

Molekulare Evolution von Dehydrogenase- Varianten zur Herstellung enantiomerenreiner Feinchemikalien

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

vorgelegt von

Sabrina Gauer

Saarbrücken, im September 2011

Tag des Kolloquiums: 16. Dezember 2011

Dekan: Prof. Dr. Wilhelm F. Maier

Prüfungsausschuss:
Prof. Dr. Friedrich Giffhorn (1. Berichterstatter)
Prof. Dr. Manfred J. Schmitt (2. Berichterstatter)
Prof. Dr. Rolf Hempelmann (Vorsitzender)
Dr. Katrin Kaufmann (Akademische Beisitzerin)

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, 7th Framework Program of the European Commission, Contract Reference CP-FP 213487-2) gefördert.

Während dieser Arbeit entstandene Veröffentlichungen:

Publikation in Vorbereitung:

Gauer S., Otten H., Wang Z., Bjerrum M.J., Etienne M., Walcarius A., LoLeggio L. and Kohring G.W. (2011). Biochemical, structural and electrochemical characterization of LSDH from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110.

Poster und Tagungsbeiträge:

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

Heterologous expression of an aldolase from *Sphingobium herbicidovorans* FA3g and establishment of a photometric test for aldolase activity.

VAAM-Jahrestagung 2008, Frankfurt am Main

Gauer S., Giffhorn F. and Kohring G.W.:

Screening, Isolation and characterisation of L-glucitol-dehydrogenases for the production of D-sorbose.

VAAM-Jahrestagung 2009, Bochum

Otten H., Gauer S., Kohring G.W., LoLeggio L.:

Quarternary structure evaluation of dehydrogenases.

1st *Symposium on Systems Structural Biology* 2009, Hamburg

Gauer S., Søndergaard C., Jensen J., Giffhorn F., Kohring G.W.:

D-sorbose producing L-sorbitol-dehydrogenases (LSDH): enzymes from database screening and directed mutagenesis or directed evolution of D-sorbitol-dehydrogenase (DSDH) for chiral reorientation.

VAAM-Jahrestagung 2010, Hannover und 4th ERUDES Meeting, Bordeaux, Frankreich

Otten H., Gauer S., Navarro-Poulsen, J.C., Bjerrum M.J., Kohring G.W., LoLeggio L.:

Crystallization and Preliminary Characterization of *Bradyrhizobium japonicum* L-Sorbitol Dehydrogenase.

40th *Danish Crystallographer and 3rd DANSCATT Meeting* 2010, Kopenhagen

Gauer S., Kohring G.W., Otten H., LoLeggio L., Giffhorn F.:

L-sorbitol-dehydrogenase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110: bioconversions for the production of D-sorbose.

5th ERUDESCP-Meeting, Kuşadasi, Türkei

Gauer S., Otten H., LoLeggio L., Bjerrum M.J., Giffhorn F. and Kohring G.W.:

L-sorbitol-dehydrogenase from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110: cloning and characterisation of an interesting enzyme for rare sugar synthesis.

VAAM-Jahrestagung 2011, Karlsruhe

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

Modified galactitol-dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* for redox activity with electrochemical cofactor regeneration.

European BioPerspectives, Hannover 2008

Kohring G.W., Gauer S., Kornberger P., Gumhold C., Gajdzik J., Hempelmann R, Søndergaard C., Jensen J., Christian H., Faust A., Scheidig A.J., Giffhorn F.:

Modified galactitol-dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D for electrochemical applications.

VAAM-Jahrestagung 2011, Karlsruhe

Vorträge im Rahmen der ERUDESCP-Meetings:

Protein engineering with evolutive methods and rational design.

3rd ERUDESCP-Meeting, Kopenhagen, Dänemark

4th ERUDESCP-Meeting, Bordeaux, Frankreich

5th ERUDESCP-Meeting, Kuşadasi, Türkei

6th ERUDESCP-Meeting, Saarbrücken, Deutschland

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Friedrich Giffhorn für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen.

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

Dr. Gert-Wieland Kohring danke ich für die Möglichkeit, an diesem interessanten Projekt mitarbeiten und meine Ergebnisse regelmäßig bei den Meetings präsentieren zu können. Danke auch für die fachlichen Diskussionen rund um meine Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Kollegin und Freundin Martina Pitz, nicht nur für die zahlreichen Diskussionen und ihr Wissen, das sie bereitwillig mit mir geteilt hat, sondern auch für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft. Sie ist einfach zu gut für die Welt.

Vielen Dank auch an Marie-Louise Kaiser, die mit ihrer gar nicht so typischen nordischen Art unser Labor sehr bereichert hat.

Herzlichen Dank auch an die beiden Diplomanden Tobias Klein und Catalina Gumhold und die „Bachelorette“ Emilie Wilhelm, die mit ihren Experimenten einen wesentlichen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet haben.

Ein weiteres Dankeschön gilt unserer TA Birgit Hasper, die mit ihrem immensen Wissen immer zur Stelle war, wenn mir mal die Ideen ausgingen. Danke auch für die frühmorgendlichen Gespräche im sonst noch leeren Labor. Herrn Klaus Witte danke ich für die Einführung in verschiedenste chromatographische Methoden und die IEF.

Danke, danke, danke auch an die beiden Sekretärinnen Nicole Jundel und Juncal Z. Gonzalez, die uns mit ihrem unermüdlichen Einsatz den Alltag oft sehr erleichtert haben. Nicole, danke für deine erfrischende Art und für die vielen nützlichen Tipps auch nachdem du nicht mehr für uns „zuständig“ warst. Juncal, danke für dein spanisches Temperament, durch das so mancher Verwaltungsakt und so manche Reparatur etwas schneller als üblich abgelaufen ist.

Allen weiteren Mitarbeitern der AG Giffhorn und der AG Römisch danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit. Außerdem danke ich den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Manfred Schmitt und Prof. Dr. Elmar Heinzle für die gegenseitige Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen und zahlreiche gemeinsame Pizza-Bestellungen. Ein besonderes Dankeschön geht dabei an Dr. Christoph Hollemeyer für die MALDI-TOF-Untersuchungen.

Allen Mitstreitern des Projekts ERUDESP danke ich sehr herzlich für die gute Kooperation und die interessanten Meetings. Mein besonderer Dank gilt dabei Harm Otten für die Aufklärung der Kristallstruktur der LSDH, Dr. Chresten Søndergaard für die unermüdlichen bioinformatischen Arbeiten und die Umsetzung meiner - manchmal doch recht ungewöhnlichen - Einfälle und Zhijie Wang und Dr. Mathieu Etienne für die CV-Messungen. Außerdem geht ein herzliches Dankeschön an Frau Prof. Dr. Roxanna Piticescu, die mich immer sehr motiviert hat.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch unserer Kochrunde, bestehend aus Martina Müller und Walter Paul, Martina Stemmler und Werner Faller, Sandra und Michael Grill und Sonja und Uwe Wahrheit, die sich immer für meine Arbeit interessierten, mich auch an tiefsten Punkten der Demotivation immer wieder zum Weitermachen ermuntert, aber manchmal auch zurück auf den Boden der Tatsachen geholt haben. Ich hoffe, wir werden auch in Zukunft noch so oft es geht unsere Kochkünste, die bisher durchweg sagenhaft waren, teilen.

Einen besonderen Menschen möchte ich nicht vergessen: meinen Lebensgefährten Torsten Gemperlein. Danke für deine Liebe, deine Unterstützung und Geduld, für das Ertragen zahlreicher „Panikattacken“ und meiner schlafwandlerischen und -rednerischen Aktivitäten sowie für die Ablenkungen zum richtigen Zeitpunkt. Danke dafür, dass du so bist wie du bist und dass du immer an mich geglaubt hast.

Nicht zuletzt ein liebes Dankeschön an meine Mutter Hildegard Gauer, ihren Lebensgefährten Franz-Josef Brocker und an meinen Vater Albrecht Gauer, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg in jeder erdenklichen Weise unterstützt und mir immer gezeigt haben, wie stolz sie auf mich sind. Vielen Dank auch an meine Schwiegerfamilie inspe: Herbert Gemperlein, Christa Benz und Fabian Gemperlein.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Biologische Bedeutung von Kohlenhydraten	1
2. Dehydrogenasen	4
3. Enzymatische und elektrochemische Cosubstratregenerierung	7
3.1 Enzymatische Cosubstratregenerierung	7
3.2 Elektrochemische Cosubstratregenerierung	9
4. Verwendete Enzyme	13
4.1 L-Sorbitol-Dehydrogenase (LSDH) aus <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110.....	13
4.2 Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	14
4.3 D-Mandelat-Dehydrogenase (DMDH) aus <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	16
4.4 L-Mandelat-Dehydrogenase (LMDH) aus <i>Pseudomonas putida</i>	18
4.5 Diaphorase aus <i>Clostridium kluyveri</i>	19
5. Protein-Engineering	21
6. Ziele der Arbeit	22
II. Material und Methoden	25
1. Organismen, Primer, Vektoren und Plasmide	25
1.1 Organismen	25
1.1.1 Bodenisolat	25
1.1.2 Referenzstämme	25
1.1.3 <i>E. coli</i> -Stämme für die Klonierung und Expression von PCR-Fragmenten	25
1.1.4 Sonstige Stämme.....	26
1.1.5 Stammhaltung und Lagerung	27
1.2 Primer	27
1.3 Vektoren und Plasmide	30
2. Herstellung von L-Sorbitol	33
3. Nährmedien und Zusätze	33
4. Isolierung von Mikroorganismen aus Boden- und Wasserproben	38
4.1 Anreicherung auf festen Nährmedien	38
4.2 Anreicherung in Flüssigkultur.....	38
4.3 Bestimmung von Wachstumsparametern.....	38
4.3.1 Optische Dichte.....	38
4.3.2 Wachstumsrate μ und Verdopplungszeit t_d	39
4.4 Herstellung zellfreier Rohextrakte	39
5. Taxonomische Untersuchungen	40
5.1 Bestimmung des Gram-Typs: Gramfärbung, KOH-Test, Aminopeptidase-Test	40
5.2 Katalase- und Cytochromoxidase-Nachweis.....	41

5.3 Verwertbarkeit von Zuckern: <i>Hugh-Leifson</i> -Test und Bunte Reihe	42
5.4 Nachweis von Exoenzymen: Caseinase-Nachweis und Stärkehydrolyse	43
5.5 Genetische Bakterienidentifizierung mithilfe der 16S-rDNA-Sequenzanalyse	44
5.5.1 Isolierung der genomischen Bakterien-DNA	44
5.5.2 Amplifikation des bakteriellen 16S-rDNA-Fragments	45
6. Gentechnische Standardmethoden.....	46
6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (alkalische Lyse)	46
6.1.1 Plasmid-Minipräparation.....	46
6.1.2 <i>Toothpick</i> -Minipräparation (Sambrook und Russell, 2001)	47
6.2 Isolierung genomischer DNA aus Spinat (<i>Spinacia oleracea</i>).....	47
6.3 Agarose-Gelelektrophorese	48
6.4 Reisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	49
6.5 Klonierung von PCR-Fragmenten.....	49
6.5.1 TOPO-TA-Klonierung	49
6.5.2 Klonierung in den Expressionsvektor pET-24a(+)	50
6.5.3 Ligationskontrolle durch <i>Colony</i> -PCR	52
6.6 DNA-Sequenzierung	53
6.7 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Transformation mit Plasmid-DNA	54
7. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	55
7.1 Ortsgerichtete Mutagenese.....	57
7.1.1 KOD-QuikChange und Iterative Sättigungsmutagenese (ISM)	57
7.1.2 <i>Splicing by overlap extension</i> (SOE-PCR)	59
7.2 Zufallsmutagenese: <i>error-prone</i> -PCR.....	61
8. Expression rekombinanter Gene in <i>E. coli</i>.....	62
8.1 Expression im Erlenmeyerkolben.....	62
8.2 Expression in Mikrotiterplatten.....	63
8.3 Coexpression mit Chaperonen.....	63
9. Zellernte und Herstellung zellfreier Extrakte	65
9.1 Herstellung des Rohextrakts	65
9.2 Präparation der Vesikelfraktion aus <i>Pseudomonas putida</i> und <i>E. coli</i>	66
10. Enzymanreicherung.....	67
10.1 Ammoniumsulfatfällung	67
10.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC).....	67
10.3 Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (HisTrap)	68
11. Proteinbestimmung	69
11.1 Umpufferung.....	69
11.2 BCA-Assay nach Pierce zur Bestimmung des Proteingehalts.....	69
12. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970)	70
13. Enzym-Varianten mit Protease-Schnittstelle für die Kristallisation	72
13.1 Konstruktion von Enzym-Varianten mit Thrombin-Schnittstelle	73
13.2 Abspaltung des His ₆ -Tags	73
14. Bestimmung von Enzymaktivitäten	74
14.1 Bestimmung von Extinktionskoeffizienten.....	75

14.2 Küvettentest.....	75
14.3 Screening verbesserter Enzymvarianten im Mikrotiterplattenmaßstab	77
14.3.1 Colorimetrischer Assay (Mayer und Arnold, 2002)	77
14.3.2 Assay basierend auf NADH-Fluoreszenz (Kerstens, 1967).....	77
15. Biokonversionen	78
15.1 Analytische Umsätze mit LSDH.....	78
15.2 Produktbestimmung durch HPLC.....	78
16. Biochemische Charakterisierung von Enzym-Varianten	79
16.1 Isoelektrische Fokussierung.....	79
16.2 Bestimmung von K_m -Werten und Berechnung von k_{cat}	80
16.3 Bestimmung der maximalen Temperatur	81
16.4 Bestimmung der Temperaturstabilität.....	81
16.5 Bestimmung des pH-Optimums.....	81
16.6 Bestimmung des Molekulargewichts durch Gelfiltration und native PAGE.....	81
16.6.1 Gelpermeationschromatographie	81
16.6.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Native PAGE)	82
17. MALDI-TOF.....	83
17.1 Tryptischer in-Gel-Verdau	83
17.2 MALDI-TOF	84
III. Ergebnisse	86
1. Screening nach bakteriellen L-Sorbitol-Dehydrogenasen	86
1.1 Anreicherung von Mikroorganismen auf L-Sorbitol-Screening-Agar	86
1.2 Identifizierung und Charakterisierung von Bodenisolat K5	87
1.2.1 Bestimmung des Gram-Typs: Gramfärbung, KOH-Test, Aminopeptidase-Test	87
1.2.2 Katalase- und Cytochromoxidasenachweis.....	88
1.2.3 Weitere Tests zur Stammidentifizierung	89
1.2.4 Identifizierung mit Hilfe der 16S-rDNA-Analyse	89
1.3 Aktivitätstests und Anreicherung der LSDH aus K5	94
1.4 Tryptischer In-Gel-Verdau und MALDI-TOF-Analyse der LSDH aus K5.....	95
1.5 Isolation genomischer DNA und PCR-Amplifikation des LSDH-Gens	97
1.6 Klonierung und heterologe Expression des LSDH-Gens.....	97
1.7 Optimierung der Anzuchtbedingungen.....	99
1.8 Coexpression von Chaperonen.....	100
2. L-Sorbitol-Dehydrogenase (LSDH) aus <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	103
2.1 Amplifikation und Klonierung der LSDH aus <i>B. japonicum</i> USDA110	103
2.1.1 Isolation genom. DNA aus <i>B. japonicum</i> und Amplifikation des LSDH-Gens ..	103
2.1.2 TOPO-TA-Klonierung	104
2.1.3 Umklonieren in den Expressionsvektor pET-24a(+) und heterologe Expression	
der LSDH.....	105
2.1 Amplifikation und Klonierung his_6 -getaggtter LSDH-Varianten.....	106
2.2 Heterologe Expression und Anreicherung der his -getaggtten LSDH-Varianten.....	107
2.3 Bestimmung des pH-Optimums der LSDH.....	109
2.4 Bestimmung der maximalen Temperatur der LSDH	109
2.5 Bestimmung der Temperaturstabilität der LSDH.....	110
2.6 Sequenz- und Stabilitätsvergleiche mit ähnlichen Dehydrogenasen.....	112
2.7 Bestimmung des Substratspektrums der LSDH.....	115

2.9 Native PAGE und Gelfiltration.....	115
2.9.1 Native PAGE.....	116
2.9.2 Gelfiltration.....	117
2.10 Bestimmung der kinetischen Parameter der LSDH.....	118
2.10.1 L-Sorbitol und D-Sorbitol.....	119
2.10.2 D-Fructose.....	120
2.10.3 NAD ⁺ und NADH+H ⁺	120
2.11 Isoelektrische Fokussierung.....	121
2.12 Biokonversionen.....	122
2.12.1 Bestimmung der Retentionszeiten der Standardsubstanzen mittels HPLC ...	123
2.12.2 Biokonversion mit L-Sorbitol und Produktbestimmung durch HPLC.....	123
2.12.3 Biokonversion mit D-Sorbitol und Produktbestimmung mit HPLC.....	125
2.13 Konstruktion von Cystein-getaggten Varianten für elektrochemische Anwendungen.....	126
2.14 Konstruktion einer Variante mit Proteaseschnittstelle und Abspaltung des His ₆ -Tags.....	128
2.15 LSDH-Aktivitätsnachweis durch Cyclovoltammetrie.....	130
3. Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	134
3.1 Heterologe Expression der his ₆ -getaggten GatDH und ihrer Varianten und Bestimmung der Enzymaktivität.....	134
3.2 Anreicherung der N-terminal His ₆ -getaggten GatDH-Variante.....	134
3.3 Optimierung der Temperaturstabilität der GatDH.....	136
3.2.1 Rationales Design.....	137
3.2.2 Iterative Sättigungsmutagenese (ISM).....	139
3.2.3 Generierung neuer Disulfidbrücken am Dimer-Dimer-Interface durch ortserichtete Mutagenese (Bjørk et al., 2003).....	140
4. Mandelat-Dehydrogenasen aus <i>Pseudomonas putida</i> (LMDH) und <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (DMDH).....	144
4.1 Amplifikation des LMDH-Gens aus der genomischen DNA von <i>P. putida</i> bzw. des DMDH-Gens aus der genomischen DNA von <i>L. lactis</i>	145
4.2 Klonierung der MDH-Gene aus <i>P. putida</i> und aus <i>L. lactis</i>	146
4.2.1 TOPO-TA-Klonierung.....	146
4.2.2 Umklonieren in den Expressionsvektor pET-24a(+).....	146
4.3 Heterologe Expression der MDH aus <i>P. putida</i> bzw. aus <i>L. lactis</i>	149
5. Anreicherung und Charakterisierung der DMDH aus <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	150
5.1 Klonierung und heterologe Expression einer N-terminal His ₆ -getaggten Variante der DMDH aus <i>L. lactis</i>	150
5.2 Anreicherung der DMDH aus <i>L. lactis</i>	151
5.3 Charakterisierung der DMDH aus <i>L. lactis</i>	152
5.3.1 Bestimmung der Enzymaktivität.....	152
5.3.2 Bestimmung des pH-Optimums.....	153
5.3.3 Bestimmung der maximalen Temperatur.....	153
5.3.4 Native PAGE und Gelfiltration zur Größenbestimmung.....	154
5.3.4.1 Native PAGE.....	154
5.3.4.2 Gelfiltration.....	155
5.3.5 Isoelektrische Fokussierung.....	155
5.3.6 Bestimmung der kinetischen Parameter der MDH aus <i>L. lactis</i>	156
5.3.6.1 K _m -Wert für D-Mandelat, Wechselzahl k _{cat} und katalytische Effizienz.....	156
5.3.6.2 K _m -Wert für NAD ⁺	157

6. Verbesserung der Löslichkeit der LMDH aus <i>P. putida</i>	158
6.1 Nachweis der LMDH-Aktivität in der Vesikelfraktion von <i>P. putida</i> und von rekombinantem <i>E. coli</i>	158
6.2 Deletion der Aminosäuren 177-215 bzw. 177-229 der LMDH aus <i>P. putida</i>	158
6.3 Konstruktion der chimären Proteine MDH/GOX_1 und MDH/GOX_2	160
6.4 Klonierung und Expression der beiden chimären Proteine in <i>E. coli</i> und Bestimmung der Enzymaktivität	162
7. Diaphorase aus <i>Clostridium kluyveri</i>	164
7.1 Amplifikation des Diaphorase-Gens aus der genomischen DNA von <i>C. kluyveri</i> ...	164
7.2 Klonierung des Diaphorase-Gens aus <i>C. kluyveri</i>	165
7.2.1 TOPO-TA-Klonierung des Diaphorase-Gens.....	165
7.2.2 Klonierung des Diaphorase-Gens in den Expressionsvektor pET-24a(+)	165
7.3 Amplifikation N- bzw. C-terminal His ₆ -getaggtter Varianten des Diaphorase-Gens	167
7.4 Klonierung Histidin ₆ -getaggtter Varianten des Diaphorase-Gens	168
7.5 Heterologe Expression des Diaphorase-Gens und der his-getaggtten Varianten	168
7.6 Anreicherung heterolog exprimierter Diaphorase.....	169
7.7 Bestimmung der kinetischen Parameter der Diaphorase	171
7.8 Isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung des pI.....	172
IV. Diskussion	174
1. Screening von Boden-Organismen auf L-Sorbitol-Dehydrogenase-Aktivität und Identifizierung von K5	175
2. LSDH aus K5	179
3. LSDH aus <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	181
3.1 Klonierung, heterologe Expression des LSDH-Gens und Anreicherung des rekombinanten Enzyms	181
3.2 Biochemische Charakterisierung der LSDH	183
3.3 Biokonversionen zur Herstellung von D-Sorbitose mit Hilfe der LSDH	186
3.4 Weitere Varianten der LSDH: LSDH-Cys, LSDH-2Cys und LSDH-Thrombin	188
3.5 Aktivitätsnachweis durch Cyclovoltammetrie.....	189
4. GatDH aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	190
4.1 Anreicherung der GatDH-NHis	191
4.2 Optimierung der Temperaturstabilität der GatDH	191
5. Mandelat-Dehydrogenase aus <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (DMDH) und aus <i>Pseudomonas putida</i> (LMDH)	200
5.1 DMDH aus <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	200
5.1.1 Klonierung, heterologe Expression des DMDH-Gens und Anreicherung des rekombinanten Enzyms.....	201
5.1.2 Biochemische Charakterisierung der DMDH	201
5.2 LMDH aus <i>Pseudomonas putida</i>	203
5.2.1 Klonierung und heterologe Expression des LMDH-Gens.....	205
5.2.2 Konstruktion zweier Deletionsmutanten der LMDH und der beiden Chimären aus LMDH und GOX und die Auswirkungen auf die Löslichkeit der Enzyme	205
6. Diaphorase aus <i>Clostridium kluyveri</i>	207

6.1 Klonierung, heterologe Expression des Diaphorase-Gens und Anreicherung des rekombinanten Enzyms	208
6.2 Biochemische Charakterisierung der Diaphorase.....	210
V. Zusammenfassung	212
VI. Summary	213
VII. Anhang	214
1. Vektorkarten	214
1.1 <i>E. coli</i> -Expressionsvektor pET-24a(+).	214
1.2 Klonierungsvektor pCR®II-TOPO®	215
2. Protein- und DNA-Standards	216
2.1 Protein-Standards	216
2.2 DNA-Standards.....	217
3. Abkürzungsverzeichnis	218
4. Literaturverzeichnis.....	220
Lebenslauf	245

I. Einleitung

1. Biologische Bedeutung von Kohlenhydraten

Kohlenhydrate oder Saccharide bilden eine biologisch bedeutsame Stoffklasse und machen als Produkt der Photosynthese den größten Teil der Biomasse aus. Zusammen mit Fetten und Proteinen stellen sie den größten verwertbaren und nicht-verwertbaren (Ballaststoffe) Anteil an der Nahrung, erfüllen vielfältige Funktionen in allen Lebensformen und stellen die häufigsten organischen Verbindungen der Erde dar. So spielen sie zum Beispiel eine zentrale Rolle als physiologischer Energieträger, als Stützsubstanz vor allem im Pflanzenreich, und als aminierte Verbindungen in der Bakterienzellwand, im Exoskelett der Arthropoden und in biologischen Signal- und Erkennungsprozessen. Sie sind mit Proteinen und Lipiden verknüpft und bilden die Grundgerüste von DNA und RNA (Stryer et al., 2003). Außerdem bilden Kohlenhydrate 95% der jährlich nachwachsenden 200 Milliarden Tonnen an Biomasse, weshalb sie ein großes, bisher weitgehend ungenutztes Reservoir nachwachsender Rohstoffe darstellen, das zur industriellen Nutzung bereit steht (Lichtenthaler et al., 1993).

