrund der noch zu niedrigen Umsatzrate noch nicht möglich. Nicht nur die Langzeitstabilität ansich, sondern auch eine grundsätzliche Anpassung des Enzyms an die vorherrschenden Reaktionsbedingungen könnte weiterhin zur einer gesteigerten Effizienz des Systems beitragen. Daher wird in einer Diplomarbeit zur Zeit versucht die Stabilität der GatDH zu verbessern. Durch rationales Proteindesign könnten anhand der bekannten Kristallstruktur noch weitere Verbesserungen des Proteins vorgenommen werden. Zum Beispiel könnte durch einen Austausch von bestimmten Aminosäuren gegen Methionine an gezielter Position eine noch optimalere Bindung des Enzyms bezüglich eines freien Zugangs des aktiven Zentrums erreicht werden.

Die hier erzielten Ergebnisse lassen es möglich erscheinen einen elektroenzymatischen Reaktor zur enantiomerenreinen Feinchemikaliensynthese zu konstruieren, der prochirale Ketone in chirale Alkohole umsetzt (siehe Abbildung 59). Durch hintereinanderschalten mehrerer Module mit unterschiedlichen Enzymen werden auch mehrstufige Synthesen denkbar.

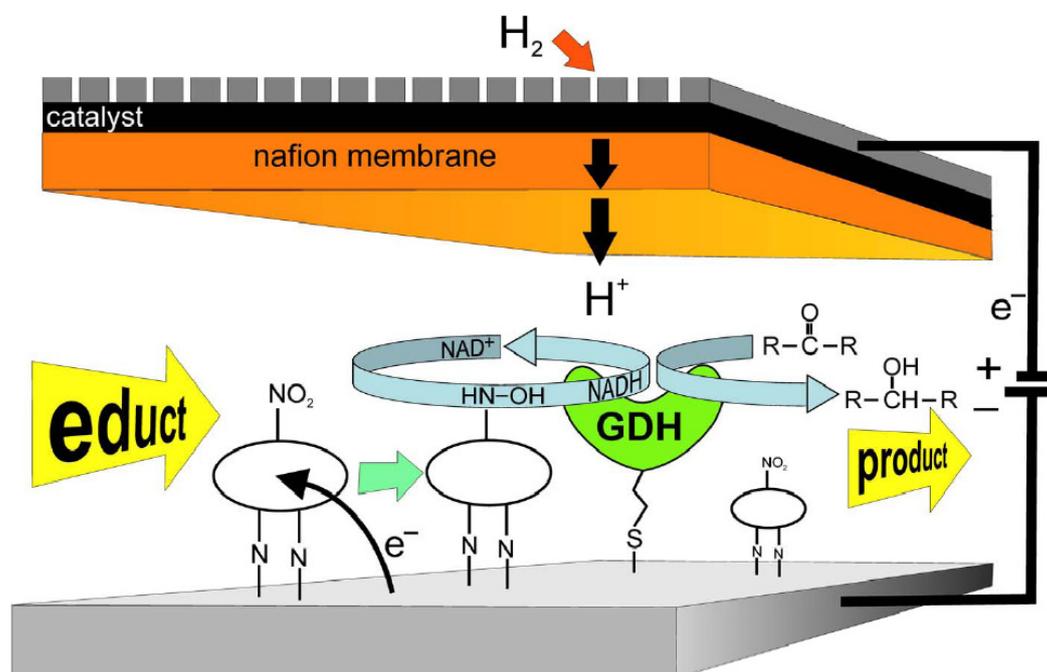


Abbildung 59.: Schematische Darstellung eines elektroenzymatischen Mikroreaktors im Reduktionsbetrieb. Dargestellt ist die mesostrukturierte Kathode mit immobilisiertem Enzym und Mediator, der Cofaktor NADH/NAD<sup>+</sup>, die Wasserstoffverzehranode sowie der Edukt-/Produkt-Stoffstrom. Die Abbildung wurde von Dr. Harald Natter erstellt.

## V. Zusammenfassung

Die konstitutive Expression der Galaktitol-Dehydrogenase in der *gain of function* Mutante *Rhodobacter sphaeroides* D ist auf eine Sequenzverdopplung von 21 Nukleotiden *upstream* vom Gen zurückzuführen, was als Effekt die Bindung eines GntR-Regulatorproteins als Repressor verhindern oder die Einführung einer neuen Promotorsequenz erlauben würde. Die Untersuchungen zeigen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit der neue Promotor für die Transkription verantwortlich ist.

Die Strukturelevanz von  $Mg^{2+}$ -Ionen für die Bildung katalytisch aktiver GatDH-Tetramere konnte durch eine Variante nachgewiesen werden, die C-terminal um die drei  $Mg^{2+}$  komplexierenden Aminosäuren verkürzt war. Die Variante zeigte keine Aktivität mehr und neigte bei der Anreicherung zur Aggregatbildung, was eine ungeordnete Zusammenlagerung der Monomere belegt und eine strukturelle Untersuchung verhinderte.

Zur gerichteten Immobilisierung an Goldelektroden wurde die GatDH mit einem N-terminalen Cystein-Tag versehen. Diese Variante wurde mit einer Ausbeute von über 4400 U/l exprimiert und bis zu einer Reinheit von 12,2 U/mg angereichert. Eine SPR-Messung bewies die feste Bindung des Enzyms an die Goldoberfläche als Monolayer und CV-Messungen belegten katalytische Aktivität. Diese neuartige Enzymimmobilisierung ist die Grundlage für die Entwicklung eines Enzymreaktors mit elektrochemischer Cofaktor Regenerierung zur enantiomerenreinen Feinchemikalien-Herstellung mit immobilisierten Enzymen, Cofaktoren und Mediatoren.

## VI. Abstract

A 21 nucleotide duplication sequence upstream of the gene is responsible for the constitutive expression of galactitol dehydrogenase in the gain of function mutant *Rhodobacter sphaeroides* D which could either hamper the binding of a GntR-repressor protein or allow the insertion of a new promoter sequence. Investigations show with high plausibility that the new promoter is responsible for the transcription.

The structure relevance of  $Mg^{2+}$ -ions for the formation of catalytically active GatDH-tetramers could be demonstrated by a variant where the three C-terminal  $Mg^{2+}$  binding amino acids were removed. The variant was no longer active and showed a high tendency to accumulate during purification. Hence, a disordered clustering of the monomers was demonstrated and structural investigations were hampered.

For a directed immobilization on gold electrodes the GatDH-enzyme was supplied with an N-terminal cysteine-tag. The variant was expressed with an activity yield of about 4400 U/l and purified to a specific activity of 12,2 U/mg. SPR-measurement confirmed the covalent binding of the enzyme to the gold surface as a monolayer and CV-measurements proofed the catalytic activity. This new principle of enzyme immobilization provides a basis for the development of an enzymatic bioreactor with electrochemical cofactor regeneration for the production of enantiopure fine chemicals with immobilized enzymes, cofactors and mediators.

# Literaturverzeichnis

- [1] **Abokitse, K. and Hummel, W. (2003).** Cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the gene encoding a (S)-specific alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 43297. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62:380–386.
- [2] **Adkins, S. and Burmeister, M. (1996).** Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal. Biochem.*, 240(1):17–23.
- [3] **Alberts, B. (2005).** Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 3. Auflage. *Wiley-VCH*.
- [4] **Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25:3389–3402.
- [5] **Anastas, P.T. and Kirchhoff, M.M. (2002).** Origins, current status, and future challenges of green chemistry. *Acc. Chem. Res.*, 35:686–694.
- [6] **Antal, Z.; Rascle, C.; Fevre, M. and Bruel, C. (2004).** Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking regions from expressed sequence tags. *Curr. Genet.*, 46:240–246.
- [7] **Antiochia, R.; Lavagnini, I. and Magno, F. (2001).** A general method for the electrochemical evaluation of the bimolecular rate constant in enzyme catalyzed reaction kinetics. *Electroanal.*, 13:601–602.
- [8] **Arakawa, E.T.; Tuminello, P.S.; Khare, B.N.; Milham, M.E. (1997).** Optical properties of horseradish peroxidase from 0.13 to 2.4  $\mu\text{m}$ . *Biospectroscopy*, 3:73–80.
- [9] **Arnold, F.H. and Moore, J.C. (1997).** Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 58:1–14.

- [10] **Arweiler, B. and Porteous, D.J. (1991)**. Amplification of end fragments of YAC recombinants by inverse polymerase chain reactions. *Technique*, 3:24–28.
- [11] **Barber, R.D. and Donohue, T.J. (1998)**. Function of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides*, formaldehyde oxidation and assimilation. *Biochem.*, 37:530–537.
- [12] **Bauer, C.E. (1995)**. Chapter 58, in Blankenship et al. (ed.) Anoxygenic photosynthetic bacteria. *Kluwer Academic Publishers*.
- [13] **Bauer, C.E.; Young, D.A. and Marrs, B.L. (1988)**. Analysis of the *Rhodobacter capsulatus puf* operon. *J. Biol. Chem.*, 263(10):4820–4827.
- [14] **Beley, N. and Collin, J.-P. (1993)**. Electrochemical regeneration of nicotinamide cofactor using a polypyrrole rhodium bis-terpyridine modified electrode. *Journal of Molecular Catalysis*, 79:133–140.
- [15] **Bergel, A. and DevauxBasseguy, R. (1996)**. First attempts in bioelectrochemical engineering. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 93:735–762.
- [16] **Bergmeyer, H.U. und Gawehn, K. (1977)**. Grundlagen der enzymatischen Analyse. *Verlag Chemie*.
- [17] **Birnboim, H.C. (1983)**. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, 100:243–255.
- [18] **Bleicher, K. and Winter, J. (1991)**. Purification and properties of F<sub>420</sub> and NADP<sup>+</sup>-dependent alcohol dehydrogenases of *Methanogenium liminitans* and *Methanobacterium palustre* specific for secondary alcohols. *Eur. J. Biochem.*, 200:43–51.
- [19] **Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kessler, R.; Sturmer, R. and Zelinski, T. (2004)**. Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew. Chem.-Internat. Ed.*, 43:788–824.
- [20] **Bränden, C.-I.; Jörnvall, H.; Eklund, H.; Furugren, B.; in Boyer, P.D. ed. (1975)**. The enzymes. *Academic Press, New York*, 11:103pp.
- [21] **Brock, T.D. (2003)**. Biology of microorganisms, 9th ed. *Prentice Hall*.
- [22] **Buck, D. and Guest, J.R. (1989)**. Overexpression and site-directed mutagenesis of the succinyl-CoA synthetase of *Escherichia coli* and nucleotide sequence of a gene (g30) that is adjacent to the suc operon. *Biochem. J.*, 260:737–747.