Aufgrund ihrer vielseitigen Funktionen sowie ihres ubiquitären Vorkommens gewinnen die Synthese und der Einsatz von speziellen Kohlenhydraten zunehmend Interesse in Chemie, Biotechnologie und Medizin. Kohlenhydratderivate finden außerdem Anwendung als Zuckeraustauschstoffe und Emulgatoren in der Nahrungsmittelindustrie, als glykosidische Tenside, Frostschutzmittel und als Bausteine für Arzneimittel und Antibiotika (Drueckhammer et al., 1991). Besondere Beachtung gilt hierbei den seltenen Zuckern. Sie finden Anwendung in der Synthese von Herzglykosiden, Aminoglykosiden, die zu den Antibiotika zählen, sowie in der Herstellung von Zellproliferationsinhibitoren und Virostatika und spielen eine Rolle als Glycosidase-Inhibitoren (Asano et al., 2003). Das Antikoagulanzen Heparin sowie der Impfstoff gegen *Haemophilus influenzae* Typ b basieren auf Kohlenhydraten, viele weitere Wirkstoffe befinden sich noch in der Testphase (Alper, 2001).

Die chemische Synthese seltener Zucker ist aufgrund ihres multifunktionellen und chiralen Charakters nur unter der Verwendung von Schutzgruppen möglich und führt zu geringen Ausbeuten (Röper, 1991; Stoppok et al., 1992; Whiteside und Wong, 1985). Seltene Zucker und ihre Derivate werden daher zunehmend durch eine Kombination von chemischen und enzymatischen Synthesen dargestellt, wozu passende Biokatalysatoren benötigt werden.

Die natürlichen Zucker treten überwiegend als D-Enantiomer auf. Die Sorbose jedoch bildet hierbei eine Ausnahme: ihre natürliche Konformation ist die L-Form. Es besteht ein wachsendes Interesse an der Darstellung ungewöhnlicher Enantiomere, da sie vielfältig

eingesetzt werden können (Mayers-Küntzer, 1993). Diese ungewöhnlichen Zucker stehen ihren häufiger vorkommenden Enantiomeren in ihrem süßen Geschmack keineswegs nach, schmecken teilweise sogar süßer als sie (Shallenberger et al., 1969). Die selten vorkommenden Enantiomere haben also ein hohes Potential als kalorienarme bzw. -freie Zuckeraustauschstoffe (Sasajima und Sinskey, 1979; Szarek et al., 1984). Pharmakologisch können sie als Marker bei Transportprozessen und als Bestandteile von Antibiotika interessant sein (Schwab et al., 1992; Minister und Hecht, 1978). Durch die Verbindung von stark wirksamen Arzneimitteln mit geeigneten Zuckern wird eine differenzierte und selektive Membranpermeabilität erreicht, welche den Weg zum Erfolgsorgan öffnen soll. Dadurch können die Dosierung reduziert, die Nebenwirkungen vermieden und die Toxizität herabgesetzt werden. Anwendungen hierfür sind bereits für gewisse Zentren im Hypothalamus, im Herz und in der Bauchspeicheldrüse bekannt (Hofer, 1969).

Vor wenigen Jahren wurde speziell den L-Hexosen als Ausgangsmaterial für die Produktion verschiedener nützlicher Chemikalien vermehrtes Interesse entgegen gebracht (Izumori, 2002). So wurde zum Beispiel die Anwendung der L-Fructose als Energiequelle (Klein et al., 1993) und die Bedeutung für den Energie-Metabolismus in Ratten (Livesey und Brown, 1995) untersucht. L-Fructose hemmt das Glycoprotein-Processing (Muniruzzaman et al., 1996) und L-Galactose bildet ein Intermediat bei der Vitamin-C-Biosynthese in höheren Pflanzen (Wheeler et al., 1998).

Ko et al. (1983) beschrieben eine chemische Methode zur Synthese von L-Aldohexosen. Izumori (2002) entwickelte eine effektive Strategie zur Synthese aller acht Keto-hexosen. Dabei dienten sechs Hexitole als Intermediate. Nach erfolgreicher Synthese der Keto-hexosen ist es möglich, die Aldohexosen aus den Keto-hexosen durch geeignete Isomerasen herzustellen (Izumori, 2002). So wurden mit Hilfe der D-Tagatose-3-Epimerase aus *Pseudomonas cichorii* ST-24 (Ishida et al., 1997), die die Epimerisierung von Keto-hexosen an der C-3-Position katalysiert (Itoh et al., 1994), D- Psicose aus D-Fructose (Itoh et al., 1995[1]; Takeshita et al., 2000), D-Sorbose aus D-Tagatose (Itoh et al., 1995[2]), L-Fructose aus L-Psicose (Itoh und Izumori, 1996) und L-Tagatose aus L-Sorbose (Itoh und Izumori, 1996) hergestellt. Die D-Tagatose-3-Epimerase bildet das Schlüsselenzym des sogenannten „Izumoring“ (Izumori, 2002). Weitere Enzyme, die am Izumoring beteiligt sind, sind Polyol-Dehydrogenasen, die Oxidations-Reduktions-Reaktionen zwischen Keto-hexosen und ihren korrespondierenden Hexitolen katalysieren, und Aldose-Isomerasen, die die Isomerisierung zwischen Aldohexosen und ihren korrespondierenden Aldoketosen katalysieren (Izumori, 2006). Mit Hilfe von Polyol-Dehydrogenasen konnten D-Tagatose aus Galaktitol (Izumori et al., 1984) und L-Tagatose aus Galaktitol (Shimonishi et al., 1995) hergestellt werden. In der

Reduktionsreaktion mit Hilfe von Polyol-Dehydrogenasen konnten D-Talitol aus D-Tagatose (Muniruzzaman et al., 1994), Allitol aus D-Psicose (Muniruzzaman et al., 1995), D-Talitol aus D-Psicose (Sasahara et al., 1998) und D-Iditol aus D-Sorbose (Sasahara und Izumori, 1999) hergestellt werden.

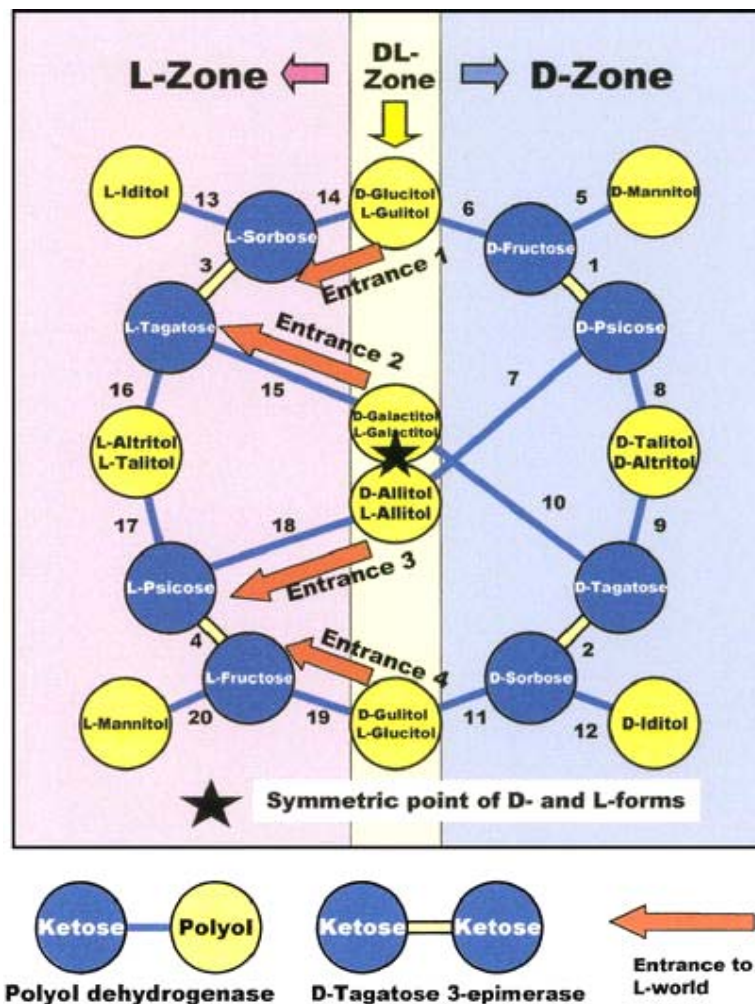


Abbildung I.1: Izumoring: eine Strategie zum Design der Produktions-Prozesse aller Keto-hexosen. Im blauen Bereich befinden sich D-Hexosen, im rosafarbenen Bereich die L-Hexosen. Hexitole und *meso*-Hexitole sind gelb unterlegt. Die orangefarbenen Pfeile zeigen den Übergang zwischen D- und L-Bereich. Der schwarze Stern in der Mitte kennzeichnet den Symmetriepunkt der D- und L-Zucker (Izumori, 2002).

Ein Beispiel für eine Aldose-Isomerase ist die D-Xylose-Isomerase, die bei der Umwandlung von D-Glucose in D-Fructose bei der industriellen Produktion von „*high fructose corn syrup*“ (HFCS) eingesetzt (Gänström et al., 2004). Abbildung I.1 fasst alle Reaktionen im sogenannten „Izumoring“ zusammen. Der Izumoring, der alle 34 Hexosen enthält, verdeutlicht, dass alle Hexosen durch Umwandlung einer anderen hergestellt werden können. Alle D-Zucker sind in Abbildung I.1 in der rechten Hälfte angeordnet, alle L-Zucker in der linken. Hexitole und *meso*-Hexitole sind gelb unterlegt. Alle Hexosen sind

symmetrisch um den schwarzen Stern in der Mitte angeordnet. Anhand des Izumorings kann ein Produktionsweg eines bestimmten Zuckers leicht festgelegt werden, da die Verbindung jedes Zuckers zu anderen deutlich sichtbar ist und die optimale Route jeder Transformation ermittelt werden kann.

2. Dehydrogenasen

In der chemischen Industrie wächst der Bedarf an enzymatisch katalysierten Produktionsprozessen. So stieg die Anzahl signifikanter Biotransformationen in den Jahren zwischen 1960 und 2002 um ein Vielfaches. Redoxkatalysatoren nehmen dabei einen Anteil von 30% ein (Straathof et al., 2002). Enzymatische Redoxprozesse im industriellen Maßstab sind zwar aufgrund der begrenzten Stabilität der Enzyme hinsichtlich hoher Substrat-, Produkt- oder Lösungsmittelkonzentrationen sowie der Temperatur limitiert, sie gewinnen jedoch als Ersatz für konventionelle chemische Methoden zunehmend an Bedeutung (Molinari, 2006). Anders als viele chemische Reaktionen, werden enzym-katalysierte Redoxprozesse unter nicht-toxischen und korrosionsbeständigen Bedingungen durchgeführt (Gavrilescu und Chisti, 2005). Isomerisierung, Racemisierung und Umlagerungen spielen unter solch milden Bedingungen - im Gegensatz zur chemischen Synthese - keine Rolle. Somit stellen Enzyme attraktive Katalysatoren für organische Synthesen dar (Kataoka et al., 2003; Hummel, 1997). Die wesentlichsten Vorteile enzymatischer Katalysatoren bestehen jedoch in der hohen Chemo-, Regio- und Enantioselektivität, besonders für asymmetrische Synthesen (Molinari, 2006). Kommerziell erwerbbar Enzyme besitzen jedoch oft nur begrenzte Langzeitstabilität, Substratspezifität und fehlende Aktivität in organischen Lösungsmitteln, weshalb es einen ständigen Bedarf gibt, nach neuen Biokatalysatoren zu suchen oder bekannte Enzyme zu modifizieren (Hummel, 1997). Die Fortschritte in der genetischen Manipulation von Mikroorganismen ermöglichen außerdem eine effektive Klonierung und Expression von Enzymen aus relevanten metabolischen Stoffwechselwegen in einen Wirtsorganismus, der zu einer Akkumulation von gewünschten Intermediaten oder Endprodukten, die für die Industrie interessant sind, fähig ist (Zeyer et al., 1985).

Da Mikroorganismen mit einer Vielzahl von verschiedenen Dehydrogenasen ausgestattet sind, die den Stoffwechselwegen für den Zuckerabbau angehören, ist die enzymatische Dehydrierung von Monosacchariden eine weit verbreitete Reaktion (Molinari, 2006). So sind die Glucose- und Gluconat-Dehydrogenase die Schlüsselenzyme des Pentosephosphatweges und wurden in industriellen Großmaßstäben und als Biosensoren verwendet (Molinari, 2006). Als wohl bekanntestes Beispiel für die industrielle Anwendung einer Dehydrogenase

ist die Produktion von L-Ascorbinsäure (Vitamin C) mit Hilfe der Reichstein-Grüssner-Synthese zu erwähnen (Reichstein und Grüssner, 1934). Vitamin C wird in einer Gesamtmenge von ca. 80000 Tonnen per anno hergestellt (Gavrilescu und Chisti, 2005). Die Reichstein-Grüssner-Synthese ist eine der ersten chemoenzymatischen Synthesen, die auf sechs chemischen Reaktionen und einer mikrobiologischen Transformation, nämlich der Oxidation von D-Sorbitol zu L-Sorbose, welche durch membrangebundene Dehydrogenasen katalysiert wird, basiert (Molinari, 2006).

Die Reinigung eines Produktes ist für den Kostenfaktor des gesamten Prozesses von entscheidender Bedeutung. Dabei können die Biokatalysatoren mit Hilfe einer Membran zurückgehalten werden, was bereits für verschiedene Anwendungen in so genannten Enzym-Membran-Reaktoren (EMR) gezeigt werden konnte (Lütz et al., 2006). Degussa (Evonik) verwendet diese Art von Reaktor für die Produktion von enantiomerenreinen Aminosäuren durch eine kinetische Auflösung von N-Acetylaminosäuren (Wöltlinger et al., 2001). Auch Kombinationen aus membranassoziierten Reaktoren und Ganzzell-Biokatalysatoren wurden bereits in der Literatur beschrieben (Chin-Joe et al., 2002; Haberland et al., 2002).

Oxidoreduktasen katalysieren Redoxreaktionen und somit die Übertragung von Elektronen (Hummel, 1999). Man unterteilt sie in Oxidasen, Reduktasen, Oxygenasen und Dehydrogenasen (Karlson et al., 1994). Einige Oxidoreduktasen katalysieren die Umsetzung von Alkoholen, Aldehyden und Ketonen, wozu sie Cosubstrate benötigen, aufgrund derer eine weitere Unterteilung in drei Gruppen möglich ist. Man unterscheidet hierbei NAD(P)-abhängige Alkoholdehydrogenasen, NAD(P)-unabhängige Alkoholdehydrogenasen, die als Cofaktoren *ortho*-Chinone oder Trihydroxy-Phenylalanin verwenden, sowie die FAD-abhängigen Oxidoreduktasen (Reid und Fewson, 1994).

Alkoholdehydrogenasen können prochirale Carbonylverbindungen stereospezifisch reduzieren (Abokitse und Hummel, 2003; Kohring et al., 2003). In der pharmazeutischen und der agrochemischen Industrie sind enantiomerenreine Produkte von großem Interesse. Im Falle des Herbizids Mecoprop beispielsweise ist nur das R-Enantiomer aktiv (Matell, 1953). Schwerwiegende Folgen hatte zum Beispiel die Verwendung des Schlafmittels Thalidomid unter dem Namen Contergan in den Fünfziger-Jahren des 20. Jahrhunderts, das auch Schwangeren verabreicht wurde (Mujagic et al., 2002). Chemisch handelt es sich hier um ein racemisches Gemisch des α -N-phthalimidglutarimid, wobei das R-Isomer sedative, das L-Isomer teratogene Eigenschaften besitzt (Quilitz, 1999), was sich fatal auf die ungeborenen Föten auswirkte. Deshalb wurde Contergan 1963 vom Markt genommen.

Im Falle der NAD(P)-abhängigen Alkoholdehydrogenasen unterteilt man weitere drei Gruppen (Jörnvall et al., 1987), und zwar *long-chain*-, *medium-chain*- und *short-chain*-Dehydrogenasen. Erstere werden durch Eisenatome aktiviert und kommen in Prokaryonten und *Saccharomyces cerevisiae* vor. Jede Enzym-Untereinheit besteht aus etwa 385 Aminosäuren. Innerhalb dieser Gruppe ist kein einheitliches NAD-Bindemotiv zu finden. Vertreter dieser Gruppe sind zum Beispiel die Propandiol-Dehydrogenase aus *E. coli* (Conway und Ingram, 1989) sowie die Glycerol-Dehydrogenase aus *Bacillus stearothermophilus* (Mallinder et al., 1992) und die Alkoholdehydrogenase II aus *Zymomonas mobilis* (Hummel, 1997).

Die *medium-chain*-Dehydrogenasen sind Zink-abhängig und in Pro- und Eukaryonten, Pflanzen und Säugetiergeweben verbreitet. Pro Enzymuntereinheit bestehen sie aus ungefähr 350 Aminosäuren (Abokitse und Hummel, 2003). Eine konservierte glycinreiche Domäne am N-Terminus bildet das NAD-Bindemotiv und weist das Muster GXGXXG auf. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise die Pferdeleber-Alkoholdehydrogenase (Hummel, 1997) und die Benzyl-Alkoholdehydrogenase aus *Acinetobacter calcoaceticus* (MacKintosh und Fewson, 1988).

Short-chain-Alkoholdehydrogenasen, die aus etwa 250 Aminosäuren pro Enzymuntereinheit bestehen, sind metallunabhängig und in vielen Organismen von den Prokaryonten bis zum Menschen weit verbreitet (Neidle et al., 1992). Das Coenzym-Bindemotiv lautet GXXXGXXG. Im aktiven Zentrum tragen diese Alkoholdehydrogenasen das Motiv YXXXXK (Nidetzky et al., 1996). Vertreter dieser Dehydrogenase-Gruppe sind die Alkoholdehydrogenase aus *Drosophila* ssp. (Hummel, 1997) und die Galaktitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* (Schneider et al., 1995) bzw. die D-Sorbitol-Dehydrogenase aus selbigem Organismus (Schauder et al., 1995) zu erwähnen.

Es existieren auch Enzyme, die metallunabhängig sind und aus ca. 300 Aminosäuren pro Untereinheit bestehen. Diese Enzyme bilden somit eine Übergangsstufe zwischen den *short-chain*- und den *medium-chain*-Dehydrogenasen. Diese Proteine gehören zur GFO/IDO/MocA-Familie (Kanagasundaram und Scopes, 1992; Zachariou und Scopes, 1986), deren Name sich aus der Glukose-Fruktose-Oxidoreduktase, den Vertretern der Inositol-Dehydrogenasen und MocA ableitet. Die 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5. (Dambe et al., 2006; Kühn, 2004; Kühn et al., 2006) ist zum Beispiel ein Vertreter dieser Zwischengruppe.

3. Enzymatische und elektrochemische Cosubstratregenerierung

3.1 Enzymatische Cosubstratregenerierung

Aufgrund ihres ausgedehnten Substratspektrums und ihrer Enantioselektivität finden Alkoholdehydrogenasen in der Synthese von Feinchemikalien breite Anwendung. Ein wichtiger Aspekt bei der Verwendung von NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen ist die Notwendigkeit eines Cofaktors. In *Whole-Cell-Assays* liefern zelluläre Enzyme einen ausreichend großen Nachschub an Cofaktoren (Duetz et al., 2001). Zur Durchführung zellfreier Redoxprozesse bedarf es jedoch eines effizienten und ökonomischen Systems zur Regenerierung des Cofaktors (Hummel, 1997). Dabei ist die notwendige Anzahl von Recyclingprozessen abhängig vom Wert des chrialen Produktes. Die gewählte Methode sollte den Cofaktor jedoch 100 bis 100000 Mal regenerieren können (Wong und Whitesides, 1994). In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Systeme entwickelt, die entweder auf enzymatischer oder auf chemischer Cofaktorregenerierung basieren (Wichmann und Vasic-Racki, 2005; Chenault und Whitesides, 1987).

Bei der enzymatischen Cofaktorregenerierung unterscheidet man zwischen enzymgekoppelten und substratgekoppelten Recyclingmethoden (Peters, 1998). Bei der enzymgekoppelten Cofaktorregenerierung werden zwei verschiedene Enzyme verwendet, wobei eines den eigentlichen Umsatz durchführt, während das andere für die Regenerierung des Cofaktors verwendet wird. Dabei ist es von großer Wichtigkeit, dass sich beide Enzyme hinsichtlich ihrer Substratspezifität unterscheiden, um eine Beeinträchtigung der Reaktion zu vermeiden.

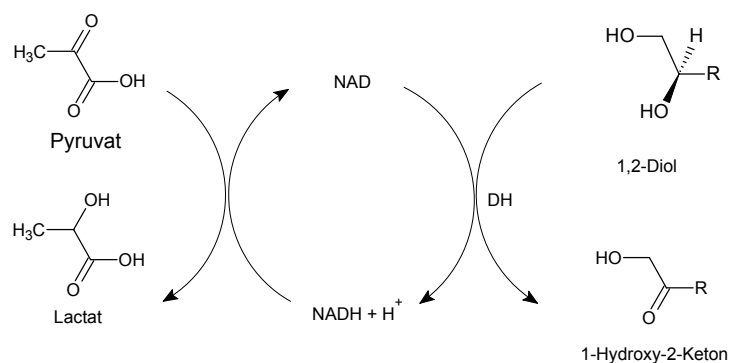


Abbildung I.2: Modellreaktion für eine enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung, die Oxidation von NADH durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH). Die Abbildung wurde mit dem Programm *ChemSketch* (ACDLabs) erstellt.

Für den Regenerierungsprozess werden meist kommerziell erhältliche Enzyme verwendet, wie beispielsweise die Lactat-Dehydrogenase (siehe Abbildung I.2) für die *in situ*

Regenerierung von NAD^+ (Lee und Whitesides, 1985) und die Formiat-Dehydrogenase für die Regenerierung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ (Kragl et al., 1996; Schütte et al., 1976). Der Regenerierungsprozess der oxidierten Form wird durch eine ungünstige Thermodynamik und eine Produktinhibierung behindert (Lee und Whitesides, 1986). Der Vorteil des Formiat-Systems liegt nicht nur beim relativ kostengünstigen Formiat, sondern auch darin, dass dieses zu Kohlenstoffdioxid oxidiert wird (siehe Abbildung I.3).

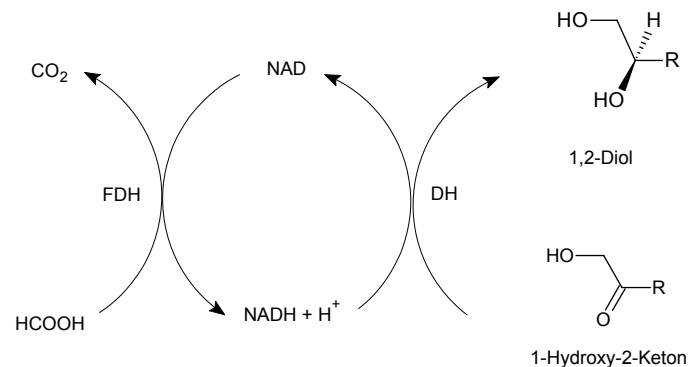


Abbildung I.3: Modellreaktion für eine enzymgekoppelte Dinukleotid-Regenerierung, die Reduktion von NAD^+ durch die Formiat-Dehydrogenase (FDH). Die Abbildung wurde mit dem Programm *ChemSketch* (ACDLabs) erstellt.

Dabei entweicht das entstandene Coprodukt aus der Produktlösung und kann somit keine Endprodukt-Inhibierung auslösen. Der größte Nachteil der enzymgekoppelten Regenerierungssysteme besteht grundsätzlich aus einer kompetitiven Hemmung durch das Substrat oder das Produkt (Kula et al., 1980). Außerdem muss ein zweites Enzym verwendet werden, was zusätzliche Kosten verursacht, und auf dessen pH- und Temperaturoptimum die eigentlich Reaktion abgestimmt werden muss (Peters, 1998). Vorteile sind allerdings, dass das Reaktionsgleichgewicht beeinflusst werden kann und hohe Umsatzraten von über 600000 erreicht werden können (Schmidt et al., 1987). Es ist jedoch notwendig, die Aktivitätsratio für jedes Enzym paar anzupassen, um weder einen Mangel noch einen Überschuss an Reduktionsäquivalenten zu erhalten (Peters, 1993).

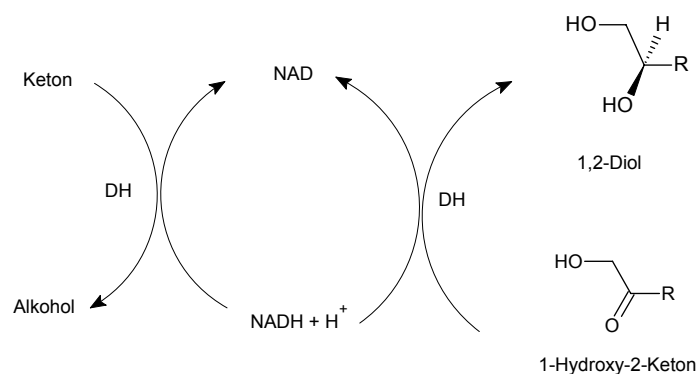


Abbildung I.4: Modellreaktion für eine substratgekoppelte Dinukleotid-Regenerierung, die Reduktion von NAD^+ durch Verwendung eines zweiten Hydroxylsubstrates. Die Abbildung wurde mit dem Programm *ChemSketch* (ACDLabs) erstellt.

Im Unterschied zur enzymgekoppelten Reaktion, werden bei der substratgekoppelten Regenerierung beide Reaktionen von einem einzigen Enzym durchgeführt (siehe Abbildung I.4).

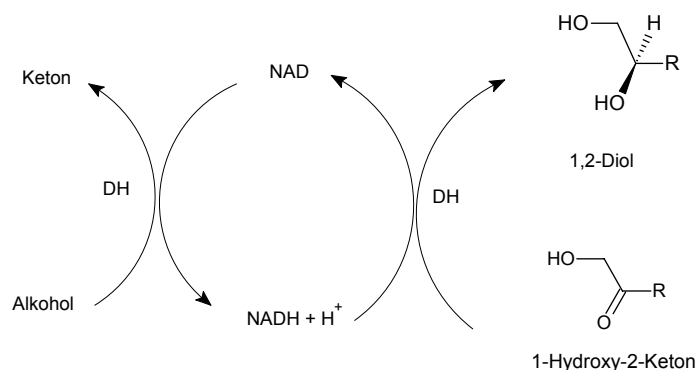


Abbildung I.5: Modellreaktion für eine substratgekoppelte Dinukleotid-Regenerierung, die Oxidation von NADH durch Verwendung eines zweiten Ketonsubstrates. Die Abbildung wurde mit dem Programm *ChemSketch* (ACDlabs) erstellt.

Das Zusatzsubstrat, meist ein kostengünstiger Alkohol als Hydrid-Donor (siehe Abbildung I.5), dient dabei zur Cofaktor-Regenerierung und wird in großen Mengen zugegeben, um das Reaktionsgleichgewicht in die gewünschte Position zu verschieben (Wichmann und Vasic-Racki, 2005; Peters, 1998). Beispielsweise kann eine Alkohol-Dehydrogenase 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; Findrik et al., 2005). In kontinuierlichen Systemen können dabei Ausbeuten von mehr als 80% und Umsatzraten von mehr als 10⁶ erreicht werden und somit die Produktivität eines vergleichbaren enzymgekoppelten Systems um das 2,5-fache gesteigert werden (Peters, 1998). 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).

3.2 Elektrochemische Cosubstratregenerierung

Man unterteilt nicht-enzymatische Methoden der Cofaktor-Regenerierung in chemische, elektrochemische und photochemische Methoden (Kornberger et al., 2009; Wichmann und Vasic-Racki, 2005; Peters, 1998). Eine kostengünstige, jedoch instabile chemische Methode für die Reduktion von NAD(P)⁺ ist beispielsweise die Verwendung von Natriumdithionit, welches allerdings eine sehr niedrige Umsatzrate besitzt und Enzyme reaktiv inaktivieren kann (Jones et al., 1972). Photochemische Methoden benötigen so genannte Photosensibilisatoren, wie Tris(bipyridin)ruthenium(II) (Mandler und Willner, 1984), Meso-

Tetra-Methylpyridin-Porphyrinzink(II) (Mandler und Willner, 1986) oder Methylenblau (Julliard und Lepetit, 1982) zur Cofaktor-Oxidation. Die Regenerierung von NAD(P)H₂ kann mit einem Rhodium-Bipyridin-Komplex als Redoxkatalysator und entweder einer Elektrode oder Formiat als Donor erfolgen (Steckhan et al., 1991; Ruppert et al., 1978). Schwierig bei diesen Methoden ist der Transfer von zwei Elektronen, was eine Dimerbildung zur Folge hat, weshalb Mediatoren wie Viologen oder Rhodiumkomplexe eingesetzt werden. Auch dadurch lassen sich jedoch Probleme wie niedrige Stereoselektivität (Mandler und Willner, 1986), Inaktivierung des Coenzym (Hollmann und Schmid, 2004; Peters, 1998), Nebenreaktionen und niedrige Umsatzraten (Chenault und Whitesides, 1987) nicht vermeiden.

Eine kostengünstigere Alternative zu den chemischen oder enzymatischen Methoden stellt die elektrochemische Cofaktor-Regenerierung dar, welche gerade in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht wurde (DevauxBasseguy et al., 1997; Bergel und DevauxBasseguy, 1996). Grundsätzlich steht dabei die Oxidation des Cofaktors im Vordergrund, da diese leichter durchzuführen ist als die Cofaktor-Reduktion, da die Ansprüche an die Regioselektivität bei der Oxidationsreaktion geringer sind. Man unterscheidet dabei direkte Methoden an der Elektrodenoberfläche und indirekte Methoden über Redoxmediator-Moleküle. Als Mediatoren bezeichnet man Elektronentransfer-Katalysatoren oder Vermittler von Reduktionsäquivalenten wie Elektronen und Hydride (Schröder, 2003).

Eine direkte Oxidierung des Cosubstrats (siehe Abbildung I.6) ist vor allem deshalb interessant, da man auf den Einsatz zusätzlicher Enzyme, Substrate oder anderer Additive verzichten kann und die Regenerationsrate über das angelegte Elektrodenpotential steuerbar ist (Saidman und Bessone, 2000; Drakesmith und Gibson, 1988). Jedoch muss eine Spannung von fast 1 V an die Elektrode angelegt werden, um eine ausreichende Regeneration zu erreichen. Durch dieses stark positive Potential werden auch die Substrate und Produkte der Dehydrogenasen wie Aldehyde, Alkohole, Ketone und Phenolverbindungen oxidiert oder Enzyme werden inhibiert (Musameh et al., 2002; Tse und Kuwana, 1978). Außerdem kommt es im Reaktionsverlauf zu einer Anhäufung von Überoxidations- und Radikalfolgeprodukten (Schröder, 2003) und unselektiv oxidierten Übergangsprodukten des Cosubstrates, was zu einer Verarmung des Reaktionsansatzes an NAD(P)⁺ und schließlich zum Erliegen der Reaktion führt (Saidman und Bessone, 2000). Deshalb eignet sich diese Methode bislang nicht für die hohe Zahl an Regenerationszyklen, wie sie für ein effektives Cofaktor-Regenerationsystem notwendig sind. Zwar lassen sich enzymatische Synthesen mit dieser Methode durchführen, diese können jedoch nicht auf einen größeren Maßstab übertragen oder für analytische Zwecke genutzt werden (Fassoune et al., 1990).

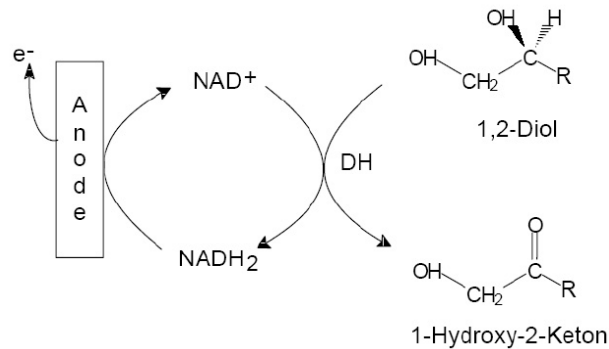


Abbildung I.6: Modellreaktion für eine direkte elektrochemische Dinukleotid-Oxidation von NADH an der Anodenoberfläche (Kornberger, 2009).

Alternativ können Redoxmediatoren eingesetzt werden (siehe Abbildung I.7), welche sich entweder in Lösung befinden oder an die Elektrodenoberfläche immobilisiert sind (Hollmann und Schmid, 2004; Gorton und Dominguez, 2002).

Der Mediator dient dabei zur Herabsetzung der Überspannung und wird nach der Elektronenaufnahme von dem reduzierten Cosubstrat wieder an der Anode recycelt (Gajdzik, 2007). Als Mediatoren eignen sich verschiedenartige Substanzen, die auf das jeweilige System abgestimmt werden müssen. In der Literatur finden sich Mediatoren wie verschiedene Azine (Karyakin et al., 1999), wie zum Beispiel die Farbstoffe Metylenblau, Azur A, Meldola Blau und Toluidine Blau O (Persson und Gorton, 1990), die in enzymfreien Ansätzen verwendet wurden. Als besonders effizient haben sich dabei Moleküle erwiesen, 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 $NHOH/NO$ aus (Mano und Kuhn, 1999 und 2001). Die Sorbitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* wurde zusammen mit einem solchen Mediator (CTFM, 4-Carboxy-2,5,7-Trinitrofluorenylidene)malon-nitrile) in einem System mit einer erfolgreichen elektrochemischen NAD^+ -Regenerierung eingesetzt (Gajdzik et al., 2007).

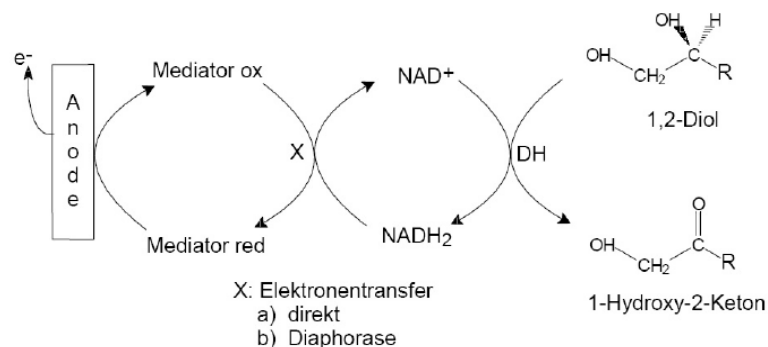


Abbildung I.7: Modellreaktion für eine elektrochemische Dinukleotid-Oxidation von NADH mittels eines Mediators an der Anodenoberfläche (Kornberger, 2009).

Der Cofaktor 1,4-NADH₂ kann auf direktem Wege durch Reduktion von NAD⁺ an einer Kathode regeneriert werden (siehe Abbildung I.8) (Burnett und Underwood, 1965).

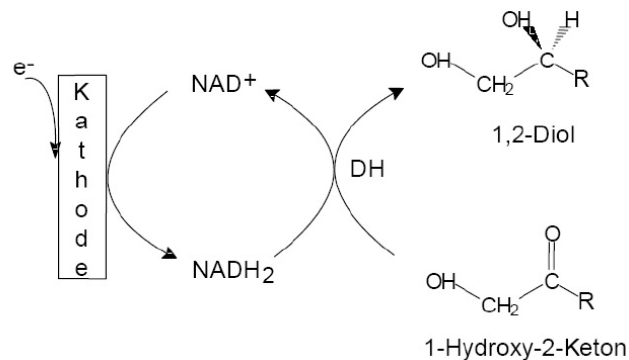


Abbildung I.8: Modellreaktion zur direkten elektrochemischen Dinukleotid-Reduktion von NAD⁺ an einer Kathodenoberfläche (Kornberger, 2009).

Diese Reaktion benötigt allerdings hohe Überspannungen und führt außerdem zur Bildung inaktiver Reduktionsäquivalente wie 1,6-NADH₂-Isomeren (Jaegfeldt, 1981) oder 4,4'-Dimeren (Gorton, 2002). Deshalb muss ein Mediator für eine solche Regenerierung bestimmte Anforderungen erfüllen, um solche Probleme zu umgehen. So müssen gleichzeitig zwei Elektronen oder Hydridionen lediglich auf den Cofaktor übertragen werden und die Aktivierung muss bei weniger negativen Potentialen als -0,9 V erfolgen (Steckhan, 1994; siehe Abbildung I.9).

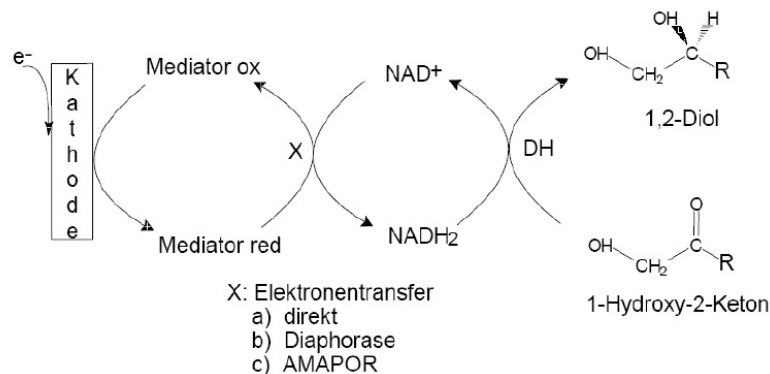


Abbildung I.9: Modellreaktion für eine elektrochemische Dinukleotid-Reduktion von NAD⁺ mittels eines Mediators an der Kathodenoberfläche (Kornberger, 2009).

Für verschiedene Rutheniumkomplexe in Nanotubes aus Kohlenstoff konnte bereits eine effiziente Elektroreduktion gezeigt werden (Salimi et al., 2009). Auch Methylviologene wurden erfolgreich in Systemen eingesetzt, die entweder Diaphorasen, Lipoamid-Dehydrogenasen, Ferredoxin-Reduktasen oder so genannte AMAPORs (*artificial mediator accepting pyridine nucleotide oxidoreductases*) enthalten und den Elektronenfluss von dem von

der Elektrode reduzierten Methylviologen zum NAD⁺ ermöglichen (Voivodov et al., 1995; Fry et al., 1994).

4. Verwendete Enzyme

4.1 L-Sorbitol-Dehydrogenase (LSDH) aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

1993 konnte von Mayers-Küntzer eine *Stenotrophomonas*-Spezies aus einer Bodenprobe isoliert werden, die mit L-Sorbitol als alleiniger Kohlenstoffquelle wuchs. Eine aus diesem Stamm isolierte Dehydrogenase, deren Hauptsubstrat L-Sorbitol war, setzte selbiges in einer Oxidationsreaktion zum seltenen Zucker D-Sorbose um. Die Keto-hexose D-Sorbose kann vielfältig angewandt werden: als kalorienarmer Süßstoff (Noma et al., 1974; Suami und Hough, 1992), als Bestandteil von Mitteln gegen Insekten (Levin und Zehner, 1991) und als Ausgangssubstanz industriell bedeutsamer Verbindungen wie L-threo-2,5-hexodiulose (Dhawale et al., 1986). Bei der chemischen Synthese der D-Sorbose aus D-Galactose konnte eine Ausbeute von 11,4% (Kubala et al., 1986) bzw. 23-26% (Socolsky de Fenik und Recondo, 1968) erreicht werden, bei der Synthese aus penta-O-acetyl- α -D-idopyranose eine Ausbeute von 55-70% (Bock et al., 1991). Die biotechnologische Synthese der D-Sorbose durch mikrobielle Konversion von L-Sorbitol (Dhawale et al., 1986) bzw. Galaktitol (Khan et al., 1992) führte zu einer Ausbeute von 60% bzw. 70%. Auch die Präparation von D-Sorbose aus D-Tagatose durch eine immobilisierte D-Tagatose-3-Epimerase führte zu einer Ausbeute von 70% (Itoh et al., 1995[2]). Mit Hilfe der LSDH aus *Stenotrophomonas maltophilia* gelang die Herstellung von D-Sorbose mit einer Ausbeute von mehr als 95% (Huwig et al., 1996). Der Stamm verlor jedoch seine L-Sorbitol-Dehydrogenase-Aktivität. Der N-Terminus der LSDH aus *Stenotrophomonas maltophilia* wies eine 85 prozentige Homologie zu einem *open-reading-frame* im Genom von *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, der als Ribitol-Dehydrogenase ausgewiesen war.

Der Stamm *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 wurde erstmals 1957 aus einem Wurzelknöllchen einer Sojabohne in Florida, USA isoliert (Kaneko et al., 2002) und wurde wegen seiner bemerkenswerten Eigenschaften hinsichtlich der Stickstofffixierung bereits mehrfach für die Untersuchung der Molekulargenetik, der Physiologie und der Ökologie verwendet (Minamisawa und Mitsui, 2000; Mathis et al., 1997). Die Gattung *Bradyrhizobium* („in Wurzeln lebend, langsam wachsend“) gehört zur Familie der *Rhizobiaceae* und somit zur Abteilung der Proteobacteria. Die Gattung *Rhizobium* fasst diejenigen Bakterien zusammen, die die Knöllchen der Leguminosen (über 18000 Arten; Radutoiu et al., 2007), darunter

wichtige Kulturpflanzen wie Sojabohne, Klee, Bohne und Erbse) verursachen. Es handelt sich bei diesen Bakterien um streng aerobe, gram-negative, bewegliche Stäbchen. Sie leben im Boden und wachsen mit organischen Verbindungen heterotroph. Einige Stämme (*Bradyrhizobium*) können auch mit H₂ autotroph wachsen (Schlegel, 1992). Außerhalb einer Pflanze weisen diese Bakterien keine stickstofffixierende Aktivität auf (Fuchs, 2007). Je nach Wirtsspezifität und Wachstumsrate unterscheidet man drei Untergruppen: bei der Gattung *Rhizobium* handelt es sich um schnell wachsende Knöllchenbakterien heimischer Kulturpflanzen, während die Mitglieder der Gattung *Bradyrhizobium* langsam wachsende Symbionten der Sojabohne sind (Allen und Allen, 1950; Stowers, 1985; Jordan und Allen, 1974). Zur dritten Untergruppe zählen stengelknöllchenbildende Bakterien (*Azorhizobium caulinodulans*). Leguminosen, bei denen Knöllchen an Stengeln auftreten (z.B. *Sesbania rostrata*), wachsen an nassen Standorten in den Tropen Afrikas und Indiens. Die Knöllchen treten an untergetauchten und überirdischen Stengeln der Pflanzen auf. Wahrscheinlich ist die Sauerstoffempfindlichkeit des stickstofffixierenden Systems geringer als bei anderen Systemen (Schlegel, 1992). Seit 2002 ist das Genom von *B. japonicum* vollständig sequenziert. Es besteht aus 9,1 Millionen Basenpaaren und weist einen GC-Gehalt von 64,1% auf (Kaneko et al., 2002). Das Vorkommen von *B. japonicum* (neben *B. elkanii*) als stickstofffixierender Symbiont in Wurzelknöllchen der Sojabohne (*Glycine max*) macht die Art wirtschaftlich sehr bedeutsam (Kaneko et al., 2002).

4.2 Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) aus *Rhodobacter sphaeroides*

Bereits mehrere Polyol-Dehydrogenasen konnten im Stamm *Rhodobacter sphaeroides* Si4 identifiziert werden, darunter eine dimere Sorbitol-Dehydrogenase, eine monomere Mannitol-Dehydrogenase und eine dimere Ribitol-Dehydrogenase (Kahle et al., 1992; Schneider und Giffhorn, 1989). Durch ein Chemostatenexperiment, bei dem das nicht-verwertbare Galaktitol im Überschuss (20 mM) und nur limitierte Mengen an D-Sorbitol (1 mM) als Kohlenstoffquellen eingesetzt wurden, wurde ein Galaktitol-metabolisierender Mutationsstamm des Organismus, *Rhodobacter sphaeroides* D, isoliert (Schneider et al., 1995). Aus dem „gain-of-function“-Mutationsstamm wurde eine neue, bisher unbekannte, konstitutiv exprimierte Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) isoliert und charakterisiert (Schneider et al., 1995). Der Mutantenstamm wies eine spezifische GatDH-Aktivität von 380 mU/mg auf, während der Wildtyp-Stamm, *Rhodobacter sphaeroides* Si4, bei Wachstum auf verschiedenen Polyolen lediglich GatDH-Aktivitäten von weniger als 50 mU/mg zeigte. Anders als die Mannitol-, Ribitol- und Sorbitol-Dehydrogenasen, die aus dem Wildtyp-

Stamm isoliert wurden, wird die GatDH konstitutiv exprimiert (Schneider et al., 1995). Schneider et al. (1995) nahmen an, dass ein kryptisches Gen zur Expression der GatDH im „*gain-of-function*“-Stamm aktiviert wurde. Kryptische Gene sind phänotypisch „stille“ DNA-Sequenzen, die im normalen Lebenszyklus einer Bakterienkultur nicht exprimiert werden (Hall et al., 1983). Wenn jedoch die Kultur über einen längeren Zeitraum einem Selektionsdruck ausgesetzt ist, können sich Mutanten mit neuen metabolischen Eigenschaften entwickeln (Hall et al., 1983). Anhand von Homologievergleichen zum sequenzierten *type strain* 2.4.1 konnte das Gen der Galaktitol-Dehydrogenase ebenfalls – wie die anderen bekannten Polyol-Dehydrogenasen des Organismus – auf dem Hauptchromosom 1 identifiziert werden. (Zimmer, 2006). Die Entstehung neuer genetischer Varianten durch ein oder mehrere spontane Mutationsereignisse ist das initiale Ereignis eines evolutionären Adaptationsprozess (Hall, 1988). Es existieren drei Hauptstrategien für die Evolution neuer metabolischer Funktionen (Hall, 1989). So 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). Zweitens können strukturelle Mutationen innerhalb eines Gens die katalytischen Eigenschaften eines Enzyms verändern. Zuletzt können durch Mutationen oder bewegliche Genelemente auch ganze Operons aktiviert werden. Transposable Insertionselemente können dabei neue Promotorsequenzen enthalten (Prentki et al., 1986; Ciampi et al., 1982) und kryptische Gene durch eine Insertion in *upstream* lokalisierte Regionen aktivieren (Reynolds et al., 1981). Zwar kodieren kryptische Gene für funktionsfähige Proteine, können von dem jeweiligen Organismus aber normalerweise nicht exprimiert werden. Bei veränderten Umweltbedingungen können diese Gene dem Organismus jedoch einen Selektionsvorteil verleihen und bleiben daher im Genpool erhalten (Kornberger, 2009). Zimmer (2006) konnte bestätigen, dass es sich beim Gen der GatDH ebenfalls um ein stillgelegtes kryptisches Gen handelt. Kornberger (2009) untersuchte zwei Theorien zur unterschiedlichen GatDH-Expression im Stamm Si4 und im Stamm D. Zum einen wurde eine negative Repression über ein Regulatorprotein im Stamm Si4 untersucht, zum anderen eine positive Regulation über eine neue Promotorsequenz im Stamm D. Beide Theorien konnten nicht eindeutig bestätigt werden, jedoch erscheint die konstitutive Bildung der GatDH in *Rhodobacter sphaeroides* D als Folge der neuen Promotorsequenz als wahrscheinlicher (Kornberger, 2009).