- [23] **Burnett, J.N. and Underwood, A.L. (1965).** Electrochemical reduction of diphosphopyridine dinucleotide. *Biotechnol. Tech.*, 10:371–374.
- [24] **Carius, Y. (2009).** Struktur- und Funktionsanalyse der Galaktitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* und der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase SoxS aus *Paracoccus pantotrophus*. Dissertation, Universität des Saarlandes und Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- [25] **Chenault, H.K. and Whitesides, G.M. (1987).** Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 14:147–197.
- [26] **Chin-Joe, I.; Haberland, J.; Straathof, A.J.J.; Jonejan, J.A.; Liese, A. and Heijnen, J.J. (2002).** Reduction of ethyl 3-oxobutanoate using non-growing baker's yeast in a continuously operated reactor with cell retention. *Enzyme. Microb. Technol.*, 31:665–672.
- [27] **Choudhary, M.; MacKenzie, C.; Nereng, K.; Sodergren, E.; Weinstock, G.M. and Kaplan, S. (1997).** Low-resolution sequencing of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: chromosome II is a true chromosome. *Microbiol.*, 143:3085–3099.
- [28] **Ciampi, M.S.; Schmid, M.B. and Roth J.R. (1982).** Transposon TN10 provides a promoter for transcription of adjacent sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:5016–5020.
- [29] **Colson, S.; Stephan, J.; Hertrich, T.; Saito, A.; van Wezel, G.P.; Titgemeyer, F. and Rigali, S. (2007).** Conserved *cis*-acting elements upstream of genes composing the chitinolytic system of *Streptomyces* are DasR-responsive elements. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 12:60–66.
- [30] **Conway, T. and Ingram, L.O. (1989).** Similarity of *Escherichia coli* propandiol oxidoreductase (fucO product) and an unusual alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 171:3754–3759.
- [31] **Conway, T.; Sewell, G.W.; Osman, Y.A. and Ingram, L.O. (1987).** Cloning and sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.*, 169(6):2591–2597.
- [32] **Dai, S.M.; Chen, H.H.; Chang, C.; Riggs, A.D. and Flanagan, S.D. (2000).** Ligation-mediated PCR for quantitative *in vitro* footprinting. *Nat. Biotechnol.*, 18:1108–1111.

- [33] **Dambe, T.R.; Kühn, A.M.; Brossette, T.; Giffhorn, F. and Scheidig, A.J. (2006).** Crystal structure of NADP(H)-dependent 1,5-anhydro-D-fructose reductase from *Sinorhizobium morelense* at 2.2 Å resolution: construction of a NADH-accepting mutant and its application in rare sugar synthesis. *Biochem.*, 45(33):10030–10042.
- [34] **Deuschle, U.; Gentz, R. and Bujard, H. (1986).** *Lac* repressor blocks transcribing RNA polymerase and terminates transcription. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83:4134–4137.
- [35] **DevauxBasseguy, R.; Gros, P. and Bergel, A. (1997).** Electroenzymatic process: a clean technology alternative for highly selective synthesis? *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 68:389–396.
- [36] **deVries, G.E.; Kües, U. and Stahl, U. (1990).** Physiology and genetics of methylotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 75:57–101.
- [37] **Drakesmith, F.G. and Gibson, A. (1988).** A combined electrochemical process for the regeneration of coenzymes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, pages 1493–1494.
- [38] **Drew, L.R.; Tang, D.C.; Berg, P.E. and Rodgers, G.P. (2000).** The role of *trans*-acting factors and DNA-bending in the silencing of human  $\beta$ -globin gene expression. *Nucleic Acids Res.*, 28(14):2823–2830.
- [39] **Dubendorff, J.W. and Studier, F.W. (1991).** Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *J. Mol. Biol.*, 219:45–59.
- [40] **Fassoune, A.; Laval, J.M.; Moiroux, C.B. and Bourdillon, C. (1990).** Electrochemical regeneration of NAD in a plug-flow reactor. *Biotech. Bioeng.*, 35:935–939.
- [41] **Festel, G.; Knöll, J.; Götz, H. und Zinke, H. (2004).** Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie. *Chemie Ingenieur Technik*, 76(3):307–312.
- [42] **Fiedler, S.; Wirth, R. (1988).** Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem.*, 170:38–44.
- [43] **Findrik, Z.; Vasic-Racki, D.; Lütz, S.; Daußmann, T. and Wandrey, C. (2005).** Kinetic modelling of acetophenone reduction catalyzed by alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter* sp.. *Biotechnol. Lett.*, 27:1087–1095.

- [44] **Frunzke, J.; Engels, V.; Hasenbein, S.; Gätgens, C. and Bott, M. (2008).** Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. *Molecular Microbiology*, 67(2):305–322.
- [45] **Fry, A.J.; Sobolov, S.B.; Leonida, M.D. and Voivodov, K.I. (1994).** Electroenzymatic synthesis (regeneration of NADH coenzyme)- use of nafion ion-exchange films for immobilization of enzyme and redox mediator. *Tetrahedron Lett.*, 35:5607–5610.
- [46] **Fry, J.; Wood, M. and 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.
- [47] **Fujita, Y. and Fujita, T. (1987).** The gluconat operon *gnt* of *Bacillus subtilis* encodes its own transcriptional negative regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:4524–4528.
- [48] **Fujita, Y. and Miwa, Y. (1989).** Identification of an operator sequence for the *Bacillus subtilis gnt* operon. *J. Biol. Chem.*, 264(7):4201–4206.
- [49] **Gajdzik, J. (2007).** Immobilisierung von Redoxenzymen auf nano- und polykristallinen Metalloberflächen. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- [50] **Gajdzik, J.; Szamocki R.; Natter, H.; Kohring, G.W.; Giffhorn, F.; Hempelmann, R. (2007).** Electroenzymatic reactions with sorbitol dehydrogenase on gold electrodes. *J. Solid State Electrochem.*, 11:144–149.
- [51] **Galbraith, M.P.; Feng, S.F.; Borneman, J.; Triplett, E.W.; de Bruijn, F.J. and Rossbach, S. (1998).** A functional myo-inositol catabolism pathway is essential for rhizopine utilization by *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology*, 144(Pt 10):2915–2924.
- [52] **Gao, Y.-G.; Suzuki, H.; Ito, H.; Zhou, Y.; Tanaka, Y.; Wachi, M.; Watanabe, N.; Tanaka, I. and Yao, M. (2008).** Structural and functional characterization of the LldR from *Corynebacterium glutamicum*: a transcriptional repressor involved in L-lactate and sugar utilization. *Nucleic Acids Res.*, 36(22):7110–7123.
- [53] **Gavrilescu, M. and Chisti, Y. (2005).** Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.*, 23:471–499.

- [54] **Gershon, P.D. and Khilko, S. (1995).** Stable chelating linkage for reversible immobilization of oligohistidine tagged proteins in the BIAcore surface plasmon resonance detector. *Journal of Immunological Methods*, 183:65–76.
- [55] **Gibson, D.T.; Mahadevan, V. and Davey, J.F. (1974).** Bacterial metabolism of para- and meta-xylene: oxidation of the aromatic ring. *J. Bacteriol.*, 119:930–936.
- [56] **Goldberg, K.; Schroer, K.; Lütz, S.; Liese, A. (2007).** Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part I: process with isolated enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76:237–248.
- [57] **Goldberg, K.; Schroer, K.; Lütz, S.; Liese, A. (2007).** Biocatalytic ketone reduction - a powerful tool for the production of chiral alcohols - part II: whole-cell reductions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76:249–255.
- [58] **Gorton, L. (2002).** Electrochemistry of NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H. In: *Bard, A.J.; Stratmann, M., eds. Encyclopedia of Electrochemistry, Wiley-VCH (Weinheim)*, pages 67–143.
- [59] **Gorton, L. and Dominguez, E. (2002).** Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes. *Rev. Mol. Biotechnol.*, 82:371–392.
- [60] **Granström, T.B.; Takata, G.; Tokuda, M. and Izumori, K. (2004).** Izumoring: A novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars. *J. Biosci. Bioengin.*, 97(2):89–94.
- [61] **Gruber, T.M. and Gross, C.A. (2003).** Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57:441–466.
- [62] **Güssow, D.; Clackson, T. (1989).** Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain-reaction. *Nucleic Acids Res.*, 17(10):4000–4000.
- [63] **Habe, H. and Omori, T. (2003).** Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67(2):225–243.
- [64] **Haberland, J.; Hummel, W.; Daußmann, T. and Liese, A. (2002).** New continuous production process for enantiopure (2R, 5R)-hexanediol. *Org. Process. Res. Dev.*, 6:458–462.

- [65] **Hall, B.G. (1981)**. Changes in the substrate specificities of an enzyme during directed evolution of new functions. *Biochemistry*, 20(14):4042–4049.
- [66] **Hall, B.G. (1988)**. Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations. I. Mutations involving an insertion sequence. *Genetics.*, 120(4):887–897.
- [67] **Hall, B.G. (1989)**. Selection, adaptation, and bacterial operons. *Genome.*, 31(1):265–271.
- [68] **Hanahan, D. (1983)**. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166:557–580.
- [69] **Hanahan, D.; Jessee, J.; Bloom, F.R. (1991)**. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.*, 204:63–113.
- [70] **Hartree, E.F. (1972)**. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48:422–427.
- [71] **Haydon, D.J. and Guest, J.R. (1991)**. A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 79:291–296.
- [72] **Heller, A. (2006)**. Potentially implantable miniature batteries. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385:469–473.
- [73] **Helmann, J.D. and Chamberlin, M.J. (1988)**. Structure and function of bacterial sigma factors. *Ann. Rev. Biochem.*, 57:839–872.
- [74] **Hilborn, J.W.; Lu, Z.-H.; Jurgens, A.R.; Fang, Q.K.; Byers, P.; Wald, S.A. and Senanayake, C.H. (2001)**. A practical asymmetric synthesis of (R)-fluoxetine and its major metabolite (R)- norfluoxetine. *Tetrahorn Lett.*, 42:8919–8921.
- [75] **Hochuli, E.; Döbeli, H. and Schacher, A. (1987)**. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography*, 411:177–184.
- [76] **Hollmann, F. and Schmid, A. (2004)**. Electrochemical regeneration of oxidoreductases for cell-free biocatalytic redox reactions. *Biocatal. Biotransform.*, 22:63–88.
- [77] **Hosono, K.; Kajiwara, S.; Yamazaki, Y. and Maeda, H. (1990)**. Construction of a bioreactor for production of (R)-(-)-mandelate, a typical specialty chemical. *J. Biotechnol.*, 14(2):149–156.

- [78] **Huckaby, C.S.; Kouri, R.E.; Lane, M.J.; Peshick, S.M.; Carroll, W.T.; Henderson, S.M.; Faldasz, B.D.; Waterbury, P.G. and Vournakis, J.N. (1991).** An efficient technique for obtaining sequences flanking inserted retroviruses. *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 8:151–158.
- [79] **Huerta, A.M. and Collado-Vides, J. (2003).** Sigma70 promoters in *Escherichia coli*: Specific transcription in dense regions of overlapping promoter-like signals. *J. Mol. Biol.*, 333:261–278.
- [80] **Hummel, W. (1990).** Enzyme-catalyzed synthesis of optically pure R(+)-phenylethanol. *Biotechnol. Lett.*, 12:403–408.
- [81] **Hummel, W. (1997).** New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 58:145–184.
- [82] **Hummel, W. (1999).** Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *Trends Biotechnol.*, 17:487–492.
- [83] **Huwig, A.; Emmel, S.; Jäkel, G.; Giffhorn, F. (1997).** Enzymatic synthesis of L-tagatose from galactitol with galactitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D. *Carbohydrate Research*, 305:337–339.
- [84] **Imhoff, J.F.; Trüper, H.G. and Pfennig, N. (1984).** Rearrangements of the species and genera of the phototrophic purple nonsulfur bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34:340–343.
- [85] **Izumori, K. (2002).** Bioproduction strategies for rare hexose sugars. *Naturwissenschaften*, 89:120–124.
- [86] **Jacob, F. and Monod, J. (1961).** On the regulation of gene activity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 26:193–211.
- [87] **Jaegfeldt, H. (1981).** A study of the products formed in the electrochemical reduction of nicotinamide-adenine-dinucleotide. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 8:355–370.
- [88] **Jäkel, G. (1994).** Isolierung und Charakterisierung einer durch Enzymevolution entstandenen Galaktitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* D. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.
- [89] **Jones, J.B.; Sneddon, D.W.; Higgins, W. and Lewis, A.J. (1972).** Preparative-scale reductions of cyclic ketone and aldehyde substrates of horse liver alcohol

- dehydrogenase with *in situ*, sodium dithionite recycling of catalytic amounts of NAD. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, pages 856–857.
- [90] **Jones, S.; Barker, J.A.; Nobeli, I. and Thornton, J.M. (2003).** Using structural motif templates to identify proteins with DNA binding function. *Nucleic Acids Res.*, 31(11):2811–2823.
- [91] **Jörnvall, H.; Bahr-Lindström, H.; Jany, K.-D.; Ulmer, W. and Frösche, M. (1984).** Extended superfamily of short alcohol-polyol-sugar dehydrogenases: structural similarities between glucose and ribitol dehydrogenases. *FEBS Lett.*, 165:190–196.
- [92] **Jörnvall, H.; Persson, B. and Jeffrey, 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. USA*, 78:4226–4230.
- [93] **Jörnvall, H.; Persson, B. and Jeffrey, J. (1987).** Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.*, 167:195–201.
- [94] **Jörnvall, H.; Persson, B.; Krook, M.; Atrian, S.; Gonzalez-Duarte, R.; Jeffrey, J. and Ghosh, D. (1995).** Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34:6003–6013.
- [95] **Julliard, M. and Lepetit, J. (1982).** Regeneration of NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup> cofactors by photosensitized electron-transfer. *Photochem. Photobiol.*, 36:283–290.
- [96] **Jung, T.F. (2008).** Substratspezifität und Stereoselektivität der Galaktitoldehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* D. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- [97] **Kahle, C.; Schneider, K.H. and Giffhorn, F. (1992).** Pentitol metabolism of *Rhodobacter sphaeroides* Si4: purification and characterization of a ribitol dehydrogenase. *J. Gen. Microbiol.*, 138:1277–1281.
- [98] **Kanagasundaram, V. and 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.
- [99] **Karlson, P.; Doenecke, D. and Koolman, J. (1994).** Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 14. Auflage. *Georg Thieme Verlag*. Stuttgart, New York.

- [100] **Karls, R.K.; Jin, D.J. and Donohue, T.J. (1993).** Transcriptional properties of RNA polymerase holoenzymes isolated from the purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.*, 175(23):7629–7638.
- [101] **Karls, R.K.; Wolf, J.R. and Donohue, T.J. (1999).** Activation of the *cycA* P2 promoter for the *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome  $c_2$  gene by the photosynthesis response regulator. *Molecular Microbiology*, 34(4):822–835.
- [102] **Karyakin, A.A.; Karyakina, E.E.; Schuhmann, W. and Schmidt, H.L. (1999).** Electropolymerized azines: part II. In a search of the best electrocatalyst of NADH oxidation. *Electroanal.*, 11:553–557.
- [103] **Kataoka, M.; Kita, K.; Wada, M.; Yasohara, Y.; Hasegawa, J. and Shimizu, S. (2003).** Novel bioreduction systems for the production of chiral alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62:437–445.
- [104] **Kavanagh, K.L.; Jörnvall, H.; Persson, B. and Oppermann, U. (2008).** The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65:3895–3906.
- [105] **Keim, M.; Williams, R.S. and Harwood, A.J. (2004).** An inverse PCR technique to rapidly isolate the flanking DNA of dictyostelium insertion mutants. *Mol. Biotechnol.*, 26:221–224.
- [106] **Kühn, A.M. (2004).** 1,5-Anhydro-D-fruktose-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5.: Isolierung, Charakterisierung, Überexpression in *E. coli* sowie Verwendung als neuer Biokatalysator. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- [107] **Kühn, A.; Yu, S. and Giffhorn, F. (2006).** Catabolism of 1,5-anhydro-D-fructose in *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5: discovery, characterization, and overexpression of a new 1,5-anhydro-D-fructose reductase and its application in sugar analysis and rare sugar synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:1248–1257.
- [108] **Kiley, P.J. and Kaplan, S. (1988).** Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol. Rev.*, 52:50–69.
- [109] **Kindermann, M.; George, N. and Johnson, K. (2003).** Covalent and selective immobilisation of fusion proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, 125:7810–7811.
- [110] **Kohring, G.-W.; Wiehr, P.; Jeworski, M. and Giffhorn, F. (2003).** Stereoselective oxidation of aliphatic diols and reduction of hydroxy-ketones with galactitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 68:309–312.

- [111] **Kornberger, P.; Gajdzik, J.; Natter, H.; Wenz, G.; Giffhorn, F.; Kohring, G.-W. and Hempelmann, R. (2009).** Modification of galactitol-dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D for immobilization on polycrystalline gold surfaces. *Langmuir*. in revision.
- [112] **Kornberger, P.; Giffhorn, F. and Kohring, G.-W. (2009).** Dehydrogenases, Electrochemical Co-Factor Regeneration. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB)*, John Wiley and Sons, Inc. in press.
- [113] **Koutz, P.; Davies, G.R.; Stillman, C.; Barringer, K.; Cregg, J. and Thill, G. (1989).** Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*, 5:167–177.
- [114] **Kragl, U.; Kruse, W.; Hummel, W. and Wandrey, C. (1996).** Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example. *Biotechnol. Bioeng.*, 52:309–319.
- [115] **Kula, M.R.; Wichmann, R.; Oden, U. and Wandrey, C. (1980).** Influence of substrate or product inhibition on the performance of enzyme reactors. *Biochimie*, 62:523–536.
- [116] **Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.
- [117] **Lee, J.-K.; Koo, B.-S.; Kim, S.-Y. and Hyun H.-H. (2003).** Purification and characterization of a novel mannitol dehydrogenase from a newly isolated strain of *Candida magnoliae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(8):4438–4447.
- [118] **Lee, J.-Y.; Park, H.-S. and Kim, H.-S. (1999).** Adenosylcobalamin-mediated methyl transfer by toluate *cis*-dihydrodiol dehydrogenase of the TOL plasmid pWW0. *J. Bacteriol.*, 181(9):2953–2957.
- [119] **Lee, L.G. and Whitesides, G.M. (1985).** Enzyme-catalyzed organic synthesis: a comparison of strategies for *in situ* regeneration of NAD<sup>+</sup> from NADH. *J. Am. Chem. Soc.*, 107:6999–7008.
- [120] **Lee, L.G. and Whitesides, G.M. (1986).** Preparation of optically active 1,2-diols and  $\alpha$ -hydroxy ketones using glycerol dehydrogenase as catalyst: limits to enzyme catalyzed synthesis due to non-competitive and mixed inhibition by product. *J. Org. Chem.*, 51:25–36.

- [121] **Lee, M.H.; Scherer, M.; Rigali, S. and Golden, J.W. (2003).** PlmA, a new member of the GntR family, has plasmid maintenance functions in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.*, 185:4315–4325.
- [122] **Lutz, S.; Rao, N. and Wandrey, C. (2006).** Membranes in biotechnology. *Chem. Eng. Technol.*, 29:1404–1415.
- [123] **MacGregor, B.J.; Karls, R.K. and Donohue, T.J. (1998).** Transcription of the *Rhodobacter sphaeroides* *cycA* P1 promoter by alternate RNA polymerase holoenzymes. *J. Bacteriol.*, 180(1):1–9.
- [124] **Mallinder, P.R.; Pritchard, A. and Moir, A. (1992).** Cloning and characterization of a gene from *Bacillus stearothermophilus* var. non-diastaticus encoding a glycerol dehydrogenase. *Gene*, 110(1):9–16.
- [125] **Mandler, D. and Willner, I. (1984).** Solar light induced formation of chiral 2-butanol in an enzyme-catalyzed chemical system. *J. Am. Chem. Soc.*, 106:5352–5353.
- [126] **Mandler, D. and Willner, I. (1986).** Photosensitized NAD(P)H regeneration systems; application in the reduction of butan-2-one, pyruvic, and aceto-acetic acids and in the reductive amination of pyruvic and oxoglutaric acid to amino acid. *J. Chem. Soc. Perkin. Transact.*, 2:805–811.
- [127] **Mano, N. and Kuhn, A. (1999).** Immobilized nitro-fluorenone derivatives as electrocatalysts for NADH oxidation. *J. Electroanalytical Chem.*, 477:79–88.
- [128] **Mano, N. and Kuhn, A. (2001).** Electrodes modified with nitrofluorenone derivatives as a basis for new biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 16:653–660.
- [129] **Mano, N.; Peyrou, P. and Kuhn, A. (2001).** Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  on the amperometric determination of dehydrogenase substrates with nitro-fluorenone modified electrodes. *Electroanal.*, 13(8-9):770–774.
- [130] **Matell, M. (1953).** Stereochemical studies on plant growth regulators. VII. Optically active  $\alpha$ -(2-methyl-4-chlorophenoxy)propionic acid and  $\alpha$ -(2,4-dichlorophenoxy)-n-butyric acid and their steric relations. *Ark. Kemi.*, 6:365–373.
- [131] **McCoy, M. (2000).** Novozymes emerges. *Chem. Eng. News*, 19:23–25.
- [132] **Meinkoth, J. and Wahl, G. (1984).** Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, 138:267–284.