Die Galaktitol-Dehydrogenase konnte in der Vergangenheit zur Synthese des seltenen Zuckers L-Tagatose aus Galaktitol mit einer Ausbeute von 78% eingesetzt werden (Huwig et al., 1998). Die Kristallstruktur der GatDH konnte bereits aufgeklärt werden und zeigt eine

Quartärstruktur aus vier identischen Untereinheiten (Philippson, 2005; Carius et al., 2010), die aus 254 Aminosäuren bestehen und jeweils ein Molekulargewicht von 26,4 kDa aufweisen. Somit kann die GatDH den *short-chain*-Dehydrogenasen zugeordnet werden. Das für diese Gruppe charakteristische NAD-Bindemotiv lautet GAGSGIG (GXXXGXG), das das aktive Zentrum kennzeichnende Motiv YMASK (YXXXX) (Nidetzky et al., 1996) konnte ebenso nachgewiesen werden wie das hochkonservierte Serin 144 (Zimmer, 2006). Der N-Terminus ist an der Enzym-Peripherie angeordnet, während der C-Terminus an der Komplexierung zweier Magnesiumionen beteiligt ist. Für die Enzymaktivität zeigte sich daher eine strenge Abhängigkeit vom Vorhandensein zweiwertiger Kationen (Jäkel, 1994; Schneider et al., 1995). Zink- oder Eisensulfate inhibieren jedoch die Aktivität der GatDH.

Rhodobacter sphaeroides gehört zu den schwefelfreien Purpurbakterien und ist fähig, unter phototrophen, lithotrophen und heterotrophen Bedingungen zu wachsen (Van Niel, 1944; Zhou et al., 2003). Je nach Sauerstoffangebot kann der Organismus aerob oder anaerob in Anwesenheit von Licht, durch die Verwendung externer Elektronenakzeptoren wie Wasserstoff oder reduzierten organischen Verbindungen wachsen. *R. sphaeroides* ist gramnegativ. Natürliche Standorte sind flache, stehende Gewässer, wie Seen und Teiche, in denen eine rasche Zersetzung organischer Materialien stattfindet (Stein, 1998). Metabolisch ist *R. sphaeroides* sehr vielfältig und kann eine Vielzahl von Verbindungen wie organische Säuren, Zucker, Polyole, Methanol und das toxische Formaldehyd oxidieren (Pfennig und Trüper, 1971; Imhoff et al., 1984; Barber und Donohue, 1998; Zhou et al., 2003). Ebenso kann er organische und anorganische Verbindungen wie Thymine, Sulfate und giftige Metalloxide reduzieren (Moore und Kaplan, 1992). Aufgrund seiner metabolischen Vielfalt diente *Rhodobacter sphaeroides* als idealer Modellorganismus für eine Reihe von Untersuchungen über das Photosynthesystem, Membranbiosynthesen und den Zellwandaufbau (Zhou et al., 2003). *R. sphaeroides* war das erste Bakterium, bei dem zwei unterschiedliche Chromosomen nachgewiesen werden konnten (Suwanto und Kaplan, 1989). Viele Gene liegen als Duplikate auf beiden Chromosomen und sind strukturell gleich, werden jedoch unterschiedlich reguliert (Suwanto und Kaplan, 1992; Choudhary et al., 1997).

4.3 D-Mandelat-Dehydrogenase (DMDH) aus *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Hydroxysäure-Dehydrogenasen der Milchsäurebakterien katalysieren die stereospezifische Reduktion von verzweigten 2-Ketosäuren zu 2-Hydroxysäuren und spielen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von Prozessen, unter anderem bei der Entstehung des Käsearomas durch den Abbau von Aminosäuren (Chambellon et al., 2009). Außerdem sind sie nützliche

Katalysatoren für die Produktion von stereospezifischen Isomeren der 2-Hydroxysäuren, die bei der Herstellung semisynthetischer Antibiotika oder anderer Medikamente benötigt werden (Kallwass, 1992). Des Weiteren sind Hydroxysäure-Dehydrogenasen beteiligt an den konservierenden Eigenschaften der Milchsäurebakterien, da bestimmte 2-Hydroxysäuren fungizide und antilisteriale Aktivitäten aufweisen (Dieuleveux und Gueguen, 1998; Lavermicocca et al., 2003; Wilson et al., 2005). Das Gen der D-2-Hydroxysäure-Dehydrogenase aus *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* wurde kloniert und heterolog exprimiert. Die Expression erfolgte dabei fast ausschließlich in Form eines löslichen und aktiven Enzyms (Chambellon et al., 2009). Die D-2-Hydroxysäure-Dehydrogenase aus *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* zeigte in der Oxidationsreaktion mit NADH als einziges Coenzym hohe katalytische Aktivitäten mit 2-Ketoisocaproat, 2-Ketomethylvalerat, 2-Ketoisovalerat und Benzoylformiat. In der Reduktionsreaktion zählt auch D-Mandelat zu den Substraten der D-2-Hydroxysäure-Dehydrogenase, weshalb sie im Folgenden als D-Mandelat-Dehydrogenase (DMDH) bezeichnet wird. Das dimere Enzym ist in der Reduktionsreaktion spezifisch für D-2-Hydroxysäuren, L-2-Hydroxysäuren werden nicht umgesetzt.

Lactococcus lactis ist ein gram-positives Bakterium, das in der Butter- und Käseherstellung Anwendung findet (Beresford et al., 2001). Es handelt sich um unbewegliche Kokken, die Paare oder kurze Ketten bilden. In Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen erscheinen sie oval mit einer Länge von 0,5 bis 1,5 μm . *L. lactis* hat einen homofermentativen Stoffwechsel und produziert L(+)-Milchsäure (Casalta und Montel, 2008), bei niedrigem pH-Wert wird jedoch auch die D-Form gebildet. In der Käseherstellung sorgt die Milchsäure für die Gerinnung der Milch und ermöglicht die Trennung von Käsebruch und Molke. Des Weiteren wird *L. lactis* in der Herstellung von eingelegtem Gemüse, Bier, Wein und Brot angewendet, sowie bei der Gewinnung des Konservierungsstoffs Nisin (Delves-Broughton et al., 1996; Brötz et al., 1998). *L. lactis* subsp. *cremoris* und zu einem geringeren Anteil *L. lactis* subsp. *lactis* wurden lange Zeit als Starterkulturen für die Milchfermentation (z.B. bei der Herstellung von Käse, *Sour Cream* und Butter). Dabei wurden einzelne oder mehrere Stämme zusammen mit oder ohne andere Bakterien verwendet (Beresford et al., 2001). Ihre Hauptaufgabe während der Milchfermentation ist die Ansäuerung durch die Produktion von Milchsäure. Sie tragen zur Entwicklung der Konsistenz durch die Produktion von Exopolysacchariden und zur Geruchsentwicklung durch die Produktion von aromatischen Verbindungen (Alkohole, Ketone und Aldehyde) oder durch Citrat, Aminosäuren oder die Verstoffwechslung von Fetten bei (Smit et al., 2005). Außerdem können sie bei der Haltbarmachung von Nahrungsmitteln eingesetzt werden, da sie in der Lage sind, organische Säuren und Bakteriozide, von denen Nisin am besten charakterisiert ist, zu

produzieren (Delves-Broughton et al., 1996). Auch ihre Anwendung als Probiotikum wurde in Erwägung gezogen (Ouwehand et al., 1999).

4.4 L-Mandelat-Dehydrogenase (LMDH) aus *Pseudomonas putida*

Die L-Mandelat-Dehydrogenase aus *P. putida* ist ein FMN-abhängiges Enzym, das die Oxidation von L-Mandelat zu Benzoylformiat katalysiert (Xu und Mitra, 1999). Am Mandelat-Pathway in *Pseudomonas putida* sind fünf verschiedene Enzyme beteiligt: die Mandelat-Racemase (mdlA), die L-Mandelat-Dehydrogenase (mdlB), die Benzoylformiat-Decarboxylase (mdlC), eine NAD-abhängige Benzylaldehyd-Dehydrogenase (mdlD) und eine NADP-abhängige Benzaldehyd-Dehydrogenase (mdlE), wobei mdlC, mdlB und mdlA in einem Operon zusammengefasst sind (Tsou et al., 1990). Die L-Mandelat-Dehydrogenase (MDH) aus *P. putida* ist ein membranassoziiertes, FMN-abhängiges Protein (Mitra et al., 1993), das aus 393 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 43,352 kDa pro Enzymuntereinheit hat (Tsou et al., 1990). Die Aminosäuresequenz enthält Bereiche, die hohe Übereinstimmungen mit verschiedenen Vertretern einer Familie von FMN-abhängigen, α -Hydroxysäure-Dehydrogenasen/Oxidasen aufweisen. Dazu zählen beispielsweise die Glykolat-Oxidase (GOX) aus Spinat (Stenberg et al., 1995), die Lactat-Oxidase aus *Mycobacterium*, Flavocytochrom b2 aus Hefe und eine *long-chain* α -Hydroxysäure-Oxidase aus Rattenniere (Tsou et al., 1990; Diep Le und Lederer, 1991). Im Gegensatz zu all diesen Vertretern dieser Familie, ist die L-Mandelat-Dehydrogenase aus *P. putida* ein membranassoziiertes Protein. Sequenzvergleiche innerhalb dieser Enzymfamilie zeigten hohe Homologien zwischen den unterschiedlichen Vertretern, abgesehen von einer großen internen Region, in der keine signifikante Homologie detektiert werden konnte. Im Falle der membranassoziierten LMDH ist diese Region länger als bei den anderen Vertretern der Enzymfamilie. Da hochauflösende Strukturen sowohl für die GOX (Lindqvist, 1989) als auch für Flavocytochrom b2 (Xia und Mathews, 1990) bekannt sind, konnte diese interne nicht-homologe Region einem großen, auf der Enzymoberfläche exponierten Segment zugeordnet werden, welches in direkter Nachbarschaft zum aktiven (FMN-bindenden) Zentrum liegt. Aus diesen Daten konnte gefolgert werden, dass dieses nicht-homologe Segment der LMDH für die Membranassoziation verantwortlich ist (Mitra et al., 1993). Die LMDH aus *P. putida* wurde kloniert und heterolog exprimiert. Auch in *E. coli* war das Enzym membranassoziiert und konnte in der Vesikelfraktion nachgewiesen werden (Mitra et al., 1993). Durch Deletion des Membranbindesegments und durch Insertion des korrespondierenden Bereichs der

verwandten Glykolat-Oxidase aus Spinat konnte die Löslichkeit des Enzyms verbessert werden (Mitra et al., 1993; Xu und Mitra, 1999).

Die Familie *Pseudomonadaceae* fasst gram-negative, polar begeißelte, gerade oder schwach gekrümmte Stäbchen zusammen, die keine Sporen bilden und aerob wachsen (Madigan et al., 2001). Die Energiegewinnung erfolgt durch aerobe Atmung, im Falle der Denitrifikation und der Nitrat-Atmung auch durch anaerobe Atmung, aber nicht durch Gärung. Pseudomonaden sind chemoorganotroph, einige wachsen fakultativ chemolithotroph. Dabei stellt die Gattung *Pseudomonas* den typischsten Vertreter der Pseudomonaden dar und lässt sich durch stoffwechselfysiologische Merkmale charakterisieren. So werden eine Vielzahl organischer Substrate umgesetzt, darunter heterozyklische und aromatische Verbindungen (Madigan et al., 2001). Pseudomonaden sind anspruchslos und sind daher überall zu finden. Manche Vertreter sind humanpathogen (*Pseudomonas aeruginosa*), andere sind pflanzenpathogen (*P. syringae*) (Madigan et al., 2001). An *P. saccharophila* wurde der Enter-Doudoroff-Weg des Glucoseabbaus entdeckt (Enter und Doudoroff, 1952). *Pseudomonas putida* ist ein weit verbreitetes Wasser- und Bodenbakterium, das eine ungewöhnlich große Zahl verschiedener organischer Verbindungen oxidieren kann.

4.5 Diaphorase aus *Clostridium kluyveri*

Diaphorasen können den Elektronentransfer zwischen Cofaktoren und Mediatoren verbessern, weshalb sie im Projekt ERUDESP im elektroenzymatischen Reaktor Anwendung finden können. Der Ausdruck „Diaphorase“ bezieht sich auf eine Klasse flavin-gebundener Enzyme, die NADH-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen. Der Elektronenakzeptor ist im Allgemeinen ein oxidiertes synthetisches Farbstoff wie Methylenblau oder 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) (Argyrou et al., 2003). Auf Basis der ursprünglichen Enzymfunktionen sind Diaphorasen in verschiedene Kategorien eingeteilt: NAD(P)H-Dehydrogenasen (EC 1.6.5.2), NADPH-Dehydrogenasen (EC 1.6.99.1), NADH-Dehydrogenasen (EC 1.6.99.3), Dihydrolipoyl-Dehydrogenasen (EC 1.8.1.4) oder Stickoxid-Synthasen (EC 1.14.13.39)¹. Eine NAD(P)H-Dehydrogenase katalysiert eine Zwei-Elektronen-Reduktion von Substraten, die kurzkettige Akzeptor-Quinone wie Ubiquinon oder Benzoquinon bevorzugen. NADPH- und NADH-Dehydrogenasen sind eine Gruppe von Oxidoreduktasen, die Elektronen- oder Wasserstoffakzeptoren wie Eisenchlorid oder Sauerstoff verwenden (Chakraborty et al., 2008). Die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase ist eine

¹ Homepage der Enzymnomenklatur IUBMB: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

Komponente des Multienzym-2-oxo-Säure-Dehydrogenase-Komplexes, wie dem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, der für die Konversion von Pyruvat zu Acetyl-CoA verantwortlich ist (Mattevi et al., 1992; Perham, 1991). Die Stickoxid-Synthase katalysiert die Synthese von Stickstoffmonoxid aus dem terminalen Stickstoff des L-Arginin in Anwesenheit von NADPH und Sauerstoff im Körper und trägt damit zur Übertragung von einem Neuron zum Nächsten, zum Immunsystem und zur Erweiterung von Blutgefäßen bei (Nathan, 1992; Szabo, 1995). Für einige dieser Enzyme ist bekannt, dass sie Diaphorase-Aktivität aufweisen (Snyder, 1992; Haberecht et al., 1998; Spessert et al., 1998; Petrovicky et al., 1999; Argyrou et al., 2003). Diaphorasen werden zur colorimetrischen NAD(P)H-Bestimmung verwendet. Außerdem finden sie Anwendung in der Histochemie bei der Detektion von Stickoxid-Synthase-Aktivität in verschiedenen Zelltypen, wie Neuronen, vaskulären Endothelzellen, Zellen des Immunsystems und Epithelzellen (Hon et al., 1997).

Clostridium kluyveri wurde erstmals 1937 von dem US-amerikanischen Mikrobiologen H.A. Barker aus dem Schlamm eines Kanals im niederländischen Delft isoliert (Barker und Taha, 1942). *C. kluyveri* ist einzigartig unter den Clostridien: er wächst anaerob auf Ethanol und Acetat als alleiniger Energiequelle. Fermentationsprodukte sind Butyrat, Caproat und Wasserstoff (Seedorf et al., 2007). Gegen Ende der Reaktion werden auch Butanol und Hexanol gebildet (Barker und Taha, 1942; Bornstein und Barker, 1948; Thauer et al., 1968; Schoberth und Gottschalk, 1969). In den 1950er Jahren diente *C. kluyveri* als Modellorganismus zur Untersuchung von Fettsäuresynthese und -abbau, wodurch man Erkenntnisse über die Stoffwechselprozesse in der Leber gewann (Stadtman, 1953 [1]; Barker, 1956; Stadtman, 1953[2]). Ein bemerkenswertes Merkmal dieses Bakteriums ist die Fähigkeit, auf Ethanol zu wachsen und daraus Wasserstoff zu produzieren (Seedorf et al., 2007). Der Energiemetabolismus von *C. kluyveri* wurde bereits mehrfach untersucht (Thauer et al., 1968; Schoberth und Gottschalk, 1969; Thauer et al., 1977), der Mechanismus der H₂-Produktion über Ferredoxin aus NADH gibt jedoch immer noch Rätsel auf, da es sich hierbei um eine endotherme Reaktion handelt (Seedorf et al., 2007). Von großem Interesse sind auch Erkenntnisse, die aus der Sequenz der genomischen DNA abgeleitet wurden, wie zum Beispiel die nonribosomale Synthese von Peptid-Polyketid-Hybriden und die Anwesenheit der meisten für die Ethanol- und Glycerin-Fermentation zu 1,3-Propandiol erforderlichen Gene (Seedorf et al., 2007). In den letzten Jahren galt *C. kluyveri* aufgrund seiner Fähigkeit, langkettige Kohlenstoffverbindungen wie Butyrat und Caproat als Fermentationsprodukte aus kurzkettigen Kohlenstoffverbindungen wie Acetat und Ethanol herzustellen, besonderes Interesse (Sohling und Gottschalk, 1996; Wallace et al., 2004).

5. Protein-Engineering

Die Evolution hat Enzyme an ihre Aufgaben *in vivo* perfekt angepasst. Aufgrund der zelleigenen Regulation bedeutet dies jedoch auch eine eingeschränkte Stabilität und Aktivität der Enzyme. Für Industrieprozesse besonders ungünstige Eigenschaften sind hierbei der Mechanismus der Sauerstoffinaktivierung durch Oxidation (Wang et al., 2001) und die Anpassung an mesophile Temperaturen. Wegen des fehlenden Selektionsdrucks in der Natur ist eine Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln oder bei extremen pH-Werten nur selten zu finden (Sheldon, 1999). Zur Steigerung der Effektivität können Enzyme allerdings durch verschiedene Mechanismen optimiert werden, um sie an den jeweiligen Prozess anzupassen. Dabei unterscheidet man zwei Möglichkeiten: das zufällige oder das rationale Proteindesign. Ersteres ahmt die Mechanismen der natürlichen Evolution nach. Diese Methode benötigt keine Strukturdaten, sondern lediglich ein effizientes Selektions- und Screeningsystem (Arnold et al., 2001; Chica et al., 2005; Shao und Arnold, 1996). Durch DNA-*shuffling* (Stemmer, 1994), *staggered extension* (StEP) (Zhao et al., 1998) oder *error-prone-PCR* (Leung et al., 1989) werden zufällige Mutationen eingeführt oder zwischen verwandten Genen neu verteilt. DNA-*shuffling* ist eine Methode zur homologen Rekombination von ausgewählten mutierten Genen *in vitro* durch zufällige Fragmentierung und *Reassembly* durch eine PCR-ähnliche Reaktion ohne Primer. Dabei werden DNA-Fragmente zunächst durch DNaseI verdaut. Fragmente der gewünschten Größe werden dann isoliert und beim *Reassembly* zu chimären Gensequenzen zusammengesetzt. StEP stellt vollständige rekombinierte Gene in der Anwesenheit eines oder mehrerer Templates her, wobei nach dem *Priming* der Template-Sequenzen wiederholte Zyklen von Denaturierung und extrem verkürzten *Annealing*- und polymerase-katalysierten Elongations-Schritten durchgeführt werden. In jedem Zyklus können die wachsenden Fragmente an ein anderes Template anlagern und es entstehen sogenannten Rekombinations-Kassetten. StEP wird solange durchgeführt bis Gene vollständiger Länge entstehen. Bei der *error-prone-PCR* wird die natürliche Fehlerrate der Taq-Polymerase ausgenutzt. Durch Veränderungen im PCR-Ansatz kann dabei die Fehlerrate weiter erhöht werden (Jaeger und Reetz, 2000). Hier besteht allerdings eine Beschränkung auf bestimmte Aminosäureaustausche (*bias*) (Wong et al., 2006[1]). Außerdem ist immer das komplette Gen der Mutagenese ausgesetzt. Durch *error-prone-PCR* konnte beispielsweise die katalytische Effizienz der Pyranose-2-Oxidase aus *Peniophora gigantea* durch den Austausch K312E deutlich gesteigert werden (Bastian et al., 2005).

Sind Strukturdaten des Enzyms und Struktur/Funktionsbeziehungen bekannt, so kann ein rationales Design durchgeführt werden (Chica et al., 2005). Hierbei werden Methoden der Bioinformatik und der ortsgerichteten Mutagenese eingesetzt, um gezielt einzelne Aminosäuren oder Bereiche auszutauschen. Beispielsweise wurde so versucht, die Substratpräferenz der Pyranose-2-Oxidase aus *Trametes multicolor* durch Austausch von Threonin an Position 169 im aktiven Zentrum nach D-Galactose zu verschieben (Spadiut et al., 2008).

Es ist außerdem möglich, rationales und zufallsgerichtetes Design zu kombinieren und Aminosäuren an bestimmten Stellen zufällig auszutauschen (Cherry und Fidantsef, 2003; Chica et al., 2005; Scopes et al., 1998). Diese Methode wird als halb-rationeller Ansatz bezeichnet, da ein zufälliger Austausch einer ausgewählten Aminosäure stattfindet. Mit dieser Methode konnte beispielsweise die Thermostabilität der Pyranose-2-Oxidase deutlich gesteigert werden (Masuda-Nishimura et al., 1999; Bastian et al., 2005).

6. Ziele der Arbeit

Im Rahmen des Projektes ERUDESP („Development of electrochemical reactors using dehydrogenases for enantiopure synthon preparations“) sollte ein elektroenzymatischer Reaktor zur Synthese enantiomerenreiner Feinchemikalien konstruiert werden.

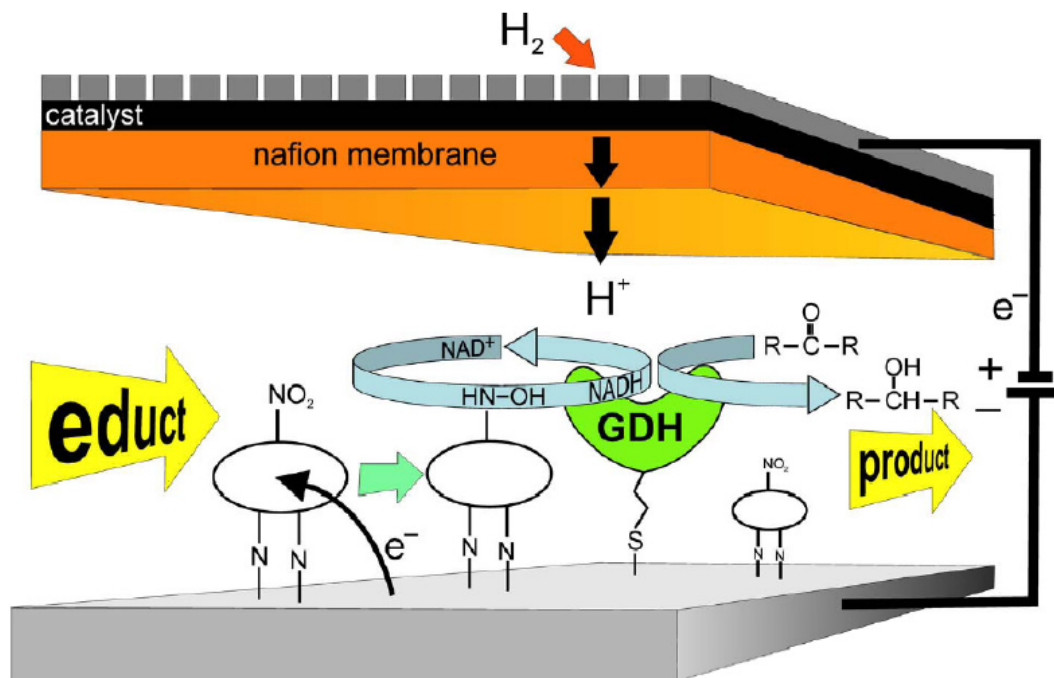


Abbildung I.10: Schematische Darstellung eines elektroenzymatischen Mikroreaktors im Reduktionsbetrieb. Dargestellt ist die mesostrukturierte Kathode mit immobilisiertem Enzym (hier GDH \approx GatDH) und Mediator, der Cofaktor NADH/NAD⁺, die Wasserstoffverzehranode sowie der Edukt-/Produkt-Stoffstrom. Die Abbildung wurde von Dr. Harald Natter erstellt.