- [133] **Meng, X.; Wu, X.; Wang, Z., Cao, X. and Zhang, Z. (2001).** The electrochemical and spectroelectrochemical behaviors of SOD at cysteine modified gold electrode. *Bioelectrochemistry*, 54:125–129.
- [134] **Miao, Y.; Chia, L.S.; Goh, N.K. and Tan, S.N. (2001).** Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan matrix cross-linked with glutaraldehyde. *Electroanalysis*, 13(4):347–349.
- [135] **Mikkonen, M.; Vuoristo, J. and Alatosava, T. (1994).** Ribosome binding site consensus sequence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophage LL-H. *FEMS Microbiology Letters*, 116:315–320.
- [136] **Molinari, F. (2006).** Oxidations with isolated and cell-bound dehydrogenases and oxidases. *Curr. Org. Chem.*, 10:1247–1263.
- [137] **Moore, M.D. and Kaplan, S. (1992).** Identification of intrinsic high-level resistance to rare-earth oxides and oxyanions in members of the class Proteobacteria: Characterization of tellurite, selenite and rhodium sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.*, 174:1505–1514.
- [138] **Mota, L.J.; Tavares, P. and Sa-Nogueira, I. (1999).** Mode of action of AraR, the key regulator of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, 33:476–489.
- [139] **Mujagic, H.; Chabner, B.A. and Mujagic, Z. (2002).** Mechanisms of action and potential therapeutic uses of thalidomide. *C. Medical J.*, 43(3):274–285.
- [140] **Musameh, M.; Wang, J.; Merkoci, A. and Lin, Y. (2002).** Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. *Electrochem. Commun.*, 4:743–746.
- [141] **Nickens, D.G. and Bauer, C.E. (1998).** Analysis of the *puc* operon promoter from *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.*, 180(16):4270–4277.
- [142] **Nidetzky, B.; Schmidt, D.; Weber, A. and Kulbe, K.D. (1996).** Simultaneous enzymatic synthesis of mannitol and gluconic acid. II. Process development for a NAD(H)-dependent enzyme system. *Biocatal. Biotrans.*, 14:47–65.
- [143] **Niefind, K.; Riebel, B.; Muller, J.; Hummel, W. and Schomburg, D. (2000).** Crystallization and preliminary characterization of crystals of R-alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 56(12):1696–1698.

- [144] **Ochman, H.; Gerber, A.S. and Hartl, D.L. (1988).** Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 120:621–623.
- [145] **Otte, S. and Lengeler, J.W. (2001).** The *mtl* genes and the mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae* KAY2026. *FEMS Microbiol. Lett.*, 194:221–227.
- [146] **Pabo, C.O.; and Sauer, R.T. (1984).** Protein-DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.*, 53:293–321.
- [147] **Paget, M.S.B. and Helmann, J.D. (2003).** The  $\sigma^{70}$  family of sigma factors. *Genome Biology*, 4(1). Article 203.
- [148] **Patel, R.N. (1997).** Stereoselective biotransformations in synthesis of some pharmaceutical intermediates. *Adv. Appl. Microbiol.*, 43:91–140.
- [149] **Penfold, R.J. and Pemberton, J.M. (1994).** Sequencing, chromosomal inactivation, and functional expression in *Escherichia coli* of *ppsR*, a gene which represses carotenoid and bacteriochlorophyll synthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.*, 176(10):2869–2876.
- [150] **Persson, B. and Gorton, L. (1990).** A comparative study of some 3,7-diaminophenoxazine derivatives and related compounds for electrocatalytic oxidation of NADH. *J. Electroanal. Chem.*, 292:115–138.
- [151] **Peters, J. (1993).** Isolierung und Charakterisierung von Enzymsystemen zur stereoselektiven Reduktion von Ketosäuren/-estern. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- [152] **Peters, J. (1998).** Dehydrogenase-characteristics, design of reaction conditions, and application. In: *Rehm, H.J.; Reed, G. eds., Biotechnology Vol. 8a Biotransformation I, D.R. Kelley, ed., Wiley-VCH, Weinheim, Germany.*
- [153] **Pfennig, N. (1964).** Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr., Hyg. Abt.1*:179–189. Suppl.1 (Anreicherungskultur und Mutantenauslese).
- [154] **Pfennig, N. and Trüper, H.G. (1971).** Type and neotype strains of the species of phototrophic bacteria maintained in pure culture. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 21:19–24.
- [155] **Pfennig, N. und Lippert, K.D. (1966).** Über das Vitamin B<sub>12</sub>-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Microbiol.*, 55:245–256.

- [156] **Philippsen, A.; Schirmer, T.; Stein, M.A.; Giffhorn, F. and Stetefeld, J. (2005)**. Structure of zinc-independent sorbitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.4 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D*, 61:374–379.
- [157] **Portaccio, M.; Durante, D.; Viggiano, A.; Di Martino, S.; De Luca, P.; Di Tuoro, D.; Bencivenga, U.; Rossi, S.; Canciglia, P.; De Luca, B. and Mita, D.G. (2007)**. Amperometric glucose determination by means of glucose oxidase immobilized on a cellulose acetate film: dependence on the immobilization procedures. *Electroanalysis*, 19(17):1787–1793.
- [158] **Prentki, P.; Teter, B.; Chandler, M. and Galas, D.J. (1986)**. Functional promoters created by insertation of transposable element IS1. *J. Mol. Biol.*, 191:383–393.
- [159] **Quilitz, R. (1999)**. Thalidomide in oncology: the peril and the promise. *Cancer Control*, 6:483–495.
- [160] **Radola, B.J. (1980)**. Ultrathin-layer isoelectric focusing in 500-100 μm polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films. *Electrophoresis*, 1:43–56.
- [161] **Rao, S. and Rossmann M. (1973)**. Comparison of super-secondary structures in proteins. *J. Mol. Biol.*, 76(2):241–256.
- [162] **Reichstein, T. and Grüssner, A. (1934)**. Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (Vitamin C). *Helv. Chim. Acta*, 17:311–328.
- [163] **Reid, M.F. and Fewson, C.A. (1994)**. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.*, 20:13–56.
- [164] **Reynolds, A.E.; Felton, J. and Wright, A. (1981)**. Insertion of DNA activates the cryptic *bgl* operon of *E. coli* K-12. *Nature*, 293:625–629.
- [165] **Rigali, S.; Derouaux, A.; Giannotta, F. and Dusart, J. (2002)**. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J. Biol. Chem.*, 277:12507–12515.
- [166] **Rigali, S.; Schlicht, M.; Hoskisson, P.; Nothaft, H.; Merzbacher, M.; Joris, B. and Titgemeyer, F. (2004)**. Extending the classification of bacterial transcription factors beyond the helix-turn-helix motif as an alternative approach to discover new *cis/trans* relationships. *Nucleic Acids Res.*, 32(11):3418–3426.

- [167] **Rode, H. and Giffhorn, F. (1983).** Adaptation of *Rhodopseudomonas sphaeroides* to growth on d-(-)-tartrate and large-scale production of a constitutive d-(-)-tartrate dehydratase during growth on dl-malate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:716–719.
- [168] **Rosenthal, A. and Jones, D.S.C. (1990).** Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, 18:3095–3096.
- [169] **Rossmann, M.G.; Moras, D. and Olsen, K.W. (1974).** Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, 250(463):194–199.
- [170] **Roth, M.J.; Tanese, N. and Goff, S.P. (1985).** Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 260(16):9326–9335.
- [171] **Ruppert, R.; Herrmann, S. and Steckhan, E. (1987).** Efficient indirect electrochemical *in situ* regeneration of NADH: electrochemical driven enzymatic reduction of pyruvate catalyzed by D-LDH. *Tetrahedron Lett.*, 28:6583–6586.
- [172] **Saidman, S.B. and Bessone, J.B. (2000).** The influence of electrode material on NAD<sup>+</sup> oxidation. *Electrochimica Acta*, 45:3151–3156.
- [173] **Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487–491.
- [174] **Sakai, Y. and Tani, Y. (1992).** Cloning and sequencing of the alcohol oxidase-encoding gene (AOD1) from the formaldehyde-producing asporogenous methylotrophic yeast, *Candida boidinii* S2. *Gene*, 114:67–73.
- [175] **Salimi, A.; Izadi, M.; Hallaj, R.; Soltanian, S. and Hadadzadeh, H. (2009).** Electrocatalytic reduction of NAD<sup>+</sup> at glassy carbon electrode modified with single-walled carbon nanotubes and Ru(III) complexes. *J. Solid State Electrochem.*, 13:485–496.
- [176] **Saliola, M.; Shuster, J.R. and Falcone, C. (1990).** The alcohol dehydrogenase system in the yeast, *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 6(3):193–204.
- [177] **Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, 2. Auflage. *Cold Spring Harbor Laboratory*. Cold Spring Harbor, NY.

- [178] **Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74:5463–5467.
- [179] **Schauder, S.; Schneider, K.-H. and Giffhorn, F. (1995).** Polyol metabolism of *Rhodobacter sphaeroides*: biochemical characterization of a short-chain sorbitol dehydrogenase. *Microbiology*, 141:1857–1863.
- [180] **Schell, M.A. (1993).** Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 47:597–626.
- [181] **Schäfer, A.; Stein, M.A.; Schneider, K.-H.; Giffhorn, F. (1997).** Mannitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* Si4: subcloning, overexpression in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48:47–52.
- [182] **Schlegel, H.G. (1992).** Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage. *Thieme-Verlag*.
- [183] **Schmidt, E.; Hummel, W.; Wandrey, C. and Kula, M.R. (1987).** Continuous production of L-phenylalanine from phenylpyruvat using isolated L-phenylalanine dehydrogenase from *Rhodococcus* sp.. in: *Chmiel, H.; Hammes, W.P. and Bailey, J.E., eds., Biochemical - A challenge for interdisciplinary cooperation*, pages 487–490.
- [184] **Schmitt, J.; Hess, H. and Stunnenberg, H.G. (1993).** Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Molecular Biology Reports*, 18:223–230.
- [185] **Schneider, K.H. (1990).** Neue bakterielle Polyol-Dehydrogenasen für die Umsetzung und spezifische Analytik von Zuckeralkoholen. Dissertation, Universität Göttingen.
- [186] **Schneider, K.H. and Giffhorn, F. (1989).** Purification and properties of a polyol dehydrogenase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur. J. Biochem.*, 184:15–19.
- [187] **Schneider, K.H. and Giffhorn, F. (1994).** Overproduction of mannitol dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41:578–583.
- [188] **Schneider, K.H.; Jäkel, G.; Hoffmann, R.; Giffhorn, F. (1995).** Enzyme evolution in *Rhodobacter sphaeroides*: selection of a mutant expressing a new galactitol dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme. *Microbiology*, 141:1865–1873.