Auch mehrstufige Synthesen mit unterschiedlichen Enzymen wären durch das Hintereinanderschalten verschiedener Module denkbar. Abbildung I.10 zeigt eine schematische Darstellung des elektroenzymatischen Mikroreaktors im Reduktionsbetrieb.

Am Projekt ERUDESCP wirken verschiedene Gruppen von Naturwissenschaftlern mit. Eine Gruppe beschäftigt sich mit der Konstruktion und der Synthese von Mediatoren, eine zweite Gruppe mit dem Elektrodenmaterial und der Elektrodenoberfläche und weitere Gruppen mit der Konstruktion des Reaktors oder mit der Entwicklung von geeigneten Oberflächen-Beschichtungen. Nicht zuletzt ist die Arbeit der Kristallographen und Bioinformatiker zu erwähnen. Grundlegend auf ihren Ergebnissen sollten während dieser Arbeit die Enzyme, die als Modelle im Projekt dienen, durch Proteinengineering verbessert werden. Im Rahmen dieser Arbeit standen vor allem die Enzyme LSDH aus *B. japonicum*, die heterolog exprimiert und charakterisiert werden sollte, und GatDH aus *R. sphaeroides*, deren Stabilität durch verschiedene Ansätze verbessert werden sollte, im Vordergrund.

Im Zuge der Archivierung verlor die 1993 isolierte *Stenotrophomonas*-Spezies (Mayers-Küntzer, 1993) ihre L-Sorbitol-Dehydrogenase-Aktivität. Deshalb sollte ein neues Enzym gefunden werden, welches zur Herstellung von D-Sorbose L-Sorbitol in ausreichender Menge umsetzt. Das entsprechende Gen sollte isoliert und kloniert, das resultierende Enzym charakterisiert werden. Außerdem sollten erste Umsätze durchgeführt werden, um das Reaktionsprodukt mittels HPLC nachzuweisen.

In einem weiteren Experiment, sollte die Stabilität der Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) aus *Rhodobacter sphaeroides* verbessert werden, um ihre Anwendung im ERUDESCP-Reaktor zu ermöglichen. Dazu dienten verschiedene Ansätze: die Zufallsmutagenese (*error-prone* PCR), die Iterative Sättigungsmutagenese (ISM), das rationale Design und die Einführung neuer Disulfid-Brücken am Dimer-Dimer-Interface durch gerichtete Evolution.

Die Klonierung, heterologe Expression und Anreicherung einer Diaphorase, die den Elektronentransfer zwischen einem Mediator und dem Cofaktor im ERUDESCP-Reaktor verbessern sollte, war ebenfalls ein Ziel dieser Arbeit.

Zuletzt sollten zwei weitere Modellenzyme – die D-Mandelat-Dehydrogenase aus *Lactococcus lactis* (DMDH) und die L-Mandelat-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* (LMDH) – zum Projekt ERUDESCP beigetragen werden. Das entsprechende Gen der DMDH sollte mit His₆-Tag kloniert, das Enzym angereichert und charakterisiert werden. Als Grundlage dienten dabei die Arbeiten von Chambellon et al. (2009). Aufgrund der Membranassoziation der LMDH sollten verschiedene Varianten zur Verbesserung der Löslichkeit des Enzyms konstruiert werden, wie sie bereits von Mitra et al. (1993) beschrieben wurden. DMDH und LMDH sollen außerdem in einem weiteren Projekt Anwendung finden. Aufgrund ihres

Anwendungspotentials für die Produktion enantiomerenreiner α -Hydroxysäuren, sind sie für die Herstellung semi-synthetischer Antibiotika interessant (Hummel et al., 1988; Kim und Yun, 2004). Die lösliche DMDH ist NAD^+ -abhängig, die membrangebundene LMDH ist FMN-abhängig. Dies wiederum eröffnet die Möglichkeit, die verschiedenen Systeme in elektrochemischen Anwendungen zu vergleichen. Durch gezielte Modifikationen sollen die beiden Enzyme auch in diesem Projekt an Gold-Nanopartikeln direkt immobilisiert werden. Diese Gold-Nanopartikel dienen als Additive in den Sol-Gel-Schichten. Für die lösliche DMDH sollen hier dieselben Sol-Gel-Systeme verwendet werden wie sie bereits erfolgreich für die D-Sorbitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* angewandt wurden (Wang et al., 2010; Gajdzik et al., 2007). Für die membrangebundene LMDH soll diese Methode mit Vesikeln, die in der Sol-Gel-Matrix eingeschlossen sind, angewandt werden.

II. Material und Methoden

1. Organismen, Primer, Vektoren und Plasmide

1.1 Organismen

1.1.1 Bodenisolat

Zur Isolierung von Mikroorganismen, die mit L-Sorbitol als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen können, wurden Bodenproben an verschiedenen Standorten in Süddeutschland gesammelt. Die Proben stammten aus einer privaten Kompostanlage und einer Streuobstwiese in Erfweiler-Ehlingen (Gemeinde Mandelbachtal), einer privaten Kompostanlage in Illingen, von Weinbergen in Bühl-Altschweier und Bad Säckingen (Baden-Württemberg), sowie vom „Veilchenbrunnen“, der „Teufelhöhle“, einer Streuobstwiese in „Weidmannsgesee“ und dem Waldweg „Püttlachtal“ in Pottenstein (Fränkische Schweiz, Bayern).

1.1.2 Referenzstämme

Vergleichsstämme für die Identifizierung der Bodenisolat wurden aus der institutseigenen Stammsammlung entnommen und in NB-Medium kultiviert. Als Referenzstämme dienten *Escherichia coli* K12 (*wild type strain*), *Bacillus subtilis* (*type strain NRS744*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium sporogenes*, *Proteus vulgaris* und *Streptococcus faecalis*.

1.1.3 *E. coli*-Stämme für die Klonierung und Expression von PCR-Fragmenten

***E. coli* TOP10 OneShot**

E. coli TOP10 OneShot-Zellen sind chemisch kompetente Zellen, die für die TOPO-TA-Klonierung (siehe II.6.5.1) verwendet wurden.

***E. coli* BL21Gold(DE3)**

Für die Expression rekombinanter Enzyme wurde der Stamm *E. coli* BL21Gold(DE3) verwendet. Dieser Wirtsorganismus ist ein Derivat des *E. coli* K12-Stammes, welcher im Chromosom integriert eine Kopie des Gens für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors enthält, der durch Zugabe von IPTG induziert werden kann.

***E. coli* BL21Gold(DE3)pLysS**

Dieser Stamm weist prinzipiell die gleichen Eigenschaften auf wie *E. coli* BL21Gold(DE3), allerdings enthält er das zusätzliche pLysS-Plasmid, welches eine Chloramphenicol-Resistenz trägt und für intrazelluläres Lysozym kodiert. Lysozym schwächt durch Auflösung der β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure im Peptidoglykan die Zellwand von *E. coli*. Als Folge kann Wasser in die Zelle eindringen, welche daraufhin anschwillt und schließlich lysiert. Solange die Cytoplasmamembran intakt ist, verbleibt das Lysozym jedoch im Zellinnern. Erst durch Zugabe des Tensids Triton-X 100, das die Zellmembran destabilisiert, kann es zur Mureinschicht gelangen und die Zellyse herbeiführen. Die genetischen und phänotypischen Eigenschaften der verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle II.1 zusammengefasst.

Tabelle II.1: Geno- bzw. phänotypische Eigenschaften der verwendeten Stämme sowie deren Bezugsquellen.

Stamm	Geno- bzw. Phänotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21Gold(DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> , λ (DE3), <i>endA</i> , Hte	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21Gold(DE3)pLysS	B F ⁻ <i>omp T hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>dcm</i> ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> , λ (DE3), <i>endA</i> , Hte [pLysS, Cam ^r]	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10 OneShot	F ⁻ , <i>merA</i> , D (mrr- <i>hsdRMS-merBC</i>), F80lacZD M15, DlacX74, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , D (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (STr ^R) <i>endA</i> , <i>nupG</i>	Stratagene

1.1.4 Sonstige Stämme

Die phänotypischen Eigenschaften der verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle II.2 zusammengefasst.

Tabelle II.2: Phänotypische Eigenschaften der verwendeten Stämme sowie deren Bezugsquellen.

Stamm	Phänotyp	Bezugsquelle
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	aerob, gram-negativ, stäbchenförmig	DSMZ
<i>Pseudomonas putida</i>	aerob, gram-negativ, polar begeißelt, stäbchenförmig, keine Sporen	abteilungseigene Stammsammlung
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	gram-positiv, kokkoid, unbeweglich	DSMZ
<i>Clostridium kluyveri</i>	anaerob, gram-positiv, stäbchenförmig, endosporenbildend	DSMZ

1.1.5 Stammhaltung und Lagerung

Zur Erhaltung der Mikroorganismen wurden die verschiedenen Reinkulturen auf entsprechenden festen Nährmedien kultiviert, die gegebenenfalls ein Antibiotikum zur Selektion enthielten (bei genetisch veränderten Stämmen). Die Platten werden zum Schutz vor Verdunstung mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert.

Aus Flüssigkulturen werden außerdem Glycerinkulturen erstellt, indem 500 µl einer Kultur in der exponentiellen Phase mit 500 µl prozentigem Glycerin vermischt wurden. Die Glycerinkulturen werden bei -70°C gelagert. Glycerin verhindert eine Kristallbildung innerhalb der Zellen, die die Zellen beim Einfrieren zerstören würde.

1.2 Primer

Die für die PCR verwendeten Primer sind in Tabelle II.3 zusammengefasst.

Tabelle II.3: In den PCR-Reaktionen eingesetzte Primer.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz 5' → 3'	T _m [°C]
DiHo-27-f	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	47,4
DiHo-1525-r	AAGGAGGTGWTCCARCC	44,8
pET-gene-f	CGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCT	67,9
pET-gene-r	CCGTTTAGAGGCCCAAGGGTTATGC	68,0
M13-universalCS(-43)	AGGGTTTTCCAGTCACGACGT	59,6
M13-reverse CS(-49)	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	56,6
LSDH_NdeI_f	TGTTTCATATGGCGAGAGAATTGGAA	59,7
LSDH_BamHI_r	CGCAGGATCCCTAAAGATCGAAATT	58,6
LSDH_NHis_f	TTAAGAAGGAGATATACATATGCATCATCATC ATCATCAT GCGAGAGAATT	73,4
LSDH_NHis_r	ATCCCTAAAGATCGAAATTGGTCGGCAACATCACCA	73,1
LSDH_CHis_f	TAACITTAAGAAGGAGATATACATATGGCGAGA GAATTGG AAGGCAAGG	72,8

LSDH_CHis_r	AATTCGGATCCCTAATGATGATGATGATGATGA GATCGAAATT	72,9
LSDH_Cys1_f	TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGT GTCATCATCAT	64,2
LSDH_Cys1_r	CATGATGATGATGATGATGACACATATGTATAT CTCCT	64,3
LSDH_Cys2_f	TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGT GTTGTCATCATCAT	66,3
LSDH_Cys2_r	CATGATGATGATGATGATGACAACACATATGTA TATCTCCT	66,9
LSDH_NHis_Thrombin_P1	AATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGC	77,5
LSDH_NHis_Thrombin_P2	TCTCGCTGATCCTCGTGGTACTAGATGATGATG ATGATGATGCAT ATGTATATCTC	77,1
LSDH_NHis_Thrombin_P3	GCCCTTATCCGGATCCCTAAAGATCGAAATTGGT CGGCA	77,3
LSDH_NHis_Thrombin_P4	GAGATATACATATGCATCATCATCATCATCT AGTACCACGA GGATCAGCGAGA	77,1
DSDH_V184_del_f	GGGATCAACGTCAATGCCATCGCCCCGGGCGTG GACGGC	88,2
DSDH_V184_del_r	CCACCCCGTCCCAGTGCTCGCCGTCCACGCCCG	87,7
DSDH_Q140N_f	GGCGGCAAGATCATCAACATGGCAAGCAATGC CGGCCGC	85,8
DSDH_Q140N_r	CCTCGCCGCGGCGGCCGGCATTGCTTGCCAT	86,0
DSDH_Q140G_f	GGCAAGATCATCAACATGGCAAGCGGGGCCGGCCGC	85,3
DSDH_Q140G_r	CCGCGGCGGCCGGCCCGCTTGCCAT	84,9
DSDH_NHis_Thrombin_P1	AATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGC	77,5
DSDH_NHis_Thrombin_P2	GAGCCGTGATCCTCGTGGTACTAGATGATGATG ATGATGGTGCATATGTATAT	77,2
DSDH_NHis_Thrombin_P3	CGACGGAGCTCGAATTCGGATCCTCAGCTCATC CAGTT	77,9
DSDH_NHis_Thrombin_P4	ATATACATATGCACCATCATCATCATCTAGT ACCACGAGGATCACGGCTC	77,2
LMDH_f	AAAAACATATGAGCCAGAATCTCTTTAACGTTG AGGAC	66,8
LMDH_r	TTTTGGATCCTCATGCGTGTGTTCCTTTAC	66,1
LMDH_177-215Δ_P1	TTCAAGATACCATTAGAAATGCAGGCAGCATTG	66,7
LMDH_177-215Δ_P2	CTGCATTTCTAATGGTATCTTGAATCGGTTATGCAG	66,8
LMDH_177-229Δ_P1	AAAAAGGATCCATGAGCCAGAATCTCTTTAACG TTGAGGACTATCG	73,8
LMDH_177-229Δ_P2	CCAGTTGAAACTTGGTATCTTGAATCGGTTATGC AGGTC	71,0
LMDH_177-229Δ_P3	TTCAAGATACCAAGTTTGAAGTGGGAGGCATTGAGA	69,8
LMDH_177-229Δ_P4	TTTTGCGGCCGCTCATGCGTGTGTTCCTTTA	74,7
MDH/GOX_f	GCAAATGGGTCGCGGATCCATGAGCCAGAATCT CTTTAACGT	78,8
MDH/GOX_1_P2_r	GTCAATACCCTCAAAGTTCTTCAATGTTAGAAAA GGTGGTATCTTGAA	71,3
MDH/GOX_1_P3_f	GAGGGTATTGACCTGGGCAAGATGGACAAAGA AATTTAGAAATGCAG	77,4
MDH/GOX_2_P2_f	ACCAGCGACATATGAGGAAAGGCCAGAGTCAT TTGCTTTGTCCAT	78,2
MDH/GOX_2_P3	TCATATGTCGCTGGTCAGATTGATCGAAGTTTCA ACTGGGAGGCA	79,1
LMDH_CHis_f	CAGCAAATGGGTCGCGGATCCATGAGCCAGAATC	77,0
LMDH_CHis_r	GCTCGAATTCCTAATGATGATGATGATGATGTGGGTG	76,7

GOX_f	ATTAGCAGAAGGAATTCATGGAGATCACAAATGT	64,5
GOX_r	TATATAAACTTGAAGCTTTTATAATCTGGCAACA GCACG	65,8
DMDH_f	AAAACATATGAGAATCACAATTGCCGGTGC	65,2
DMDH_r	TTTTGGATCCTTATTTTCGCCTTTAATAACTCTTCTTT	65,0
DMDH_NHis_f	AGATATACATATGCATCATCATCATCATAGA ATCACA	65,2
DMDH_NHis_r	TTTTGGATCCTTATTTTCGCCTTTAATAACTCTTCTTT	65,0
Diaphorase_BamHI_f	CCCGGATCCATGATTGATAATAAAGCATTTTATAAAC	65,7
Diaphorase_Sall_r	TTTGTCGACTTAATCCAAAGGTTTAAATTTTGCTTTG	66,3
Diaphorase_CHis_f	GGACAGCAAATGGGTGCGGGATCCATGATTGAT AATAAAGCA	77,5
Diaphorase_CHis_r	CGCAAGCTTGTGACTTAATGATGATGATGATG ATGATCCAAAGTTT	77,2
Diaphorase_NHis_f	ATGGGTCGCGGATCCATGCATCATCATCATC ATATTGATAATAAA	77,4
Diaphorase_NHis_r	GTGCGGCCGCAAGCTTGTGACTTAATCCAAAG GTTTAAATTT	76,8
GatDH_NHis_f	GGAGGAAGACATATGCACCACCACCACCACCA CGACTACAGGACGGTTTTTCGTCTCG	86,1
GatDH_NHis_r	CAGAATTCGGATCCTCACCAGACCGTGTAACCG CCATCGAC	79,8
GatDH_NHis_Thrombin_P1	AATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTGTG	75,9
GatDH_NHis_Thrombin_P2	TGATCCTCTTGGTACTAGGTGGTGGTGGTGGT GTGCATATGTAT	76,2
GatDH_NHis_Thrombin_P3	CTAGTACCAAGAGGATCAGACTACAGGACGGT TTTTCGTCTCGATGG	75,6
GatDH_NHis_Thrombin_P4	GAGCTCGAATTCGGATCCTCACCAGACCGTGTAACCG	76,5
GatDH_A12R_f	CTCGATGGCCGCTGCGCGGCCGTCACCGGAGC	86,4
GatDH_A12R_r	GGCCGCGCAGCGGCCATCGAGACGAAAAACCG TCCGTAGTCGT	86,6
GatDH_P235D_f	CGCTGTTCCCTGCTCGGACGCGGCGAGCTATGTCAC	82,0
GatDH_P235D_r	GTGACATAGCTCGCCGCGTCCGAGGCAAGGAACAGCG	82,0
GatDH_A57E_f	GACCGGGCGGCCAGGAGCTTGGCGAGGCGGTTGCG	88,7
GatDH_A57E_r	GGCCACGATCCGCGCCGCAACCGCCTCGCCAAGCTC	88,4
GatDH_A58R_f	GGCCCAGGAGCTTGGCGCGCGGGTTGCGGCG	87,0
GatDH_A58R_r	CCACGATCCGCGCCGCAACCCGCGCGCCAAG	87,1
GatDH_A32H_f	CGGGCCTTCCATGCCTCGGGCGCGCGGCTC	85,4
GatDH_A32H_r	GCCCGAGGCATGGAAGGCCCGGCAGATTTGAGGCC	84,6
GatDH_A72D_f	GTGGCCGACGTGACGGATGCGGAGGACATGACCGCC	84,9
GatDH_A72D_r	CGGCGGCCGCGGCGGTCAITCCTCCGCATC	86,0
GatDH_V64R_f	GCGGTTGCGGCGCGGATCCGGGCCGACGT	85,4
GatDH_V64R_r	CGCATCCGTCACGTCCGCCCCGATCCGCGC	84,7
GatDH_A126E_f	GGCCAGCCGCGAGTTCGGCCGCGC	79,6
GatDH_A126E_r	GCGCGGCCGAACCTCGCGGCTGGCC	79,6
GatDH_A77H_f	GGAGGCGATGACCGCCGCGCACGCCGAGGC	85,4
GatDH_A77H_r	ACGGCTTCCGCTCGGCGTGCAGCGGCGGT	85,2
GatDH_S87D_f	GCCGTGGCGCCGGTGCACATCCTCGTCAATTCCG	83,3
GatDH_S87D_r	CGGAATTGACGAGGATGTCGACCGGCGCCACGGC	83,3
GatDH_ISM_201/202_f	GAGATGACGCTGAAGATGNNKNNKCGGCCCGA GCTCTTCGAG	82,0
GatDH_ISM_201/202_r	CTCGAAGAGCTCGGGCCGMNNMNNCATCTTC AGCGTCATCTC	82,0
GatDH_ISM_49/50_f	GAGGCTGCGGCCCTCANNKNNKCGGCCAGGAGCTT	84,7

GatDH_ISM_49/50_r	AAGCTCCTGGGCCGCMNNMNNAGGGCCGCAGCCTC	84,7
GatDH_S238C_f	GACGCGGCGTGTATGTCACGGGCGCGATCCTC	80,0
GatDH_S238C_r	GCCCGTGACATAACACGCCGCGTCCGAGGCAAG	80,7
GatDH_Y239C_f	GCGGCGAGCTGTGTACGGGCGCGATCCTC	81,1
GatDH_Y239C_r	GCCCGTGACACAGCTCGCCGCGTCCGAGG	80,8
GatDH_E224C_f	GAGCCCTCGTGTATCGCGGCGGCGGCGCT	81,4
GatDH_E224C_r	CGCCGCGATACACGAGGGCTCGCCGCAGC	81,4
GatDH_M160C/Q168C_f	AGCTACTGTGCTCGAAGGGGGCGGTGCATTG TCTGACG	81,3
GatDH_M160C/Q168C_r	CGTCAGACAATGCACCGCCCCCTTCGAGGCACA GTAGCT	81,3
GatDH_Y239C/V247C_f	GCGAGCTGTGTACGGGCGCGATCCTCGCGTGT GATGGC	87,6
GatDH_Y239C/V247C_r	GCCATCACACGCGAGGATCGCGCCCGTGACAC AGCTCGC	87,6
GatDH_R152C_f	CACCATCGTCAACTGTCCGCAGTTCGCCTCG AGCTACATGG	81,3
GatDH_R152C_r	GGCGAACTGCGGACAGTTGACGATGGTGCC CGACAT	81,2
GatDH_W254C_f	CGGTTACACGGTCTGTTGAGGATCCGAATTC GAGTCCGTCG	81,0
GatDH_W254C_r	CGAATTCGGATCCTCAACAGACCGTGTAAC CGCCATCGACCG	82,2
GatDH_F231C_f	GCGGCGCTGTGTCTTGCTCGGACGCGGC	81,8
GatDH_F231C_r	GAGGCAAGACACAGCGCCGCCGCGCG	81,1
GatDH_E176C_f	CTCGCCGCTGTGGGCGGGCCGGGG	82,5
GatDH_E176C_r	GCCCGCCCAACAGGCGGCGAGCGCCC	82,7
GatDH_F155C_f	CGCCCGCAGTGTGCTCGAGCTACATGGCCTCG	81,2
GatDH_F155C_r	GCTCGAGGCACACTGCGGGCGGTGACGATGG	81,1
GatDH_Q168C_f	GCGGTGCATTGTCTGACGCGGGCGCTCGCC	82,7
GatDH_Q168C_r	CCGCGTCAGACAATGCACCGCCCCCTTCGAGGC	82,6
GatDH_Q168M_f	GCGGTGCATATGCTGACGCGGGCGCTCGCC	82,3
GatDH_Q168M_r	CCGCGTCAGCATATGCACCGCCCCCTTCGAGGC	82,2

1.3 Vektoren und Plasmide

Klonierungsvektor pCR®II-TOPO®

Der linearisierte pCR®II-TOPO®-Vektor (Invitrogen) besitzt an beiden Enden Thymin-Überhänge. Sofern die PCR mit einer Polymerase durchgeführt wurde, die Adenin-Überhänge an das PCR-Produkt anhängt, kann die Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor direkt erfolgen. Die Klonierung der DNA-Fragmente gelingt mit Hilfe einer dem Vektor eigenen, am 3'-Ende kovalent gebundenen Topoisomerase II. Somit ist eine schnelle und einfache Klonierung ohne Verwendung einer Ligase möglich. Die Eigenschaften des *E. coli* Klonierungsvektors pCR®II-TOPO® sind in Tabelle II.4 zusammengefasst.