- [189] **Schröder, I. (2003)**. Elektrochemische Oxidation von Nukleotidkofaktoren. Charakterisierung und Prozessentwicklung asymmetrischer enzymatischer Katalysesysteme. Dissertation, Universität Bonn.
- [190] **Schroer, K.; Mackfeld, U.; Tan, I.A.W.; Wandrey, C.; Heuser, F.; Bringer-Meyer, S.; Weckbecker, A.; Hummel, W.; Daußmann, T.; Pfaller, R.; Liese, A. and Lütz, S. (2007)**. Continuous asymmetric ketone reduction process with recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 132:438–444.
- [191] **Schutte, H.; Flossdorf, J.; Sahm, H. and Kula, M.-R. (1976)**. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.*, 62:151–160.
- [192] **Schwartz, D.; Stein, M.; Schneider, K.H.; Giffhorn, F. (1994)**. Synthesis of D-xylulose from D-arabitol by enzymatic conversion with immobilized mannitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biotechnol.*, 33:95–101.
- [193] **Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. (1996)**. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 68:850–858.
- [194] **Shine, J. and Dalgarno, L. (1974)**. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71(4):1342–1346.
- [195] **Shivarova, N.; Foster, W.; Jacob, H.E. and Grigorova, R. (1983)**. Microbiological implications of electric field effects. VII: stimulation of plasmid transformation of *Bacillus cereus* protoplasts by electric field pulses. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 23:595–599.
- [196] **Singer, T. and Burke, E. (2003)**. High-throughput TAIL-PCR as a tool to identify DNA flanking insertions. *Methods Mol. Biol.*, 236:241–272.
- [197] **Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. (1985)**. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150(1):76–85.
- [198] **Song, S.; Clark, R.A. and Bowden, E.F. (1993)**. Characterization of cytochrome c/Alkanethiolate structures prepared by self-assembly on gold. *J. Phys. Chem.*, 97:6564–6572.

- [199] **Steckhan, E. (1994)**. Electroenzymatic synthesis. *Top. Curr. Chem.*, 170:83–111.
- [200] **Steckhan, E.; Herrmann, S.; Ruppert, R.; Dietz, E.; Frede, M. and Spika, E. (1991)**. Analytical study of a series of substituted (2,2'-bipyridyl)(pentamethylcyclopentadienyl)rhodium and -iridium complexes with regard to their effectiveness as redox catalysts for the indirect electrochemical and chemical reduction of NAD(P)<sup>+</sup>. *Organomet.*, 10:1568–1577.
- [201] **Stein, M.A. (1998)**. Das *smo*-Operon aus *Rhodobacter sphaeroides*: Klonierung, Sequenzierung und molekulare Analyse. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- [202] **Stein, M.A.; Schäfer, A. and Giffhorn, F. (1997)**. Cloning, nucleotide sequence, and overexpression of *smoS*, a component of a novel operon encoding an ABC transporter and polyol dehydrogenases of *Rhodobacter sphaeroides* Si4. *J. Bacteriol.*, 179:6335–6340.
- [203] **Stoica, L.; Ludwig, R.; Haltrich, D.; Gorton, L. (2006)**. Third-generation biosensors for lactose based on newly discovered cellobiose dehydrogenase. *Anal. Chem.*, 78(2):293–298.
- [204] **Stormo, G.D. (2000)**. DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics*, 16(1):16–23.
- [205] **Straathof, A.J.; Panke, S.; Schmid, A. (2002)**. The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:548–556.
- [206] **Straney, S.B. and Crothers, D.M. (1987)**. *Lac* repressor is a transient gene-activating protein. *Cell*, 51:699–707.
- [207] **Stryer, L. (2007)**. Biochemie, 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- [208] **Subudhi, S.; Kurdrid, P.; Hongsthong, A.; Sirijuntarut, M.; Cheevadhanarak, S.; Tanticharoen M. (2008)**. Isolation and functional characterization of *Spirulina* D6D gene promoter: role of a putative GntR transcription factor in transcriptional regulation of D6D gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 365:643–649.
- [209] **Suwanto, A. and Kaplan, S. (1989)**. Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: presence of two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.*, 171:5850–5859.

- [210] **Suwanto, A. and Kaplan, S. (1992).** Chromosome transfer in *Rhodobacter sphaeroides*: Hfr formation and genetic evidence for two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.*, 174:1135–1145.
- [211] **Suzek, B.E.; Ermolaeva, M.D.; Schreiber, M. and Salzberg, S.L. (2001).** A probabilistic method for identifying start codons in bacterial genomes. *Bioinformatics*, 17(12):1123–1130.
- [212] **Takemura, H.; Kondo, K.; Horinouchi, S. and Beppu, T. (1993).** Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurians*. *J. Bacteriol.*, 175:6857–6866.
- [213] **Tamaki, T.; Fukaya, M.; Takemura, H.; Tayama, K.; Okumura, H.; Kawamura, Y.; Nishiyama, M.; Horinouchi, S. and Beppu, T. (1991).** Cloning and sequencing of the gene cluster encoding two subunits of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1088:292–300.
- [214] **Tan, G.; Gao, Y.; Shi, M.; Zhang, X.; He, S.; Chen, Z. and An, C. (2005).** SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Res.*, 33(13).
- [215] **Terauchi, R. and Kahl, G. (2000).** Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: the 5-flanking regions of Pal and Pgi genes from yams (*Dioscorea*). *Mol. Gen. Genet.*, 263:554–560.
- [216] **Thatcher, D.R. (1980).** The complete amino acid sequence of three alcohol dehydrogenase alleloenzymes ( $Adh^{N-11}$ ,  $AdH^S$  and  $Adh^{UF}$  from the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.*, 187:875–883.
- [217] **Tienhaara, R. and Meany, J.E. (1973).** Lactate dehydrogenase catalyzed reduction of pyruvate. Active substrate and substrate inhibition. *Biochemistry*, 12(11):2067–2070.
- [218] **Tinazli, A.; Tang, J.; Valiokas, R.; Picuric, S.; Lata, S.; Piehler, J.; Liedberg, B. and Tampé, R. (2005).** High-affinity chelator thiols for switchable and oriented immobilization of histidine-tagged proteins: a generic platform for protein chip technologies. *Chem. Eur. J.*, 11:5249–5259.
- [219] **Triglia, T.; Peterson, M.G. and Kemp, D.J. (1988).** A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.*, 16:8186.

- [220] **Tse, D.C.-S. and Kuwana, T. (1978).** Electrocatalysis of dihydronicotinamide adenosine diphosphate with quinones and modified quinone electrodes. *Analytical Chemistry*, 50(9):1315–1318.
- [221] **van Niel, C.B. (1944).** The culture, general physiology, morphology, and classification of the non-sulfur purple and brown bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 8(1):1–118.
- [222] **Voivodov, K.I.; Sobolov, S.B.; Leonida, M.D. and Fry, A.J. (1995).** Enzymatic transformation in an electrochemical reactor utilizing a redox mediator-modified enzyme electrode for NAD(H) regeneration. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5:681–686.
- [223] **von Ahsen, N.; Wittwer, C.T. and Schütz, E. (2001).** Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for  $Mg^{2+}$ , deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin. Chem.*, 47:1956–1961.
- [224] **Wada, M.; Yoshizumi, A.; Furukawa, Y.; Kawabata, H.; Ueda, M.; Takagi, H. and Nakamori, S. (2004).** Cloning and overexpression of the *Exiguobacterium* sp. F42 gene encoding a new short chain dehydrogenase, which catalyzes the stereoselective reduction of ethyl 3-oxo-3-(2-thienyl)propanoate to ethyl (S)-3-hydroxy-3-(2-thienyl)propanoate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68(7):1481–1488.
- [225] **Warshawsky, D. and Miller, L. (1994).** A rapid genomic walking technique based on ligation-mediated PCR and magnetic separation technology. *BioTechniques*, 16:792–798.
- [226] **Weber, K.; Osborn, M. (1969).** Reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244(16):4406.
- [227] **Wichmann, R. and Vasic-Racki, D. (2005).** Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 92:225–260.
- [228] **Wiechelman, K.J.; Braun, R.D.; Fitzpatrick, J.D. (1988).** Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.*, 175:231–237.
- [229] **Wierenga, R.K.; Drenth, J. and Schulz, G.E. (1983).** Comparison of the three-dimensional protein and nucleotide structure of the FAD-binding domain of p-

- hydroxybenzoate hydroxylase with the FAD- as well as NADPH-binding domains of glutathione reductase. *J. Mol. Biol.*, 167:725–739.
- [230] **Wiethaus, J.; Schubert, B.; Pfänder, Y.; Narberhaus, F. and Masepohl, B. (2008).** The GntR-like regulator TauR activates expression of taurine utilization genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.*, 190(2):487–493.
- [231] **Wöltinger, J.; Drauz, K. and Bommarius, A.S. (2001).** The membrane reactor in the fine chemical industry. *Appl. Catal. A: Gen.*, 221:171–185.
- [232] **Wong, C.H. and Whitesides, G.M. (1994).** Enzymes in synthesis organic chemistry. *Pergamon, Elsevier Science Inc., New York, USA.*
- [233] **Wu, X.Q.; Meng, X.Y.; Wang, Zh.S.; Zhang, Z.R. (1999).** Study on the ET process of SOD at cysteine modified gold electrode. *Chem. Lett.*, 12:1271–1272.
- [234] **Yamamoto, K.; Kurisu, G.; Kusunoki, M.; Tabata, S.; Urabe, I. and Osaki, S. (2001).** Crystal structure of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* IWG3 at 1.7 Å resolution. *J. Biochem.*, 129(2):303–312.
- [235] **Yoshida, N. and Sato, M. (2009).** Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83:791–798.
- [236] **Youngleson, J.S.; Santangelo, J.D.; Jones, D.T. and Woods, D.R. (1988).** Cloning and expression of a *Clostridium acetobutylicum* alcohol-dehydrogenase gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:676–682.
- [237] **Zachariou, M. and Scopes, R.K. (1986).** Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. *J. Bacteriol.*, 167:863–869.
- [238] **Zehr, B.D.; Savin, T.J.; Hall, R.E. (1989).** A one-step, low background coomassie staining procedure for polyacrylamid gels. *Anal. Biochem.*, 183:157–159.
- [239] **Zeyer, J.; Lehrbach, P.R. and Timmis, K.N. (1985).** Use of cloned genes of *Pseudomonas* TOL plasmid to effect biotransformation of benzoates to *cis*-dihydrodiols and catechols by *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50(6):1409–1413.
- [240] **Zhou, S.; Kvikstad, E.; Kile, A.; Severin, J.; Forrest, D.; Runnheim, R.; Churras, C.; Hickman, J.W.; Mackenzie, C.; Choudhary, M.; Donohue, T.; Kaplan,**