Tabelle II.4: Eigenschaften des Klonierungsvektors pCR®II-TOPO®.

Vektor	Größe [kb]	Eigenschaften
pCR®II-TOPO®	3,9	lacZ α , SP6 Promotor, F1 origin, MCS, Amp ^r , Kan ^r

Expressionsvektor pET-24a(+)

Als Expressionsvektor wurde der Vektor pET-24a(+) (Novagen) verwendet, bei dem das Fremdgen unter der Kontrolle der sehr starken Transkriptions- und Translationssignale des Bakteriophagen T7 steht. Die Expression wird induziert, wenn die T7-RNA-Polymerase von der Wirtszelle zur Verfügung gestellt wird. Die Eigenschaften des verwendeten Expressionsvektors für *E. coli* pET-24a(+) sind in Tabelle II.5 zusammengefasst.

Tabelle II.5: Eigenschaften des Expressionsvektors pET-24a(+).

Vektor	Größe [kb]	Eigenschaften
pET-24a(+)	5,31	Kan ^r , T7lac, His-Tag (C), T7-Tag (N)

Chaperone Plasmid Set (Takara)

Zur Faltungsunterstützung von Proteinen und damit zur Verringerung der Bildung von *inclusion bodies* wurde das *Chaperone Plasmid Set* von *Takara Bio Inc.* verwendet. Die im Set enthaltenen Chaperon-Plasmide, deren Promotoren, Resistenzmarker sowie die zur Induktion der Chaperon-Expression verwendeten Substanzen, sind in Tabelle II.6 zusammengefasst.

Tabelle II.6: Chaperon-Plasmide, jeweilige Promotoren, Resistenzmarker und Induktoren.

Plasmid	Chaperongen	Promotor	Induktor	Resistenzmarker
pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL	<i>araB</i> <i>Pzt1</i>	L-Arabinose Tetracyclin	Cm
pGro7	groES-groEL	<i>araB</i>	L-Arabinose	
pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	<i>araB</i>	L-Arabinose	
pG-Tf2	groES-groEL-tig	<i>Pzt1</i>	Tetracyclin	
pTf16	tig	<i>araB</i>	L-Arabinose	

Sonstige Plasmide

Tabelle II.7 fasst alle während dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Plasmide zusammen.

Tabelle II.7: Während dieser Arbeit verwendete und erzeugte Plasmide.

Plasmidbezeichnung	Beschreibung
K5_LSDH_pET	LSDH aus K5 in Expressionsvektor pET-24a(+)
LSDH_pET	LSDH aus <i>B. japonicum</i> USDA110 in pET-24a(+)
LSDH_CHis_pET	LSDH aus <i>B. japonicum</i> USDA110 mit C-terminalem His ₆ -Tag in pET-24a(+)
LSDH_NHis_pET	LSDH aus <i>B. japonicum</i> USDA110 mit N-terminalem His ₆ -Tag in pET-24a(+)
LSDH_Cys	LSDH aus <i>B. japonicum</i> USDA110 mit N-terminalem Cys- und His ₆ -Tag in pET-24a(+)
LSDH_2Cys	LSDH aus <i>B. japonicum</i> USDA110 mit N-terminalem Cys ₂ - und His ₆ -Tag in pET-24a(+)
LSDH_C68F	LSDH_NHis mit einfacher Mutation C68F
LSDH_M228A	LSDH_NHis mit einfacher Mutation M228A
LSDH_Thrombin	LSDH aus <i>B. japonicum</i> USDA110 mit N-terminalem His ₆ -Tag und Thrombin-Schnittstelle zur Abspaltung des His ₆ -Tags in pET-24a(+)
LSDH_Stenotrophomonas	LSDH aus <i>S. maltophilia</i> in pET-24a(+)
GatDH_NHis	Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>R. sphaeroides</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag in pET-24a(+); Quelle: Kornberger, 2009
GatDH_Thrombin	Galaktitol-Dehydrogenase aus <i>R. sphaeroides</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag und Thrombin-Schnittstelle zur Abspaltung des His ₆ -Tags in pET-24a(+)
GatDH_A32H*	GatDH_NHis mit einfacher Mutation A32H
GatDH_A57E*	GatDH_NHis mit einfacher Mutation A57E
GatDH_A58R*	GatDH_NHis mit einfacher Mutation A58R
GatDH_A32H/A57E*	GatDH_NHis mit Doppelmutation A32H/A57E
GatDH_A32H/A58R*	GatDH_NHis mit Doppelmutation A32H/A58R
GatDH_A57E/A58R*	GatDH_NHis mit Doppelmutation A57E/A58R
GatDH_A32H/A57E/A58R*	GatDH_NHis mit Dreifachmutation A32H/A57E/A58R
GatDH_S87D*	GatDH_NHis mit einfacher Mutation S87D
GatDH_A77H*	GatDH_NHis mit einfacher Mutation A77H
GatDH_A126E*	GatDH_NHis mit einfacher Mutation A126E
GatDH_A77H/A126E*	GatDH_NHis mit Doppelmutation A77H/A126E
GatDH_V64R*	GatDH_NHis mit einfacher Mutation V64R
GatDH_A72D*	GatDH_NHis mit einfacher Mutation A72D
GatDH_V64R/A72D*	GatDH_NHis mit Doppelmutation V64R/A72D
GatDH_A12R*	GatDH_NHis mit einfacher Mutation A12R
GatDH_P235D*	GatDH_NHis mit einfacher Mutation P235D
GatDH_A12R/P235D*	GatDH_NHis mit Doppelmutation A12R/P235D
GatDH_F231C	GatDH_NHis mit einfacher Mutation F231C
GatDH_M160C/Q168C	GatDH_NHis mit Doppelmutation M160C/Q168C
GatDH_E224C/Y239C	GatDH_NHis mit Doppelmutation E224C/Y239C
GatDH_F155C/E176C	GatDH_NHis mit Doppelmutation F155C/E176C
GatDH_Y239C/V247C	GatDH_NHis mit Doppelmutation Y239C/V247C
GatDH_E224C/S238C	GatDH_NHis mit Doppelmutation E224C/S238C
GatDH_R152C/W254C	GatDH_NHis mit Doppelmutation R152C/W254C
GatDH_Q168C	GatDH_NHis mit einfacher Mutation Q168C

GatDH_Q168M	GatDH_NHis mit einfacher Mutation Q168M
DMDH_pET	D-Mandelat-Dehydrogenase aus <i>L. lactis</i> in pET-24a(+)
DMDH_NHis_pET	D-Mandelat-Dehydrogenase aus <i>L. lactis</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag in pET-24a(+)
LMDH_pET	L-Mandelat-Dehydrogenase aus <i>P. putida</i> in pET-24a(+)
LMDH_177-215Δ_pET	L-Mandelat-Dehydrogenase aus <i>P. putida</i> mit C-terminalem His ₆ -Tag in pET-24a(+); Deletion der Aminosäuren 177-215
LMDH_177-229Δ_pET	L-Mandelat-Dehydrogenase aus <i>P. putida</i> mit C-terminalem His ₆ -Tag in pET-24a(+); Deletion der Aminosäuren 177-229
MDH/GOX1_pET	L-Mandelat-Dehydrogenase aus <i>P. putida</i> mit C-terminalem His ₆ -Tag in pET-24a(+); Deletion der AS 177-215 und Insertion der AS 176-195 der GOX aus Spinat
MDH/GOX2_pET	L-Mandelat-Dehydrogenase aus <i>P. putida</i> mit C-terminalem His ₆ -Tag in pET-24a(+); Deletion der AS 177-215 und Insertion der AS 176-209 der GOX aus Spinat
Diaphorase_pET	Diaphorase aus <i>C. kluyveri</i> in pET-24a(+)
Diaphorase_CHis_pET	Diaphorase aus <i>C. kluyveri</i> mit C-terminalem His ₆ -Tag in pET-24a(+)
Diaphorase_NHis_pET	Diaphorase aus <i>C. kluyveri</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag in pET-24a(+)

Alle markierten Plasmide (*) wurden auch mit Thrombin-Schnittstelle zur Abspaltung des His₆-Tags erzeugt.

2. Herstellung von L-Sorbitol

Zur Herstellung von L-Sorbitol werden 94 g D-Gulono- γ -Lacton in 940 ml H₂O_{deion.} gelöst (530 mM) und unter Zugabe einer äquimolaren Menge des Reduktionsmittels Natriumborhydrid reduziert. Aufgrund der relativ heftigen Reaktion kann Natriumborhydrid nur spatelweise und unter Rühren zugegeben werden. Das so entstandene L-Sorbitol wird durch Ionenaustauschchromatographie von Borat befreit. Zunächst wurde ein starker Kationenaustauscher (Amberlite IR-120, H⁺-Form) verwendet, welcher mit 3 N HCl regeneriert und anschließend dreimal mit H₂O_{deion.} gewaschen wurde. Dann wurde ein starker Anionenaustauscher (Amberlite IRA-420) verwendet. Das Säulenmaterial wurde mit 2 N NaOH regeneriert. Auf diese Weise konnte eine Ausbeute an L-Sorbitol von etwa 75% erreicht werden.

3. Nährmedien und Zusätze

Zur Herstellung der Nährmedien wurden die einzelnen Bestandteile in den vorgeschriebenen Volumina an H₂O_{deion.} gelöst. Gegebenenfalls wurde der pH-Wert gemessen und entsprechend auf den benötigten Wert eingestellt. Zur Herstellung fester

Medien wurde den flüssigen Nährlösungen 1,6 % (w/v) Agar zugesetzt. Alle Medien – ausgenommen vom Bodenextrakt – wurden für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Betrug das Volumen des Sterilisationsgutes mehr als 1,5 Liter, wurde die Sterilisationszeit auf 40 Minuten verlängert.

L-Sorbitol-Screening-Medium

L-Sorbitol	10 mM
NH ₄ Cl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,4 g
NaCl	0,4 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 g
Vitaminlösung	1 ml
Spurenelementlösung SL4	1 ml

10x Vitaminlösung (Pfennig, 1964)

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 ₂ O _{deion.}	ad 100 ml

10x Spurenelementlösung SL4 (Pfennig und Lippert, 1966)

FeSO ₄ x 7 H ₂ O	2,0 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ x 7 H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,3 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
EDTA	5,0 g
Cl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,3 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

Medien für die Referenzstämme

NB-Medium (*Nutrient Broth*):

Pepton	5 g
Fleischextrakt	3 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

Medien für *E. coli***Komplexmedium**

Trypton	17,0 g
Pepton aus Soja	3,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
Glukose	2,5 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

LB-Medium

Trypton	10,0 g
NaCl	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Glukose	1,0 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

SOC-Medium

Trypton	2 %	
Hefeextrakt	0,5 %	
NaCl	10,0 mM	
MgCl ₂	10,0 mM	
MgSO ₄	10,0 mM	
KCl	2,5 mM	
Glukose	20,0 mM	in H ₂ O _{deion.}

Medien für sonstige Stämme**Medien für *Bradyrhizobium japonicum* USDA110****Hefeextrakt-Mannitol-Medium**

Mannitol	10,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Hefextrakt	0,4 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

Bodenextrakt-Medium

Hefeextrakt	1,0 g
Mannitol	10,0 g
Bodenextrakt	200 ml
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

Bodenextrakt

luftgetrockneter Gartenboden	80,0 g
Na ₂ CO ₃	0,2 g
H ₂ O _{deion.}	200 ml

Zur Herstellung des Bodenextrakts wurde die Bodensuspension für eine Stunde bei 121°C autoklaviert. Um einen klaren Überstand zu erhalten, wurden die festen Bodenbestandteile abzentrifugiert. Der pH-Wert des Bodenextrakts wurde anschließend auf 7,2 eingestellt. Zur

Herstellung des Mediums wurde der Bodenextrakt mit den anderen Bestandteilen vermischt und das Volumen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ auf einen Liter aufgefüllt. Im Anschluss wurde das Medium für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Medium für *Clostridium kluveri*

Kaliumacetat	10,0 g
K_2HPO_4	0,31 g
KH_2PO_4	0,23 g
NH_4Cl	0,25 g
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Spurenelementlösung SL10	1,0 ml
Selenite-Tungstate-Solution	1,0 ml
Hefeextrakt	1,0 g
Resazurin	0,5 mg
Ethanol	20,0 ml
NaHCO_3	2,5 g
Sieben-Vitamin-Lösung	1,0 ml
Cystein-HCl x H_2O	0,25 g
$\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$	ad 1000 ml

10x Spurenelementlösung SL10 (Widdel et al., 1983)

HCl, 25%	10,0 ml
$\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	1,5 g
ZnCl_2	70,0 mg
$\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$	100,0 mg
H_3BO_3	6,0 mg
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	190,0 mg
$\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2,0 mg
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	24,0 mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	36,0 mg
$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$	ad 1000 ml

Selenite-Tungstate-Solution

Na_2SeO_3	2,0 mg
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 1,5 \text{H}_2\text{O}$	4,0 mg
NaOH 0,1 N	ad 1000 ml

Sieben-Vitamin-Lösung

4-Aminobenzoat	40,0 mg
Folsäure	30,0 mg
Liponsäure	10,0 mg
Nicotinsäure	100,0 mg
Pantothensäure	50,0 mg
Pyridoxamin	100,0 mg
Biotin	10,0 mg
$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$	ad 1000 ml

Medium für *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Trypticase-Hefeextrakt-Medium (pH 7)

<i>Trypticase soy broth</i>	30,0 g
Hefeextrakt	3,0 g

Medium für *Pseudomonas putida***Lösung A**

MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,2 g
Na-Molybdat	0,002 g
Fe(III)-NH ₄ -Citrat	0,01 g
SL6	100 µl
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g
H ₂ O _{deion.}	ad 300 ml

Lösung B

KH ₂ PO ₄	6,8 g
Na ₂ HPO ₄ × 12 H ₂ O	6,48 g
H ₂ O _{deion.}	ad 300 ml

Lösung C

DL-Mandelsäure	15,0 g
H ₂ O _{deion.}	ad 300 ml

Lösung D

CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,067 g
H ₂ O _{deion.}	ad 100 ml

**Spurenelementlösung SL6
(Pfennig, 1974)**

ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	0,03 g
H ₃ BO ₃	0,3 g
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,2 g
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	0,188 g
Na ₂ Mo ₄ × 2 H ₂ O	0,03 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

Die Lösungen A, B, C und D werden getrennt autoklaviert und erst nach dem Autoklavieren verinigt.

Zusätze zu den Nährmedien: Antibiotika und Chemikalien

Die Stammlösungen verschiedener Antibiotika und Chemikalien wurden nach der Herstellung und Sterilfiltration bei -20°C aufbewahrt und bei Bedarf den Medien nach dem Autoklavieren steril zugesetzt. Zur Herstellung X-Gal-haltiger Platten wurden 15 Minuten vor Gebrauch 80 µl X-Gal-Lösung auf LB_{Kan}-Platten ausplattiert. Tabelle II.8 fasst alle Nährmedien-Zusätze zusammen.

Tabelle II.8: Den Medien zugesetzte, sterilfiltrierte Antibiotika und andere Chemikalien.

Substanz	Stammlösung	Lösungsmittel	Endkonzentration	Bezugsquelle
Kanamycin	50 mg/ml	H ₂ O	50 µg/ml	Roth
Chloramphenicol	40 mg/ml	EtOH	40 µg/ml	Boehringer Mannheim GmbH
Tetracyclin	10 µg/ml	EtOH	1-10 ng/ml	AppliChem
L-Arabinose	100 mg/ml	H ₂ O	0,5-4 mg/ml	Fluka
IPTG	100 mM	H ₂ O	0,1 mM	SigmaAldrich
X-Gal	2%	DMF	80 µl pro Platte	Serva

4. Isolierung von Mikroorganismen aus Boden- und Wasserproben

4.1 Anreicherung auf festen Nährmedien

Von den Bodenproben wurden jeweils 2 g in 0,9% NaCl resuspendiert und die groben Bodenbestandteile abzentrifugiert. Vom so erhaltenen Überstand bzw. von den Wasserproben wurde eine Verdünnungsreihe (10^0 bis 10^{-5}) erstellt. Die verschiedenen Verdünnungsstufen wurden auf L-Sorbitol-Screening-Platten (L-Sorbitol-Screening-Medium mit 1,8 % Agar-Agar) ausplattiert (100 µl pro Platte). Anschließend wurden die Platten für mehrere Tage bei 28°C inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze auf eine neue L-Sorbitol-Screening-Platte übertragen und erneut bei 28°C inkubiert, um die Übertragung von Bodensubstraten auf die Platten auszuschließen.

4.2 Anreicherung in Flüssigkultur

Zur Anzucht in Flüssigkultur wurden einzelne Kolonien von gut gewachsenen Reinkulturen mit einer sterilen Impföse entnommen und in 5 ml L-Sorbitol-Screening-Medium resuspendiert. Diese Kulturen wurden bei 28°C und 170 rpm für mehrere Tage inkubiert und das Wachstum durch Messung der optischen Dichte verfolgt.

4.3 Bestimmung von Wachstumsparametern

4.3.1 Optische Dichte

Das Wachstum von Mikroorganismen kann durch Messung der optischen Dichte der Zellsuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) verfolgt werden. Für den

Nullabgleich dient unbeimpfte Nährlösung. Die Messungen werden in Kunststoffküvetten (Schichtdicke 1 cm) in einem Spektralphotometer durchgeführt. Um die optische Dichte in einem Messbereich von 0,1 bis 0,3 zu bestimmen, wurde die Zellsuspension gegebenenfalls mit Nährlösung verdünnt.

4.3.2 Wachstumsrate μ und Verdopplungszeit t_d

Durch halblogarithmische Auftragung der optischen Dichte gegen die Zeit können die Wachstumsrate μ und die Verdopplungszeit t_d aus dem linearen Bereich der Wachstumskurve bestimmt werden. Dies geschieht nach folgenden Formeln:

$$\mu = \frac{(\ln x_1 - \ln x_0)}{(t_1 - t_0)} \qquad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

μ : Wachstumsrate [h^{-1}]; x_0 bzw. x_1 : OD_{600} zum Zeitpunkt t_0 bzw. t_1 ; t_0 bzw. t_1 : Zeitpunkt der Probennahme; t_d : Verdopplungszeit [h]

4.4 Herstellung zellfreier Rohextrakte

Zur Herstellung zellfreier Rohextrakte wurden die Zellen in der exponentiellen Phase bei 4000 x g, 15 Minuten und 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde in 7 ml Waschpuffer (Tris/HCl, 20 mM, pH 8,5) je Gramm feuchte Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen. Durch Ultraschall werden mechanische Schwingungen erzeugt, wodurch Zellwände und Membranen der Zellen zerstört werden. Unter Kühlung im Eisbad wurden die in Waschpuffer resuspendierten Zellen mit einer gerätespezifischen Leistung von 22 *microns* (MSE Soniprep 150, Curtin Matheson Scientific Inc.) 8 x 60 s aufgeschlossen. Nach jedem Beschallungsintervall erfolgte eine Abkühlungsphase von ebenfalls 60 s. Während jeder Kühlphase wurden 500 μl der Zellsuspension entnommen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 16600 x g und 4°C für 30 Minuten entfernt. Der so erhaltene zellfreie Rohextrakt wird auf L-Sorbitol-Dehydrogenase-Aktivität getestet.

5. Taxonomische Untersuchungen

5.1 Bestimmung des Gram-Typs: Gramfärbung, KOH-Test, Aminopeptidase-Test

Auf der Suche nach einer Färbemethode, mit der Bakterien in tierischen Geweben gefärbt und kontrastierend zu den Gewebezellen dargestellt werden konnten, entwickelte der dänische Mediziner Hans Christian Gram als Mitarbeiter bei Carl Friedländer in Berlin 1884 die Methode der **Gramfärbung**. Diese Färbung hat in der Bakteriensystematik eine große Bedeutung erlangt und selbst bei Schnellverfahren in der medizinischen Diagnostik wird auf die Gramfärbung nur selten verzichtet. Bei der Gramfärbung wird ein hitzefixierter Ausstrich des Testbakteriums mit einem Triphenylmethanfarbstoff und mit Iod gefärbt. Im Anschluss wird der Ausstrich mit einem organischen Lösungsmittel (i. Allg. Ethanol) entfärbt. Bei gramnegativen Bakterien wird hierbei der Iod-Farbstoffkomplex leichter extrahiert als bei grampositiven. Für die Gramfärbung wurden folgende Lösungen verwendet (Süßmuth et al., 1987):

Salzlösung

NaCl	5,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,12 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

Kristallviolettlösung

Kristallviolett	2,0 g
EtOH 96%	20 ml

Lugol'sche Lösung

Iod	1,0 g
Kaliumiodid	2,0 g
H ₂ O _{deion.}	ad 300 ml

Safraninlösung

Safranin O	0,25 g
EtOH 96%	10 ml
H ₂ O _{deion.}	100 ml

Entfärbelösung

EtOH 96%	100 ml
Aceton	100 ml

Auf einen Objektträger wird pro Testorganismus ein Tropfen Salzlösung aufgebracht. Mit einer Impföse wird nun ein wenig Zellmaterial von einer Agarplatte, die mit dem Testorganismen bewachsen sind, entnommen und mit dem Tropfen Salzlösung bis zur Homogenität verrieben. Nachdem die Flüssigkeit eingetrocknet ist, wird der Objektträger zur Hitzefixierung mit den Bakterien nach oben zweimal langsam durch die entleuchtete Bunsenbrennerflamme gezogen. Die hitzefixierten Ausstriche werden nun für etwa eine Minute mit Kristallviolett bedeckt. Im Anschluss wird der Farbstoff mit deionisiertem Wasser abgespült, wobei das Wasser nicht länger als wenige Sekunden einwirken soll, damit

für die anschließende Farblackbildung noch genügend Farbstoff vorhanden bleibt. Die Ausstriche werden nun mit Lugol'scher Lösung beträufelt. Die Einwirkzeit beträgt eine Minute. Die Lösung wird dann mit deionisiertem Wasser abgespült, die Ausstriche werden an der Luft getrocknet. Zur Entfärbung wird Ethanol/Aceton aufgetropft und der Objektträger etwa 30 Sekunden leicht geschwenkt. Die Feuchtigkeit kann mit einem weichen Papier aufgesaugt werden. Zuletzt erfolgt die Gegenfärbung mit Safraninlösung für 10 Sekunden. Der Farbstoff wird erneut mit deionisiertem Wasser abgespült. Der Objektträger wird ohne Deckglas zunächst mit einem 10er Objektiv durchmustert. Geeignete Stellen des Präparates werden mit einem 100er Objektiv und mit Ölimmersion im Hellfeldmikroskop betrachtet. Grampositive Bakterien erscheinen dunkelviolett, gramnegative hellrot.

Die **KOH-Probe** ist ein Schnellverfahren zur Gram-Identifizierung (Gregersen, 1978). Durch die Einwirkung von 0,5 M KOH wird die gramnegative Zellwand zerstört, wodurch die DNA freigesetzt wird und als viskoser Faden in Erscheinung tritt. Grampositive Bakterien lysieren nicht unter der Einwirkung von KOH. Eine Kolonie des zu testenden Organismus wird mit einer Impföse in einem Tropfen 0,5 M KOH verrieben. Zieht man die Impföse nach wenigen Sekunden aus der Bakteriensuspension heraus, wird die Zellyse gramnegativer Bakterien durch die charakteristische Fadenbildung deutlich.