- S. and Schwartz, D.C. (2003).** Whole-genome shotgun optical mapping of *Rhodobacter sphaeroides* strain 2.4.1 and its use for whole-genome shotgun sequence assembly. *Genome Res.*, 13(9):2142–2151.
- [241] **Zhou, Y.; Nagaoka, T. and Zhu, G. (1999).** Electrochemical studies of cytochrome c disulfide at gold electrodes. *Biophys. Chem.*, 79:55–62.
- [242] **Zimmer, C. (2006).** Identifizierung von zwei biotechnologisch interessanten Enzymen und ihrer Gene zur stereo- und regioselektiven Modifikation von Kohlenhydraten: Benzoyl-esterase und Galaktitol-Dehydrogenase. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- [243] **Zimmermann, H.; Lindgren, A.; Schuhmann, W. and Gorton, L. (2000).** Anisotropic orientation of horseradish peroxidase by reconstitution on a thiol-modified gold electrode. *Chem. Eur. J.*, 6(4):592–599.
- [244] **Zipper, P.; Kratky, O.; Herrmann, R.; Hohn, T. (1971).** An x-ray small angle study of the bacteriophages fr and R17. *Eur. J. Biochem.*, 18(1):1–9.

# VII. Anhang

## 1. Verwendete Vektoren

### 1.1. Expressionsvektor pET24a(+)

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>lac</i> I coding sequence	714-1793
pBR322 origin	3227
Kan coding sequence	3936-4748
f1 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(+).

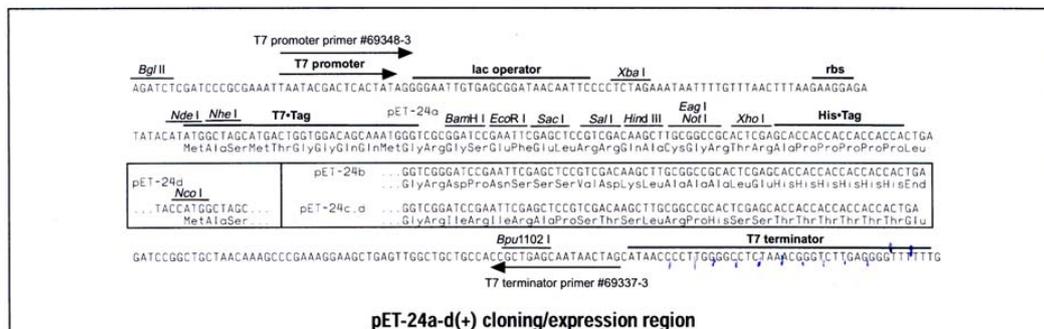
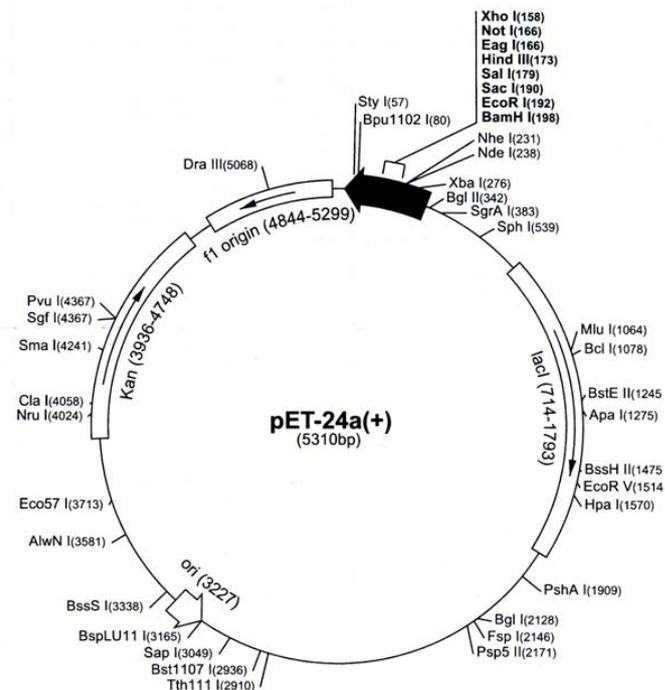


Abbildung 60.: Vektorkarte von pET24a(+) (Novagen, Darmstadt).

## 1.2. pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup> -Vektor

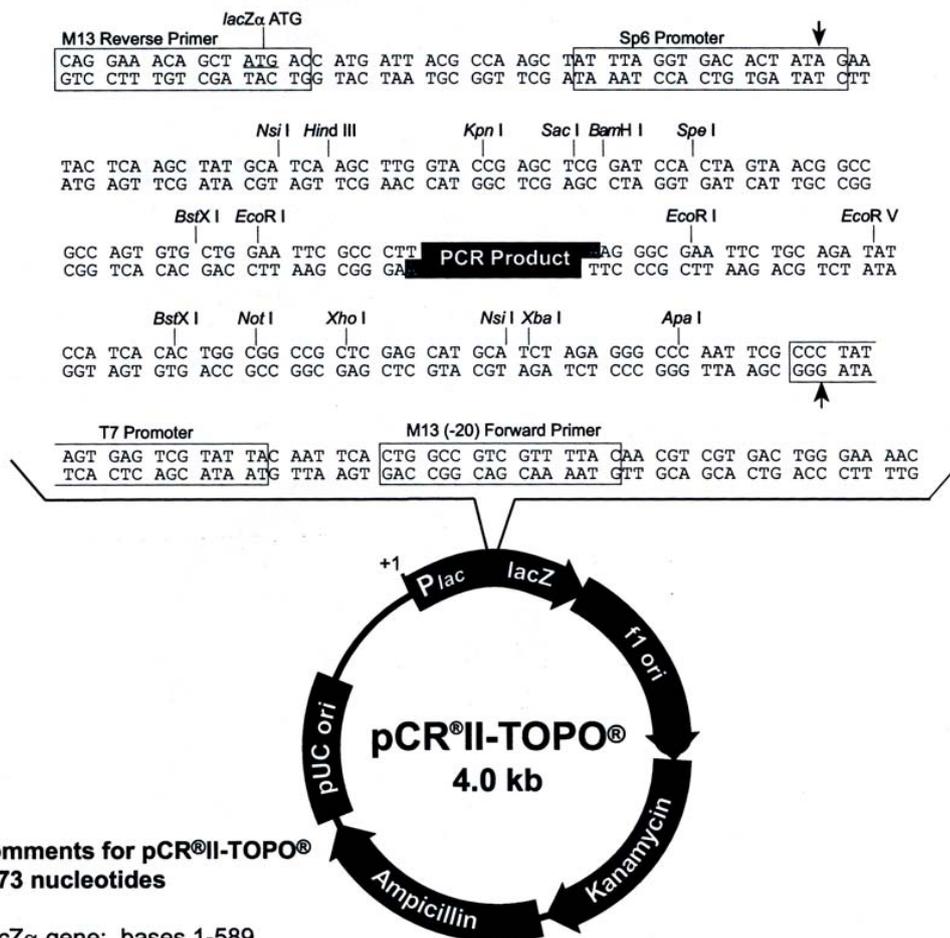


Abbildung 61.: Vektorkarte von pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen, Karlsruhe).

## 2. DNA- und Proteinstandards

### 2.1. GeneRuler™ 1kb DNA Leiter

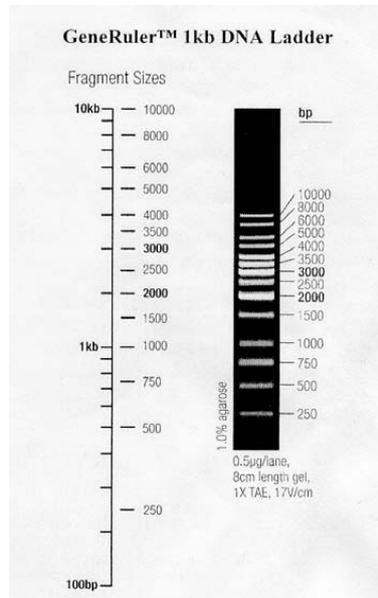


Abbildung 62.: GeneRuler™ 1kb DNA Leiter (Fermentas, St. Leon-Rot).

### 2.2. HyperLadder™ IV DNA Leiter

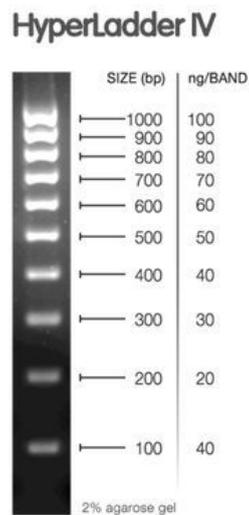


Abbildung 63.: HyperLadder™ IV DNA Leiter (Bioline, Luckenwalde).

## 2.3. Dual Color Protein-Marker

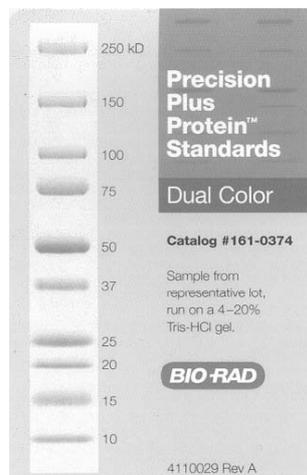


Abbildung 64.: Protein-Marker Dual Color für SDS-PAGE (Precision Plus Protein™ Standards Dual Color-Kit, Bio-Rad, München).

## 2.4. Protein Leiter 10-200 kDa

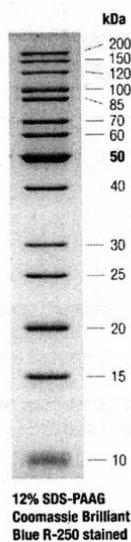


Abbildung 65.: Protein-Marker Protein Leiter 10-200 kDa für SDS-PAGE (Fermentas, St. Leon-Rot).