Die L-Aminopeptidase ist mit wenigen Ausnahmen nur bei gramnegativen Bakterien nachweisbar (Cerny, 1978). Der **Amino-peptidase-Test**, der einfach mit Teststreifen („Bactident“, MERCK, Darmstadt) durchgeführt werden kann, beruht darauf, dass L-Alanin-4-Nitroanilid mit Hilfe der L-Aminopeptidase in L-Alanin und das gelbe 4-Nitroanilid gespalten wird. Bei gramnegativen Bakterien färbt sich der Teststreifen deshalb gelb, bei grampositiven bleibt er weiß.

Als Referenzstämme bei allen Gramtyp-Untersuchungen dienen *E. coli* (gramnegativ) und *Bacillus subtilis* (grampositiv).

5.2 Katalase- und Cytochromoxidase-Nachweis (Süßmuth et al., 1987)

Die Katalase katalysiert die Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser. Luftsauerstoff kann in der Bakterienzelle zu Peroxid-Radikalen, Radikal-Anionen und H_2O_2 hydriert werden. Das Fehlen von Superoxid-Dismutase und Katalase ist für die Sauerstoffempfindlichkeit von obligaten Anaerobiern verantwortlich. Zum **Nachweis der Katalase** (Schlegel und Zaborosch, 1992) werden mit dem Testorganismus bewachsene Agarplatten mit Wasserstoffperoxidlösung (3% in $H_2O_{deion.}$) überschichtet. Ein katalasepositiver Organismus wird durch sofort einsetzende Gasbildung angezeigt. Als

Kontrollorganismen für den Katalase-Nachweis dienten *Pseudomonas fluorescens* (katalasepositiv) und *Streptococcus faecalis* (katalasenegativ).

Die Cytochromoxidase ist das terminale Enzym der Atmungskette, welche in den Mitochondrien der Eukaryonten und in den Membranen vieler Bakterien lokalisiert ist. Für den **Cytochromoxidase-Nachweis** wurden folgende Reagenzien verwendet:

Lösung A: 1-Naphthol, 1 % in EtOH 96%

Lösung B: *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylendiammoniumdichlorid, 1 % in H₂O_{deion.}

Lösung A und Lösung B werden kurz vor Gebrauch im Verhältnis 2:3 gemischt.

Zum Nachweis der Cytochromoxidase werden Agarplatten, die mit dem zu testenden Bakterium bewachsen sind, mit dem fertig gemischten Reagenz beträufelt. Organismen, bei denen in weniger als 30 Sekunden eine Blaufärbung eintritt, gelten als cytochromoxidasepositiv. Dabei oxidiert die Cytochromoxidase Cytochrom *c*, welches wiederum das Nachweisreagenz oxidiert, was durch eine Blaufärbung angezeigt wird. Als Kontrollorganismen für den Cytochromoxidase-Nachweis dienten *Pseudomonas aeruginosa* (cytochromoxidase-positiv) und *E. coli* (cytochromoxidase-negativ).

5.3 Verwertbarkeit von Zuckern: *Hugh-Leifson-Test* und *Bunte Reihe*

Beim *Hugh-Leifson-Test* wird die Fähigkeit eines Bakteriums ermittelt, einen bestimmten Zucker in einem komplexen Nährmedium oxidativ oder fermentativ (durch Gärung unter Luftabschluss) verwerten zu können. Zugleich wird getestet, ob bei dieser Kohlenhydratverwertung Säure- oder Gasbildung stattfindet. Die Prüfung auf Säurebildung erfolgt mit pH-Indikator, Gasbildung lässt sich in dem hier verwendeten Weichagar an Bläschenbildung erkennen. Für den *Hugh-Leifson-Test* wurden folgende Medien verwendet:

Bacto-Pepton	2,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Agar	15,0 g
Bromthymolblau	0,03 g
Glucose	1,0 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

Zwei Hochschichtagarröhrchen werden durch Einstechen mit einer Impfnadel mit dem Zellmaterial beimpft. Eins der beiden Röhrchen wird mit Paraffin luftdicht verschlossen. Beide Röhrchen werden zwei Tage bei 28°C inkubiert. Als Kontrollorganismen dienten *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium sporogenes* und *E. coli*.

Die „**bunte Reihe**“ dient ebenfalls dem Nachweis von Gas- und Säurebildung aus Zuckern. Neben einem pH-Indikator im Medium zum Nachweis der Säurebildung enthalten die Reagenzgläser Durham-Röhrchen zum Nachweis der Gasbildung. Für die „bunte Reihe“ wurden folgende Medien verwendet:

NB-Medium mit

- 1% Glucose oder
- 1% Galactose oder
- 1% Laktose

Als pH-Indikator ist im Medium außerdem Bromthymolblau enthalten, welcher zwischen pH 6 und pH 7,6 von blau (alkalisch) nach gelb (sauer) umschlägt. Die Reagenzgläser werden mit den zu testenden Bakterien beimpft und 24 Stunden bei 28°C inkubiert. Als Kontrollorganismen dienten *E. coli*, *Bacillus subtilis* und *Proteus vulgaris*.

5.4 Nachweis von Exoenzymen: Caseinase-Nachweis und Stärkehydrolyse

Für den **Caseinase-Nachweis** wurde folgendes Medium verwendet:

Calciumcaseinat-Agar

Fleischextrakt	3,0 g
Pepton aus Fleisch	5,0 g
NaCl	5,0 g
Casein	2,5 g
Ca(OH) ₂	0,15 g
CaCl ₂	0,05 g
Agar	15,0 g

Agarplatten werden mäanderförmig mit dem zu testenden Organismus beimpft und zwei Tage bei 28°C inkubiert. Die Kolonien casein-abbauender Bakterien sind nach der Bebrütung von einem klaren Hof umgeben. Dieser wird deutlich sichtbar, wenn die Platten mit

verdünnter Essigsäure überschichtet werden. Als Kontrollorganismen dienten *E. coli*, *Bacillus subtilis* und *Proteus vulgaris*.

Für den **Nachweis des Stärkeabbaus** (Stolp und Gadkari, 1981) wurde folgendes Medium verwendet:

Stärkeagar

Glucose	5,0 g
Stärke	20,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	18,0 g
Pepton aus Casein	3,0 g

Stärkeagarplatten werden mäanderförmig mit den zu testenden Organismen beimpft und zwei Tage bei 28°C bebrütet. Zum Nachweis des Stärkeabbaus werden die Platten mit Iod-Iodkali-Lösung überschichtet. Nicht abgebaute Stärke färbt sich blau. Als Kontrollorganismen dienten *E. coli* (negativ) und *Bacillus subtilis* (positiv).

5.5 Genetische Bakterienidentifizierung mithilfe der 16S-rDNA-Sequenzanalyse

5.5.1 Isolierung der genomischen Bakterien-DNA

Für die Isolierung genomischer DNA aus Bakterien wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet (Herstellerangaben):

1 x PBS

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

Binding Buffer (pH 4,4)

Guanidin/HCl	6 M
Urea	10 mM
Tris/HCl	10 mM
Triton-X 100	20 % (v/v)

Inhibitor Removal Buffer (pH 6,6)

Guanidin/HCl	5 M
Tris/HCl	20 mM
Ethanol 100%	20 ml

Wash Buffer (pH 7,5)

NaCl	20 mM
Tris/HCl	2 mM
Ethanol 100%	80 ml

Tris/HCl (pH 8,0)

Tris/HCl	10 mM
----------	-------

Elution Buffer (pH 8,5)

Tris/HCl	10 mM
----------	-------

Die Isolierung genomischer DNA aus Bakterien erfolgte mit dem *High Pure PCR Template Preparation* Kit der Firma Roche. Zunächst werden 200 µl Bakteriensuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und fünf Minuten bei 12800 × g geerntet. Das Zellpellet wird in 200 µl PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellen werden mit 5 µl Lysozym (10 mg/ml in Tris/HCl) versetzt und für 15 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgt eine Zugabe von 200 µl *Binding Buffer* und 40 µl Proteinase K (im Kit enthalten). Nach sofortigem Mischen wird der Ansatz für zehn Minuten bei 70°C inkubiert. Zur Fällung der genomischen DNA werden schließlich 100 µl Isopropanol zugegeben und gut gemischt. Die flüssige Probe wird nun auf ein *High Filter Tube* gegeben und eine Minute bei 12800 × g zentrifugiert. Es folgen verschiedene Waschschrte mit *Inhibitor Removal Buffer* und *Wash Buffer* und schließlich die Elution mit auf 70°C vortemperiertem *Elution Buffer*.

5.5.2 Amplifikation des bakteriellen 16S-rDNA-Fragments

Ribosomale DNA (rDNA) ist unter allen Organismen stark konserviert und wird deshalb bevorzugt für phylogenetische Studien verwendet. Primer werden anhand der konservierten Bereiche abgeleitet. Die mit diesen Primern amplifizierten DNA-Fragmente können für Homologievergleiche und Datenbankanalysen herangezogen werden. Der Grad der Homologie zwischen den Sequenzen wird schließlich als Maß für die Verwandtschaft der verschiedenen Arten interpretiert (Woese et al., 1980; Weisburg et al., 1991).

Die 16S-rDNA-Sequenzanalyse wurde mit einer Polymerase durchgeführt, die eine 3'→5'-Exonucleaseaktivität (*Proofreading*-Funktion) besitzt (*Crimson LongAmp Taq DNA-Polymerase*, *New England Biolabs*), um eine möglichst genaue Amplifikation der 16S-rDNA-Sequenz zu garantieren. Als Template diente hierbei die frisch isolierte genomische DNA aus den Bodenisolaten. Zur Amplifikation der 16S-rDNA-Sequenz wurden die Primer DiHo-27-f und DiHo-1525-r (Lane, 1991) verwendet. Die erwartete Fragmentlänge liegt bei ca. 1500 bp, da mit den verwendeten Primern die Sequenz von der Base 27 bis zur Base 1525 amplifiziert wird. Zur Amplifikation diente folgender PCR-Ansatz:

5x Puffer	10 µl
dNTP-Mix	2 µl
Primer f	2 µl
Primer r	2 µl
Template	1 µl
Taq-Polymerase	2 µl
H ₂ O _{millipore}	31 µl
<hr/> Σ	<hr/> 50 µl

Die *Annealing*-Temperatur lag bei 44,4°C; die Elongationszeit betrug 1,5 Minuten. Die Schritte II bis IV (Denaturierung, *Annealing* und Elongation) werden insgesamt 35 mal wiederholt. Da mit Hilfe der verwendeten Polymerase Adenin-Überhänge an das PCR-Produkt angehängt werden, kann das gereinigte PCR-Produkt direkt nach der Amplifikation für die TOPO-TA-Klonierung (siehe II.6.5.1) verwendet werden. Zur Überprüfung des Klonierungserfolgs wurde eine *Colony*-PCR (siehe II.6.5.3) durchgeführt; aus Klonen, die das richtige Insert trugen, wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe II.6.1.1) und sequenziert (siehe II.6.6).

6. Gentechnische Standardmethoden

6.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (alkalische Lyse)

6.1.1 Plasmid-Minipräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das *HiYield® Plasmid Mini DNA-Kit* von Süd-Laborbedarf GmbH verwendet. Dem Kit liegt das Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) zu Grunde. Für die Plasmidisolierung wurden die im Kit enthaltenen Puffer und Lösungen verwendet. Zunächst werden Kolonien in 5 ml LB_{Kan}-Flüssigmedium über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtskultur werden dann in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben und die Zellen eine Minute bei 12800 x g geerntet. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Das in Puffer P1 enthaltene EDTA ist ein Komplexbildner und Ionenfänger, der die Zellmembran destabilisiert. Zum Abbau von RNA enthält P1 außerdem RNase A. Im Anschluss werden 200 µl Puffer P2 zugegeben, durch Invertieren vorsichtig gemischt und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert bis die Suspension aufklart. Puffer P2 enthält NaOH, welches wie EDTA zur Destabilisierung der Zellmembran dient, und das anionische Detergenz SDS, welches die Membran zerstört und Proteine und genomische DNA zerstört. Die Plasmid-DNA liegt in einer *supercoiled*-Form vor und wird somit nicht wie die genomische DNA durch das alkalische Milieu zerstört. Dann werden 300 µl Puffer P3 zugegeben, die Suspension mehrmals invertiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur und 12800 x g zentrifugiert. Durch das in P3 enthaltene Kaliumacetat werden die denaturierten Proteine ausgefällt. Die wässrige Phase wird nach der Zentrifugation abgenommen und auf die PD-Säule gegeben. In Anwesenheit eines chaotropischen Salzes bindet die Plasmid-DNA im Lysat nun an die Glasfaser-Matrix der

Säule (Vogelstein und Gillespie, 1979). Die DNA wird nun mit verschiedenen Puffern gewaschen und schließlich mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ von der Säule eluiert. Die reine Plasmid-DNA kann bei -20°C gelagert werden.

6.1.2 *Toothpick*-Minipräparation (Sambrook und Russell, 2001)

Die *Toothpick*-Minipräparation dient der Isolierung von Plasmid-DNA aus Kolonien. Für diese Methode wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

EDTA-Lösung		NSS-Lösung	
EDTA	10 mM	NaOH	2 N
		SDS	0,5 %
		Saccharose	20 %

Kaliumchlorid-Lösung

KCl	1 M
-----	-----

Einzelne Kolonien werden in $50\ \mu\text{l}$ EDTA-Lösung resuspendiert. Auch hier dient EDTA der Destabilisierung der Zellmembran. Dann werden $50\ \mu\text{l}$ frisch angesetzte NSS-Lösung zugegeben und 30 s gevortext. Das in der NSS-Lösung enthaltene NaOH dient ebenfalls der Zellmembrandestabilisierung, SDS zerstört die Membran und denaturiert Proteine. Saccharose dient der osmotischen Stabilisierung. Der Ansatz wird für fünf Minuten bei 70°C inkubiert. Zuletzt werden $6\ \mu\text{l}$ KCl-Lösung zugegeben, um die denaturierten Proteine auszufällen, 30 s gevortext und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die ausgefällten Proteine werden schließlich bei $12800 \times g$ drei Minuten lang abzentrifugiert. Der so erhaltene Überstand enthält die Plasmid-DNA, die nun für PCR-Reaktionen eingesetzt werden kann. So entfällt die Anzucht einzelner Klone in Flüssigkultur zur Isolierung der Plasmid-DNA.

6.2 Isolierung genomischer DNA aus Spinat (*Spinacia oleracea*)

Für die Isolierung genomischer DNA aus Spinat wurde folgender Puffer verwendet:

DNA-Extraktionspuffer

Tris	200 mM, pH 7,5
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM, pH 8
SDS	0,5 %

Zur Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen wurden kleine Blattstückchen in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit 400 µl DNA-Extraktionspuffer versetzt. Mit Hilfe eines Pistills werden die Blattstücke homogenisiert. Die groben Blattbestandteile werden für fünf Minuten bei 12800 x g abzentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß, das 300 µl Isopropanol zur Fällung der genomischen DNA enthält, überführt und kurz gevortext. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für fünf Minuten bei 12800 x g. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet, das die genomische DNA enthält, wird bei Raumtemperatur getrocknet und in 400 µl TE-Puffer aufgenommen.

6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde folgender Puffer verwendet:

10x TBE-Puffer (pH 8,0)

Tris	0,9 M	
Borsäure	0,9 M	
EDTA	25 mM	in H ₂ O _{deion.}

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe aufzutrennen. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandert sie im elektrischen Feld von der Kathode weg in Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Moleküle wird dabei von mehreren Faktoren beeinflusst. Ist das DNA-Molekül linear, besteht über einen weiten Größenbereich der DNA eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus (\log_{10}) der Fragmentlänge (in bp) und der Wanderungsdistanz im Agarosegel in cm (Lottspeich und Zorbas, 1998). Die Größe der Nukleinsäuremoleküle hängt auch von ihrer Form ab. So zeigen superhelikale, offene, doppelsträngig-lineare und einzelsträngige DNA-Moleküle der gleichen absoluten Masse unterschiedliches Wanderungsverhalten. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist außerdem von der Konzentration der Agarose im Gel abhängig. Je höher die Konzentration der Agarose, desto „engmaschiger“ das Gel und desto langsamer die Wanderungsgeschwindigkeit. Andere Parameter, die die Wanderungsgeschwindigkeit beeinflussen sind zum Beispiel die angelegte Spannung, die Art des Laufpuffers oder auch die Anwesenheit interkalierender Stoffe. Zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese wurden die aufzutrennenden DNA-Proben mit 1 µl 6x *loading dye* je 5 µl Probe versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die

DNA-Fragmente wurden schließlich bei einer Spannung von 120 V ca. 45 Minuten aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Gel 15 Minuten im Ethidiumbromidbad gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in GC-Paare des DNA-Doppelstranges. Die einzelnen Fragmente können dann im UV-Licht bei 312 nm detektiert und auf einem Transilluminator fotografiert werden.

6.4 Reisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Reisolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde mit dem *NucleoSpin Extract II*-Kit von Machery-Nagel durchgeführt. Es wurden die im Kit enthaltenen Puffer und Lösungen verwendet. Zunächst werden die DNA-Fragmente in einem Agarose-Gel (1,4 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wird das Gel für 20 Minuten im Ethidiumbromidbad gefärbt, so dass die Banden auf einem UV-Schneidetisch detektiert werden können. Die gewünschten Banden werden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und die Masse der Gelstücke bestimmt. Pro 100 g Gelstück werden 200 µl *Buffer NT* zugegeben und bei 50°C im Heizblock inkubiert bis die Agarose vollständig gelöst ist. Diese Suspension wird auf eine Säule, die sich in einem leeren Sammeltube befindet, gegeben und eine Minute bei 12800 x g zentrifugiert. Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wird mit 700 µl *Buffer NT3* gewaschen. Im Anschluss werden durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 12800 x g alle Ethanolreste entfernt. Die Elution der DNA von der Säule erfolgt mit 20 µl *Elution Buffer* und Zentrifugieren bei 12800 x g für eine Minute.

6.5 Klonierung von PCR-Fragmenten

6.5.1 TOPO-TA-Klonierung

Der linearisierte pCR®II-TOPO®-Vektor besitzt an beiden Enden Thymin-Überhänge. DNA-Fragmente, die Adenin-Überhänge tragen, können somit in den Vektor eingebaut werden. Dies geschieht mit Hilfe einer vektoreigenen, am 3'-Ende kovalent gebundenen Topoisomerase II, wodurch eine schnelle und einfache Ligation ohne Verwendung einer Ligase möglich ist. Für die TOPO-TA-Klonierung wurde das *TOPO-TA-Cloning*-Kit von Invitrogen verwendet. Zur Durchführung der TOPO-TA-Klonierung wurde folgender Ansatz erstellt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert:

PCR-Produkt	4,0 μ l
<i>Salt Solution</i>	1,0 μ l
Vektor	1,0 μ l
<hr/>	
Σ	6,0 μ l

Dieser Reaktionsansatz wird anschließend zu den chemisch kompetenten *Top 10 One Shot*-Zellen gegeben, sanft gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen werden dann mit dem Plasmid transformiert, indem sie für 30 Sekunden einer Temperatur von 42°C ausgesetzt werden (Hitzeschock-Transformation). Sofort danach werden die Zellen auf Eis gestellt und mit 250 μ l SOC-Medium versetzt. Der Ansatz wird anschließend für eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert (220 rpm) und auf LB_{Kan}-Platten mit X-Gal ausplattiert. Die Platten werden dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion von Zellen, die den rekombinanten Vektor tragen, erfolgt bei der TOPO-TA-Klonierung über die Kanamycin-Resistenz und durch ein *Blue-White-Screening*. Zellen, die den Vektor aufgenommen haben, erhalten durch die Anwesenheit des Plasmids einen Selektionsvorteil, nämlich eine Kanamycin-Resistenz, gegenüber nicht-transformierten Zellen. Somit bilden nur solche Zellen Kolonien auf kanamycinhaltigen Platten, die den Vektor aufgenommen haben, wodurch sie von nicht-transformierten Zellen unterschieden werden können. Die erhaltenen Kolonien können neben den rekombinanten Vektoren auch leere, religierte Vektoren enthalten. Tragen die Zellen den leeren Vektor, so haben sie zwar eine Kanamycin-Resistenz, enthalten jedoch nicht das gewünschte Amplifikat. Deshalb erfolgt zusätzlich die Selektion über das im Vektor enthaltene *lacZ*-Gen. Dieses Gen kodiert für die β -Galaktosidase, welche das Lactose-Analogon X-Gal zu einem blauen Produkt umsetzt. Das Insert wird dabei direkt in den kodierenden Bereich der β -Galaktosidase eingefügt. Dadurch wird der Leserahmen unterbrochen und das β -Galaktosidase-Gen inaktiviert. Solche Zellen, die den rekombinanten Vektor tragen, sind also nicht in der Lage, X-Gal umzusetzen und erscheinen auf der LB_{Kan}-Platte, auf der zuvor X-Gal ausplattiert wurde, als weiße Kolonie. Zellen, die hingegen nur den religierten, leeren TOPO-Vektor tragen, bilden eine intakte β -Galaktosidase und setzen X-Gal um. Sie erscheinen auf der LB_{Kan}-Platte als blaue Kolonie.

6.5.2 Klonierung in den Expressionsvektor pET-24a(+)

Zur Klonierung eines Amplifikats in den Expressionsvektor pET-24a(+) werden sowohl das Amplifikat als auch der Vektor in getrennten Ansätzen mit den gleichen

Restriktionsenzymen verdaut. Der Doppelverdau kann in einem Schritt durchgeführt werden. Hierzu dient folgender Ansatz:

10 x <i>FastDigest Buffer Green</i>	4,0 µl
DNA (Amplifikat bzw. Vektor)	20,0 µl
Enzym I	1,0 µl
Enzym II	1,0 µl
H ₂ O _{millipore}	14,0 µl
<hr/>	
Σ	40,0 µl

Der Ansatz wird sorgfältig gemischt, kurz abzentrifugiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wird der Ansatz für 10 Minuten auf 65°C erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren und den Verdau zu stoppen. Die verdauten Fragmente werden dann in einem Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten Banden aus dem Gel reisoliert. Amplifikat und Vektor werden schließlich mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase ligiert. DNA-Ligasen können einzelsträngige DNA-Ketten wieder miteinander verknüpfen und Einzelstrangbrüche schließen, was man sich bei der Erzeugung rekombinater Plasmide zu Nutze macht. Des Weiteren ist es mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase möglich, so genannte „*blunt ends*“ zu verknüpfen. Es hat sich folgender Ansatz bewährt, um eine möglichst hohe Ligationseffizienz zu gewährleisten:

Amplifikat	10,0 µl
Vektor	3,0 µl
10 x Ligationspuffer	2,0 µl
T4-DNA-Ligase	1,5 µl
H ₂ O _{millipore}	3,5 µl
<hr/>	
Σ	20,0 µl

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 22°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Ligase wurde die Temperatur für zehn Minuten auf 65°C erhöht. Bis zur weiteren Verwendung kann der Ansatz bei 4°C aufbewahrt werden. Durch die Anwendung zweier verschiedener Restriktionsenzyme kann eine korrekte Ligation gewährleistet werden, da die Fragmente komplementäre Überhänge besitzen und der Einbau des Inserts in den Vektor gerichtet erfolgen kann. Auch die Wahrscheinlichkeit einer Religation kann so verringert werden.