## 2.5. Protein-Marker für isoelektrische Fokussierung

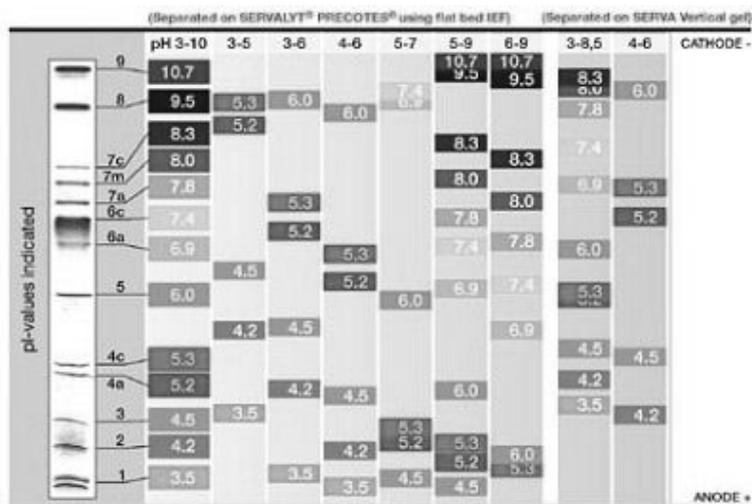


Abbildung 66.: Protein-Marker Servalyt® Precotes® 3-10 für die isoelektrische Fokussierung (Serva, Heidelberg).

### 3. Abkürzungsverzeichnis

$\Delta E$	Extinktionsdifferenz	DNase	Desoxyribonuklease
$\mu F$	Mikrofarad	DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
$\mu g$	Mikrogramm		
$\mu l$	Mikroliter		
$\mu S$	Mikrosiemens	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
Å	Angström	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
AAC	Anionenaustauschchromatographie	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
		EtOH	Ethanol
AcCN	Acetonitril	$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
AE	Arbeitselektrode	f oder for	forward
Amp	Ampicillin	g	Gramm
APS	Ammoniumpersulfat	GA	Glutardialdehyd
AS	Aminosäuren	GatDH	Galaktitol-Dehydrogenase
ASF	Ammoniumsulfatfällung	GE	Gegenelektrode
BE	Bezugselektrode	h	Stunde
BCA	Bicinchoninsäure	$H_2O_{deion.}$	deionisiertes Wasser
BisTris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl)-methan	$H_2O_{millipore}$	Millipore-Wasser
		HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
bp	Basenpaare		
BSA	Rinderserumalbumin	H/His	Histidin
bzgl.	bezüglich	His(6)	Poly(6)-Histidin-Rest
bzw.	beziehungsweise	HRP	Horseradish (Meerrettich)-Peroxidase
°C	Grad Celsius		
cm	Zentimeter	IEF	isoelektrische Fokussierung
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol	IP, pl	isoelektrischer Punkt
C-Terminus	Carboxylterminus	IPTG	Isopropylthiogalactosid
C-Quelle	Kohlenstoffquelle	Kan	Kanamycin
CTFM	(4-Carboxy-2,5,7-Trinitrofluorenyliden)-malonnitril	kb	Kilobasen
		kbp	Kilobasenpaare
		kDa	Kilodalton
CV	Cyclische Voltammetrie	KM	Komplexmedium
Cys	Cystein	l	Liter
d	Tag	LB	Lauria-Bertani
Da	Dalton	Lsg	Lösung
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	M	Molar
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	mA	Milliampere
DE	Deutschland	MALDI	Matrix assisted laser desorption ionisation
deion.	deionisiert		
DH	Dehydrogenase	mAU	Milliabsorption Units
dNTP's	Desoxyribonukleotid-triphosphat	MDH	Mannitol-Dehydrogenase
		MetOH	Methanol
ddNTP's	Didesoxyribonukleotid-triphosphat	mg	Milligramm
		min	Minuten
deion.	deionisiert	ml	Milliliter
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	mm	Millimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid	mM	Millimolar
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mRNA	messenger RNA

MS/MS	Tandem- Massenspektrometrie	UV w/v	Ultraviolett Gewicht/Volumen
MV	Mineral-Vitamin	v/v	Volumen pro Volumen
MW	Molekulargewicht	X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β-D-Galactopyranosid
m/z	Masse/Ladung		
NaAc	Natriumacetat	V	Volt
NAD	Nicotinsäureamid- Adenin-Dinukleotid	Vis x g	visible (UV/Vis-Spektren) -fache Erdbeschleunigung
NADH	reduziertes Nicotinsäure- amid-Adenin-Dinukleotid		
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin- Dinukleotid-Phosphat		
NADPH	reduziertes Nico- tinsäureamid- Adenin-Dinukleotid-Phosphat		
n. b.	nicht bestimmt		
nm	Nanometer		
nmol	Nanomol		
N-Terminus	Aminoterminus		
Ω	Ohm		
OD	Optische Dichte		
ORF	open reading frame		
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese		
PCIA	Phenol-Chloroform- Isoamylalkohol		
PCR	Polymerasekettenreaktion		
PEI	Polyethylenimin		
r oder rev	reverse		
rDNA	ribosomale DNA		
RDH	Ribitol-Dehydrogenase		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNase	Ribonuklease		
rpm	Umdrehungen pro min		
RT	Raumtemperatur		
s	Sekunde		
SAM	Self-assembled Monolayer		
SDH	Sorbitol-Dehydrogenase		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz		
TBE	Tris-Borat-EDTA		
TCA	Trichloressigsäure		
TE	Tris-EDTA		
TEMED	N'N',N'- Tetramethylethylendiamin		
TFA	Trifluoressigsäure		
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur		
TOF	Time of flight		
Tris	Tris(hydromethyl)-Amino- Methan		
U	Unit (Enzymeinheit)		
ü.N.	über Nacht		
Upm	Umdrehungen pro Minute		

# Abbildungsverzeichnis

1.	Modellreaktion für eine Enzym-gekoppelte Dinukleotid Regenerierung, die Oxidation von NADH durch die Laktat-Dehydrogenase. . . . .	5
2.	Modellreaktion für eine Enzym-gekoppelte Dinukleotid Regenerierung, die Reduktion von NAD <sup>+</sup> durch die Formiat-Dehydrogenase. . . . .	6
3.	Modellreaktion für eine Substrat-gekoppelte Dinukleotid Regenerierung, die Reduktion von NAD <sup>+</sup> durch Verwendung eines zweiten Hydroxylsubstrates. . .	7
4.	Modellreaktion für eine Substrat-gekoppelte Dinukleotid Regenerierung, die Oxidation von NADH durch Verwendung eines zweiten Ketonsubstrates. . . .	7
5.	Modellreaktion für eine direkte elektrochemische Dinukleotid Oxidation von NADH an der Anodenoberfläche. . . . .	9
6.	Modellreaktion für eine elektrochemische Dinukleotid Oxidation von NADH mittels eines Mediators an der Anodenoberfläche. . . . .	9
7.	Modellreaktion für eine direkte elektrochemische Dinukleotid Reduktion von NAD <sup>+</sup> an der Kathodenoberfläche. . . . .	10
8.	Modellreaktion für eine elektrochemische Dinukleotid Reduktion von NAD <sup>+</sup> mittels eines Mediators an der Kathodenoberfläche. . . . .	11
9.	Apparativer Aufbau für cyclovoltammetrische Messungen. . . . .	12
10.	Allgemeiner Aufbau eines Cyclovoltammogramms. . . . .	12
11.	Redoxreaktionen der Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH). . . . .	16
12.	Schematische Darstellung der SiteFinding-PCR Methode für ein Chromosom- <i>Walking</i> . . . . .	36
13.	Sequenzen zweier möglicher SiteFinder und deren Primer (SFP1 und SFP2). .	36
14.	SDS-PAGE der angereicherten unmodifizierten GatDH. . . . .	67
15.	1,4%iges TBE-Agarosegel der zweiten Nested-PCR der SiteFinding-Reaktion.	70
16.	Alignment der bei der SiteFinding-PCR amplifizierten Sequenz von Stamm <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D mit der in der Datenbank hinterlegten Sequenz des <i>type strains</i> 2.4.1. . . . .	73
17.	Schema des bei der SiteFinding-PCR ermittelten 1333 bp großen Sequenz- stücks von <i>Rhodobacter sphaeroides</i> D. . . . .	74

18.	Alignment der GntR- und GatDH-Nukleotidsequenz inklusive der nicht kodierenden Zwischensequenz der Stämme <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1, Si4 und D. . . . .	79
19.	Alignment der Aminosäure-Sequenzen der drei GntR-Varianten aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1, Si4 und D. . . . .	80
20.	Vergleich der -10-Region putativer Promotorsequenzen der untersuchten Stämme Si4 und D mit den in der Literatur für <i>Rhodobacter sphaeroides</i> beschriebenen Promotoren <i>puf</i> , <i>puc</i> , <i>bchC</i> , <i>cycA</i> und mit der Konsensussequenz $\sigma$ -abhängiger <i>E. coli</i> -Promotoren. . . . .	83
21.	Schematische Darstellung der pET24a(+)-Vektorkarte und Vergrößerung des für die Klonierung relevanten Sequenzabschnittes. . . . .	85
22.	Alignment der <i>upstream</i> des GatDH-Gens lokalisierten, nicht kodierenden Sequenz der Vorsequenz-Varianten aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4 und D. . .	86
23.	SDS-PAGE und Analyse der Proteinbanden der Vorsequenz-Varianten der Stämme Si4 und D. . . . .	87
24.	SDS-PAGE der Coexpression der GntR- und GatDH-Sequenz in den Stämmen Si4 und D. . . . .	90
25.	Ergebnisse der Mascot-Datenbanksuche mit den MALDI-Fingerprints der GntR-Probe aus Stamm Si4 und D und der GatDH-Probe aus Stamm D. . . . .	94
26.	Ergebnis der zweitstufigen RT-PCR. . . . .	101
27.	Bändermodell der Kristallstruktur einer Enzymuntereinheit der GatDH. . . . .	105
28.	SDS-PAGE der C-terminal verkürzten GatDH251-Variante. . . . .	106
29.	Elutionsdiagramm der Anionenaustauschchromatographie an Sepharose Q zur Anreicherung der verkürzten Variante GatDH251. . . . .	107
30.	Elutionsdiagramm der Gelfiltration an der Superdex S200-Säule zur Anreicherung der verkürzten Variante GatDH251. . . . .	108
31.	SDS-PAGE der verschiedenen Anreicherungsschritte der C-terminal verkürzten GatDH251. . . . .	109
32.	Sequenzabdeckung der bei der MALDI-Analyse ermittelten Peptidfragmente zum GatDH251-Protein. . . . .	112
33.	Halblogarithmische Eichgerade der Superdex S200-Gelfiltrationssäule zur Molekulargewichtsbestimmung der angereicherten verkürzten GatDH251. . . . .	113
34.	Elutionsdiagramm der angereicherten nativen GatDH an der Superdex S200-Säule. . . . .	114
35.	Native PAGE der angereicherten C-terminal verkürzten GatDH251. . . . .	115
36.	Mikroskopische Aufnahme der angereicherten C-terminal verkürzten GatDH251. . . . .	116

37.	Grafische Darstellung der Abnahme der Volumenaktivität des GatDH-Enzyms in Anwesenheit ansteigender Konzentrationen des kompetitiven Inhibitors 1-Hexanol im Oxidationsassay. . . . .	118
38.	Grafische Darstellung der Abnahme der Volumenaktivität des GatDH-Enzyms in Anwesenheit ansteigender Glutardialdehyd-Konzentrationen im Enzymassay. . . . .	120
39.	Balkenschema des Konstruktionsprinzips eines zweiten zusätzlichen Tags aus einer verschiedenen großen Anzahl von Cysteinen vor dem His(6)-Tag am N-Terminus des Enzyms. . . . .	121
40.	2,5%ige Agarose-Gelelektrophorese der mittels PCR amplifizierten, N-terminal modifizierten Varianten der GatDH. . . . .	122
41.	Schema der verschiedenen GatDH-Varianten: GatDH, NHis-GatDH und 2-5Cys-GatDH kloniert in den Expressionsvektor pET24a(+) (Novagene). . . . .	122
42.	SDS-Gelelektrophorese der Rohextrakte (links) und Pellets (rechts) der modifizierten GatDH-Varianten aus 25 ml Testansätzen. . . . .	123
43.	Anreicherung der NHis-GatDH an Nickelsepharose. . . . .	126
44.	SDS-PAGE der angereicherten NHis-GatDH. . . . .	127
45.	Anreicherung der 2Cys-GatDH an Nickelsepharose. . . . .	128
46.	SDS-PAGE der angereicherten 2Cys-GatDH. . . . .	129
47.	Isoelektrische Fokussierung der angereicherten NHis- und 2Cys-GatDH. . . . .	130
48.	SPR-Messung einer Goldelektrode nach Zugabe von 55 U/ml 2Cys-GatDH. . . . .	131
49.	Modifizierte Enzymelektrode mit 1,85 mM NAD <sup>+</sup> und 18,52 mM Calciumchlorid vor und nach Zugabe von 34,5 mM 1,2-Hexandiol, sowie nach der kathodischen Vorpolarisierung. . . . .	133
50.	Vergleich der CVs der mit 2Cys-GatDH modifizierten Goldelektrode bei 10 mV/s mit 1,85 mM NAD <sup>+</sup> , 18,52 mM Calciumchlorid und 0,74 mM CTFM in Lösung nach Zugabe von 34,5 mM 1,2-Hexandiol und kathodischer Vorpolarisierung bis -500 mV bei direkter Messung, ohne Cofaktor NAD <sup>+</sup> und nach 5 Tagen. . . . .	134
51.	Darstellung des $\lambda$ -Repressor/Operator-Dimerkomplexes. . . . .	139
52.	Schematische Darstellung der verschiedenen Konstrukte aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4 und D im Expressionswirt <i>E. coli</i> . . . . .	141
53.	Vergleich der möglichen genetischen Regulationselemente in der Vorsequenz der untersuchten Stämme Si4 und D. . . . .	147
54.	Cartoon-Darstellung des aktiven Tetramers (A) und eines Monomers (B) der Galaktitol-Dehydrogenase. . . . .	152
55.	Bindung eines Magnesiumions über die C-Termini zweier diagonal gegenüberliegender Monomere. . . . .	153

56. Cartoon-Darstellung der möglichen Dimerstrukturen der Galaktitol-Dehydrogenase. . . . .	154
57. Schematisches Prinzip der Immobilisierung der cysteinmodifizierten GatDH mit elektrochemischer Cosubstrat Regenerierung. . . . .	159
58. Cartoon-Darstellung der möglichen Bindungsalternativen der immobilisierten, cysteinmodifizierten GatDH. . . . .	164
59. Schematische Darstellung eines elektroenzymatischen Mikroreaktors im Reduktionsbetrieb. . . . .	167
60. Vektorkarte von pET24a(+) (Novagen, Darmstadt). . . . .	193
61. Vektorkarte von pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup> (Invitrogen, Karlsruhe). . . . .	194
62. GeneRuler <sup>™</sup> 1kb DNA Leiter (Fermentas, St. Leon-Rot). . . . .	195
63. HyperLadder <sup>™</sup> IV DNA Leiter (Bioline, Luckenwalde). . . . .	195
64. Protein-Marker Dual Color für SDS-PAGE (Precision Plus Protein <sup>™</sup> Standards Dual Color-Kit, Bio-Rad, München). . . . .	196
65. Protein-Marker Protein Leiter 10-200 kDa für SDS-PAGE (Fermentas, St. Leon-Rot). . . . .	196
66. Protein-Marker Servalyt <sup>®</sup> Precotes <sup>®</sup> 3-10 für die isoelektrische Fokussierung (Serva, Heidelberg). . . . .	197

# Tabellenverzeichnis

1.	Organismen zur Untersuchung auf Galaktitol-Dehydrogenase-Aktivität und der Sequenzumgebung des GatDH-Gens. . . . .	18
2.	In den Experimenten eingesetzte Stämme zur Zwischenklonierung und Expression. . . . .	18
3.	In den Experimenten eingesetzte Ausgangsplasmide und ihr Verwendungszweck. . . . .	19
4.	Zur Zwischenklonierung und Sequenzierung mit Hilfe des TOPO-TA-Klonierungskits konstruierte pCRII-TOPO-Plasmide. . . . .	19
5.	Expressionsvektor pET24a(+) (Novagen, Darmstadt) mit den integrierten Genen.	20
6.	In den Experimenten eingesetzte Primer. . . . .	21
7.	Den Medien zugesetzte Antibiotika und andere Chemikalien. . . . .	24
8.	Verwendete Restriktionsenzyme. . . . .	30
9.	Zusammensetzung der FastDigest™ Restriktionsansätze für Plasmid-/Vektor-DNA und PCR-Produkt (Insert). . . . .	30
10.	PCR-Ansätze für die verschiedenen DNA-Polymerasen. . . . .	33
11.	PCR-Programm für die verschiedenen DNA-Polymerasen. . . . .	33
12.	Colony-PCR-Mastermixe für je zehn Reaktionen. . . . .	35
13.	SiteFinding-Ansatz, die Reaktion wird vor der PCR mit dem SiteFinder <i>geprimed</i> .	37
14.	Ein-Zyklus-PCR-Programm für die SiteFinder-Reaktion mit niedriger Annealing-Temperatur. . . . .	37
15.	Nested-PCR-Ansatz 1 der SiteFinding-Reaktion. . . . .	38
16.	Nested-PCR-Ansatz 2 der SiteFinding-Reaktion. . . . .	38
17.	PCR-Programm für die Nested-Reaktionen der SiteFinding-Reaktion in Form einer Touchdown-PCR. . . . .	39
18.	Reaktionsansatz für die KOD QuikChange-PCR. . . . .	40
19.	PCR-Programm für die KOD QuikChange-PCR. . . . .	40
20.	Ansatz zur Erststrangsynthese für die RT-PCR. . . . .	41
21.	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels. . . . .	60

22. Anreicherung der unmodifizierten GatDH, heterolog exprimiert in <i>E. coli</i> aus einer 10 Liter Fermentation. . . . .	67
23. Ergebnistabelle der bei der MALDI-Analyse identifizierten Peptidmassen der verschiedenen Proben, die mit den bei einem theoretischen Trypsinverdau der Proteine über das Internet-Tool Protein Prospector erhaltenen Massenpeaks übereinstimmen. . . . .	92
24. Volumenaktivitäten der zellfreien Rohextrakte der rekombinanten GatDH Sequenzvarianten aus <i>R. sphaeroides</i> Si4 und D mit unterschiedlichen Sequenzelementen und -größen <i>upstream</i> des 5'-Endes der GatDH. . . . .	97
25. Vergleich der spezifischen Aktivitäten im Rohextrakt der mit einem His-Tag modifizierten GatDH-Varianten. . . . .	104
26. Vergleich der relativen Aktivitäten der angereicherten nativen GatDH vor und nach Dialyse und der verkürzten GatDH251. . . . .	106
27. Ergebnistabelle der bei der MALDI-Analyse identifizierte Peptidmassen der verschiedenen Proben der GatDH251 Anreicherung. . . . .	111
28. Verwendete Eichproteine bekannten Molekulargewichts und deren ermitteltes Retentionsvolumen von der Superdex S200-Säule zur Erstellung einer Eichgerade. . . . .	113
29. Untersuchung des Einflusses verschiedener Konzentrationen des kompetitiven Inhibitors 1-Hexanol [c(1-Hexanol)] auf die Aktivität der nativen GatDH im Oxidationsassay. . . . .	117
30. Untersuchung des Einflusses verschiedener Glutardialdehyd-Konzentrationen auf die Volumenaktivität des angereicherten GatDH-Enzyms. . . . .	119
31. Gesamt- und spezifische Aktivitäten der rekombinanten GatDH-Varianten aus 250 ml Kulturen. . . . .	124
32. Anreicherung der N-terminal His-getagten GatDH (NHis-GatDH) aus einer 250 ml Kultur. . . . .	127
33. Anreicherung der N-terminal mit zwei Cysteinen modifizierten und His-getagten GatDH (2Cys-GatDH) aus einer 250 ml Kultur. . . . .	129
34. Aus den durchgeführten Experimenten erhaltene Argumente für und gegen eine Repression der GatDH-Expression im Stamm <i>Rhodobacter sphaeroides</i> Si4 durch das GntR-ähnliche Protein. . . . .	145

# Lebenslauf

Geburtsdatum und -ort:	14. 04. 1981 in 66538 Neunkirchen
08/ 1987 - 06/ 1992	Grundschule Scheib, 66538 Neunkirchen
08/ 1992 - 06/ 2000	Gymnasium Am Krebsberg, 66538 Neunkirchen
06/ 2000	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/ 2000 - 11/ 2005	Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken
11/ 2005	Abschluss: Diplom
02/ 2006 - 02/ 2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität des Saarlandes, ZHMB, Institut für Angewandte Mikrobiologie
seit 02/ 2006	Promotion am Institut für Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig 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.

---

Ort, Datum