6.5.3 Ligationskontrolle durch *Colony*-PCR

Aufgrund der Ineffizienz einer Ligation ist es unbedingt erforderlich, solche Zellen zu identifizieren, die den Vektor mit dem gewünschten Insert tragen. Dies erfolgte mit Hilfe einer *Colony*-PCR. Begründet wurde diese Methode, die sich vor allem durch die schnelle und kostengünstige Durchführbarkeit auszeichnet, 1989 von Güssow und Clackson. Die Methode erspart das übliche Prozedere aus Anzucht, Isolierung der Plasmid-DNA und Kontrollverdau und erlaubt die Kontrolle einer weitaus größeren Anzahl von Kolonien. Außerdem kann die Orientierung des Inserts überprüft werden, da es in seltenen Fällen zu einer Fehlligation kommen (Güssow und Clackson, 1989). Als Template dient hierbei entweder eine Kolonie oder eine *Toothpick*-Minipräparation einer Kolonie (siehe II.6.1.2). Zur Amplifikation werden entweder genflankierende Primer, die noch im Bereich des Vektors binden, oder genspezifische Primer verwendet. Für die *Colony*-PCR wurde eine Taq-Polymerase der Firma Axon Labortechnik verwendet. Der PCR-Ansatz enthält 0,2 mM Phenolrot, um ein Auftragen der PCR-Reaktionen auf das Agarosegel unmittelbar nach der Amplifikation zu ermöglichen. Für eine *Colony*-PCR mit zehn Kolonien wurde zunächst je nach verwendetem Vektor ein Mastermix aus folgenden Komponenten erstellt:

pCR®II-TOPO®-Vektor		pET-24a(+)	
10x Puffer	6,0 µl	10x Puffer	6,0 µl
MgCl ₂	3,6 µl	MgCl ₂	3,6 µl
dNTPs	1,2 µl	dNTPs	1,2 µl
DMSO	4,8 µl	DMSO	2,4 µl
Primer <i>M13-universalCS(-43)</i>	1,1 µl	Primer <i>pET-gene-f</i>	1,1 µl
Primer <i>M13-reverseCS(-49)</i>	1,1 µl	Primer <i>pET-gene-r</i>	1,1 µl
Phenolrot 10 mM	1,2 µl	Phenolrot 10 mM	1,2 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl	Taq-Polymerase	0,5 µl
H ₂ O _{millipore}	40,6 µl	H ₂ O _{millipore}	43,0 µl
<hr/>		<hr/>	
Σ	60,0 µl	Σ	60,0 µl

Der Mastermix wurde gut durchmischt und zu je 5 µl auf PCR-Gefäße verteilt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wird ein Teil einer Kolonie von einer Agarplatte abgenommen, in das PCR-Gefäß getaucht und durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Durch die dabei entstehenden Scherkräfte und durch die hohen Temperaturen im Verlauf der PCR-Reaktion werden die Zellwände der Bakterien zerstört. Zusätzlich macht das im PCR-Ansatz enthaltene DMSO die Membranen durchlässig. Alternativ werden 0,5 µl einer *Toothpick*-Minipräparation (siehe II.6.1.2) zum PCR-Ansatz gegeben. Von den gepickten Kolonien wird

zur Klonarchivierung eine Masterplatte angelegt. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

Tabelle II.9: PCR-Programme für die *Colony*-PCR mit unterschiedlichen Vektoren.

PCR-Schritt		pET-24a(+)		pCR®II-TOPO®	
		Temperatur [°C]	Dauer [min]	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1	Denaturierung	95	5	95	5
2	Denaturierung	95	0,5	95	0,5
3	<i>Annealing</i>	62	0,5	65	0,5
4	Elongation	72	x	72	x
5	finale Elongation	72	10	72	10
6	Abkühlung	4	∞	4	∞

Die Elongationszeit x muss der erwarteten Amplifikatlänge angepasst werden. Je nach Polymerase muss mit einer Amplifikation von ca. 1000 bp pro Minute gerechnet werden. Die Amplifikate werden im Anschluss an die PCR-Reaktion im Agarosegel analysiert.

6.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC Biotech AG, Konstanz bzw. von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg durchgeführt. Die DNA-Sequenzierungsmethode nach Sanger et al., 1977 wird auch als Kettenabbruchverfahren bezeichnet. Hierbei werden Didesoxynucleosidtriphosphate eingesetzt. Dies sind Derivate der Desoxynucleosidtriphosphate, denen die 3'-Hydroxylgruppe fehlt (Alberts, 2005). In vier getrennten Reaktionsansätzen wird die zu sequenzierende DNA durch eine DNA-Polymerase mit Hilfe spezifischer Oligonukleotidprimer und der vier Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) synthetisiert. Außerdem enthält jeder Reaktionsansatz eines der vier Didesoxynucleosidtriphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), welche zufällig in die wachsende DNA-Kette eingebaut werden. Da diesen Didesoxynucleosidtriphosphaten die 3'-OH-Gruppe fehlt, kann die Addition weiterer Nucleoside nicht fortgesetzt werden. Somit entstehen zu der zu sequenzierenden DNA komplementäre DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die mit einem der vier verschiedenen Didesoxynucleosidtriphosphate aufhören. Die Fragmente werden elektrophoretisch in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Aufgrund gelabelter, d.h. fluoreszenzmarkierter Primer ist eine Detektion dieser unter UV-Licht

möglich. Zur Bestimmung der DNA-Sequenz werden von oben nach unten und über alle Spuren die Banden der Reihe nach gelesen (Alberts, 2005).

6.7 Herstellung elektrokompenter Zellen und Transformation mit Plasmid-DNA

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen (Hanahan, 1983) wurden Zellen des Stammes *E. coli* BL21Gold(DE3) bzw. des Stammes *E. coli* BL21Gold(DE3)pLysS verwendet. 400 ml LB-Medium werden mit 4 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C auf dem Rundschtüttler (220 rpm) inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,4-0,5 erreicht ist. Im Falle der *E. coli* BL21Gold(DE3)pLysS-Zellen wurde dem Medium zur Selektion noch Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 30 µg/ml zugesetzt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 4000 x g und 4°C für 15 min, um die Zellen zu sedimentieren. Das Zellpellet wird nun zweimal mit sterilem, eiskaltem H₂O_{millipore} gewaschen und erneut sedimentiert. Das so erhaltene Zellpellet wird in 20 ml einer sterilen, eisgekühlten Glycerinlösung (10% in H₂O_{millipore}) resuspendiert. Die Zellen werden anschließend wieder abzentrifugiert, in 2 ml Glycerinlösung (10% in H₂O_{millipore}) resuspendiert und in 50 µl Aliquots auf sterile 0,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Der Zelltiter sollte 3 x 10¹⁰ Zellen/ml betragen. Die fertigen elektrokompenten Zellen werden bei -70°C aufbewahrt. Um elektrokompente *E. coli*-Zellen mit rekombinanten Plasmiden zu transformieren, bedient man sich der Methode der Elektroporation (*Gene Pulser™/Pulse Controller*, Biorad). Hierbei werden die Zellen kurzen elektrischen Impulsen hoher Feldstärke ausgesetzt, wodurch in der Zellmembran Poren entstehen. Durch diese Poren gelangt das rekombinante Plasmid in die Zellen.

Um die Zellen mit dem rekombinanten Vektor zu transformieren, ist es zunächst notwendig, den Ligationsansatz zu entsalzen, um einen Kurzschluss zu vermeiden. Ist der Ligationsansatz nicht vollständig entsalzt, hat dies letztendlich zur Folge, dass die Poren weniger lang geöffnet bleiben und die Fremd-DNA weniger Zeit hat, in die Zelle zu gelangen. Somit sinkt die Effizienz der Transformation. Es kann auf verschiedenen Wegen entsalzt werden. Zum einen ist es möglich, den Ligationsansatz durch Dialyse gegen Glycerinlösung (10%) zu entsalzen. Bei einem Volumen von 20 µl pro Ligationsansatz dauert es etwa eine Stunde bis die Salze weitestgehend entfernt sind. Eine weitere Möglichkeit, den Ligationsansatz zu entsalzen, ist eine Fällung der DNA. Durch diese Methode werden außerdem Proteine inaktiviert und entfernt, die DNA selbst wird konzentriert. In einem ersten Schritt wird zum zu entsalzenden Ansatz ein äquivalentes Volumen Phenol/Chloroform (25:24) zugegeben und kräftig gevortext. Durch das Phenol/Chloroform werden die Proteine in der unteren organischen Phase gefällt. Es folgt ein

Zentrifugationsschritt bei 12800 x g für zehn Minuten. Die obere Phase, die die DNA enthält, wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt. Zur Entfernung des Phenols und zur Fällung der DNA in der wässrigen Phase werden 1/10 Volumen LiCl (4M) und 2,5 Volumen Ethanol (98%), das bei -20°C aufbewahrt wurde, zugegeben. Die Fällung der DNA erfolgt bei -20°C für mindestens 45 Minuten. Die gefällte DNA wird anschließend 30 Minuten bei 16600 x g und 4°C abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wird zweimal mit 100 µl -20°C kaltem Ethanol (70%) gewaschen. Zuletzt wird das Pellet bei 60°C getrocknet, in 20 µl H₂O_{millipore} aufgenommen und 30 Minuten bei 60°C gelöst.

Der entsalzte Ligationsansatz, die elektrokompenten Zellen und die Elektroporationsküvetten (Peqlab) werden auf Eis vorgekühlt. Der komplette Ligationsansatz wird zu den elektrokompenten Zellen gegeben und in die Elektroporationsküvetten pipettiert. Im Anschluss erfolgt die Elektroporation bei folgenden Bedingungen: 400 Ω, 25 µF und 2,5 kV. Sofort nach der Elektroporation werden die Zellen auf Eis gestellt und mit 500 µl SOC-Medium versetzt, welches der Regeneration dient. Die Zellen werden dann aus der Küvette in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß und für eine Stunde bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Der Transformationsansatz wird danach auf LB-Platten, die das zur Selektion transformierter Zellen erforderliche Antibiotikum enthalten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Am folgenden Tag werden die gewachsenen Kolonien mittels *Colony*-PCR (siehe II.6.5.3) auf die Anwesenheit des gewünschten Inserts überprüft.

7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur exponentiellen und selektiven Amplifikation beliebiger Nucleinsäureabschnitte. Der aus ca. 25 bis 35 Zyklen bestehende PCR-Prozess wird in einem Thermocycler durchgeführt. Hierbei besteht jeder Zyklus aus drei Schritten. Zunächst erfolgt eine Denaturierung der doppelsträngigen *Template*-DNA, indem sie auf 95°C erhitzt wird. Dabei werden die die beiden Stränge zusammenhaltenden Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen. Im ersten Zyklus wird die Temperatur von 95°C oft länger gehalten, um sicherzustellen, dass sich sowohl die *Template*-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen. Im zweiten Schritt erfolgt die Primerhybridisierung (*Annealing*). Hierbei muss die Temperatur gesenkt werden, so dass die Primer sich an das *Template* anlagern können. In dieser Phase ist die Temperatur abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Als Richtwert wählt man die Temperatur ca. 5°C unterhalb

der Schmelztemperatur der Primer. Die Schmelztemperatur T_m der Primer kann nach folgender Formle berechnet werden:

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

Wird die Temperatur zu niedrig gewählt, ist es möglich, dass die Primer sich an einer falschen Stellen anlagern. Ist die Temperatur dagegen zu hoch gewählt, kann es passieren, dass die Primer gar nicht binden. Abschließend erfolgt die so genannte Elongation. Die DNA-Polymerase beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers mit dem Anhängen freier Nukleotide komplementär zum Matrizenstrang. Die Temperatur ist hierbei abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase. Je nach Aufgabenstellung konnten verschiedene Polymerasen gewählt werden. Die Taq-Polymerase (AXON Labortechnik) zum Beispiel fügt Adenin-Überhänge an das PCR-Produkt an, was bei einer anschließenden TOPO-TA-Klonierung (siehe II.6.5.1) wichtig ist, jedoch besitzt sie keine *Proofreading*-Funktion. Da eine *Proofreading*-Funktion etwa bei einer *Colony*-PCR (siehe II.6.5.3) nicht notwendig ist, wird diese Polymerase bevorzugt für diese PCR eingesetzt. Bei einer *error-prone*-PCR (siehe II.7.2), bei der zufällige Fehler in das PCR-Produkt eingebaut werden sollen, ist das Fehlen der *Proofreading*-Funktion sogar erwünscht. Als Polymerase mit *Proofreading*-Funktion wurde bevorzugt die *Crimson LongAmp Taq*-DNA-Polymerase (New England Biolabs) verwendet (siehe II.7.1.2). Die Genauigkeit dieser Polymerase ist vergleichbar mit der der *Pfu*-Polymerase und sie erlaubt die Amplifikation von längeren Fragmenten. Außerdem erlaubt der im Reaktionspuffer enthaltene Farbstoff ein direktes Auftragen der Proben auf ein Agarosegel unmittelbar nach der Amplifikation. Die Temperatur, bei der die Elongation durchgeführt wird, ist abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase; die Dauer der Elongation muss der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments angepasst werden. Alternativ wurde die *FideliTaqTM*-DNA-Polymerase (USB) zur Amplifikation verwendet. Die Eigenschaften dieser Polymerase sind vergleichbar mit denen der *Crimson LongAmp Taq*-DNA-Polymerase (New England Biolabs).

Im Falle der *FideliTaqTMDNA-Polymerase* (USB) wurde folgender Ansatz gewählt.

Tabelle II.10: PCR-Ansatz zur Amplifikation mit der *FideliTaqTMDNA-Polymerase* (USB).

PCR-Ansatz	
10x Reaktionspuffer	5,0 μ l
dNTP-Mix	1,2 μ l
Primer <i>forward</i>	0,8 μ l
Primer <i>reverse</i>	0,8 μ l
Template	10 ng
<i>FideliTaqTMDNA-Polymerase</i>	0,5 μ l
DMSO	0,5 μ l
H ₂ O _{deion.}	ad 50,0 μ l

Tabelle II.11: PCR-Programm zur Amplifikation mit der *FideliTaqTMDNA-Polymerase* (USB). Die Schritte 2 bis 4 wurden 35-mal wiederholt. Die *Annealing*-Temperatur (x) wurde den verwendeten Primern angepasst, die Elongationszeit (y) der Länge des erwarteten Produkts (60s/kb).

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min.]
1. Denaturierung	95	5
2. Denaturierung	94	1
3. <i>Annealing</i>	x	1
4. Elongation	68	y
5. finale Elongation	68	7
6. Abkühlung	4	∞

7.1 Ortsgerichtete Mutagenese

7.1.1 KOD-QuikChange und Iterative Sättigungsmutagenese (ISM)

Der ligationsfreie *in vitro*-Austausch von Aminosäuren basiert auf dem *QuikChange® Site-directed Mutagenesis* Kit der Firma Stratagene und erfolgte mit Hilfe der *KOD-HotStart-DNA-Polymerase* (Merck/Novagen) aus *Thermococcus kodakaraensis*. Diese Polymerase übertrifft die *PfuTurbo®-DNA-Polymerase* in ihrer Schnelligkeit um das Fünffache bei gleicher Genauigkeit und vielfach höherer Prozessivität (Anzahl angehängter Nucleotide, die die Polymerase im Durchschnitt an den neuen Strang anhängt bevor sie abdissoziiert). Dies ist besonders bei GC-reichen Templates von Vorteil (Takagi et al., 1997).

Als Template diente doppelsträngige, als *supercoiled* vorliegende Plasmid-DNA, die mit zwei synthetischen Oligonukleotidprimern, welche die gewünschte Mutation enthalten, amplifiziert wurde. Das Produkt ist ein mutiertes Plasmid, das Einzelstranglücken (*staggered nicks*) enthält. Im Anschluss an die PCR wurde der Ansatz mit der Endonuclease *DpnI* behandelt (Fermentas *FastDigest*; 30 min, 37°C, gefolgt von 5 min, 80°C zur Inaktivierung der

Restriktionsenzyme). Dieses Restriktionsenzym ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA und verdaut ausschließlich die Template-Plasmid-DNA. Um eine Transformation durch Elektroporation zu ermöglichen, musste der PCR-Ansatz noch entsalzt werden. Schließlich wurden *E. coli* BL21Gold(DE3)-Zellen mit dem mutierten Plasmid transformiert (siehe II.6.7) und auf LB_{Kan}-Platten ausplattiert. PCR-Ansatz und -Programm für die KOD QuikChange sind in den Tabellen II.12 und II.13 zusammengefasst.

Tabelle II.12: PCR-Ansatz zur KOD-QuikChange.

PCR-Ansatz		Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	5,0 µl	1x
dNTP-Mix	5,0 µl	je 0,2 mM
Primer forward	3,0 µl	0,3 µM
Primer reverse	3,0 µl	0,3 µM
Template	10 ng	
KOD-HotStart-DNA-Polymerase	1,0 µl	0,02 U/µl
MgSO ₄	3,0 µl	1,5 mM
H ₂ O _{deion.}	ad 50,0 µl	

Tabelle II.13: PCR-Programm zur KOD QuikChange. Die Schritte 2 bis 4 wurden 25-mal wiederholt. Die *Annealing*-Temperatur (x) wurde den verwendeten Primern angepasst, die Elongationszeit (y) der Länge des erwarteten Produkts (30s/kb).

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min.]
1. Denaturierung	98	10
2. Denaturierung	98	1
3. <i>Annealing</i>	x	1
4. Elongation	70	y
5. Abkühlung	4	∞

Die KOD-DNA-Polymerase wurde auch für die Iterative Sättigungsmutagenese (ISM) verwendet. Diese Methode erlaubt den zufälligen Austausch von Aminosäuren an einer bestimmten Stelle im Gen, die für eine bestimmte katalytische Eigenschaft von Bedeutung ist („hot spot“), und wurde für die Verbesserung der Thermostabilität der GatDH angewandt.

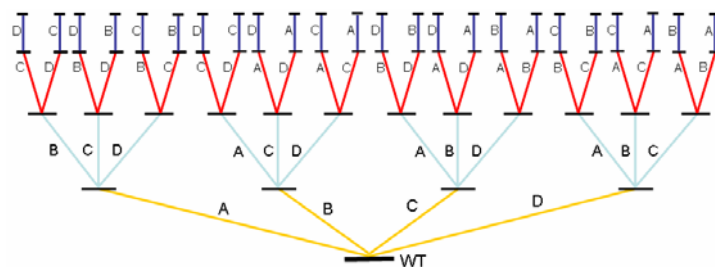


Abbildung II.1: Schematische Darstellung der ISM am Beispiel von vier Randomisierungsorten A, B, C und D (Reetz und Carballeira, 2007).

Im Falle der GatDH wurden Stellen mit den höchsten B-Faktoren ausgewählt. Diese Stellen sind besonders flexibel und daher verantwortlich für die geringe Thermostabilität des Enzyms. Durch die Verwendung degenerierter Primer (GatDH_ISM_49/50_f und GatDH_ISM_49/50_r bzw. GatDH_ISM_201/202_f und GatDH_ISM_201/202_r) während der PCR wird eine Aminosäure statistisch gegen alle 20 proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht. So entstehen verschiedene Klone, die auf ihre Aktivität getestet und im Mikrotiterplattenmaßstab auf verbesserte Thermostabilität gescreent werden können. Das entscheidende Charakteristikum der ISM ist der iterative Vorgang, der einen hohen evolutionären Druck in einer eingeschränkten aber wichtigen Region des Proteinsequenzraumes bewirkt. Danach wird das mutierte Gen aus einer ersten Sättigungsbiobibliothek als Template für eine weitere Randomisierung an einem anderen, definierten Ort verwendet. Der PCR-Ansatz sowie das PCR-Programm entsprechen denen der KOD-QuikChange-PCR.

7.1.2 Splicing by overlap extension (SOE-PCR)

Eine weitere Methode zum gezielten Austausch von Aminosäuren ist die SOE-PCR (*splicing by overlap extension*).

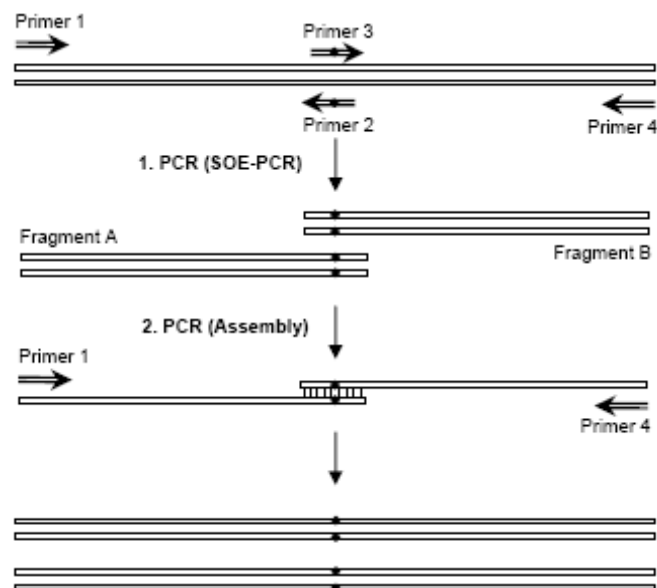


Abbildung II.2: Schema der SOE-PCR nach Pogulis et al. (1996). Primer 1 und 4: genspezifische, flankierende Primer; Primer 2 und 3: interne Mutagenese-Primer.

Dabei wird das zu mutierende Gen mit einer *high-fidelity* Polymerase in zwei Fragmenten amplifiziert, die sich an der zu mutierenden Position überlappen. Dazu wird jeweils ein genflankierender Primer eingesetzt und einer, der die gewünschte Mutation trägt. Die

beiden entstehenden Fragmente werden im Anschluss in einer *Assembly*-PCR als Template eingesetzt und mit Hilfe der flankierenden Primer und der überlappenden Sequenzen zum vollständigen Gen zusammengefügt (Pogulis et al., 1996).

PCR-Ansatz SOE I

5x Reaktionspuffer	10,0 µl
dNTP-Mix	1,5 µl
Primer forward	2,0 µl
Primer reverse	2,0 µl
Template	20 ng
<i>CrimsonTaq LongAmp</i>	2,0 µl
H ₂ O _{deion.}	ad 50,0 µl

PCR-Ansatz SOE II (*Assembly*)

5x Reaktionspuffer	10,0 µl
dNTP-Mix	1,5 µl
Primer forward	2,0 µl
Primer reverse	2,0 µl
Templates	je 10 ng
<i>CrimsonTaq LongAmp</i>	2,0 µl
H ₂ O _{deion.}	ad 50,0 µl

Das folgende PCR-Programm wurde zur Amplifikation genutzt:

Tabelle II.14: PCR-Programm SOE-PCR I und II mit Hilfe der *Crimson LongAmp Taq DNA Polymerase*. Die Schritte 2-4 wurden 25-mal (SOE I) bzw. 15-mal (SOE II) im Thermocycler durchgeführt. Nach Schritt 5 wird der Ansatz auf 4°C abgekühlt. Die *Annealing*-Temperatur *x* muss den verwendeten Primern angepasst werden, die Elongationszeit (*y*; Schritt 4) an die Länge des erwarteten Amplifikats (1 min/kb).

SOE I			SOE II (<i>Assembly</i>)		
PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]	PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1. Denaturierung	95	30	1. Denaturierung	95	30
2. Denaturierung	95	10	2. Denaturierung	95	10
3. <i>Annealing</i>	<i>x</i>	30	3. <i>Annealing</i>	<i>x</i>	30
4. Elongation	65	<i>y</i>	4. Elongation	65	<i>y</i>
5. Elongation	65	600	5. Elongation	65	600
6. Abkühlung	4	∞	6. Abkühlung	4	∞

Zwischen den beiden PCR-Reaktionen wurden die PCR-Produkte im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel reisoliert. Es ist außerdem möglich, Template-DNA durch Zugabe der Endonuclease *DpnI* zu entfernen. Im Anschluss muss die DNA zur Reinigung gefällt werden.

Für die SOE-PCR wurde auch die *Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase* (New England Biolabs) verwendet. Diese Polymerase übertrifft die *Crimson LongAmp Taq DNA Polymerase* in Schnelligkeit und Genauigkeit.

Im Falle der *Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase* diene folgender Ansatz zur Amplifikation:

PCR-Ansatz SOE I

5x Puffer	10,0 µl
dNTP-Mix	1,0 µl
Primer f	0,5 µl
Primer r	0,5 µl
Template	20 ng
DMSO	1,5 µl
Polymerase	0,5 µl
H ₂ O _{deion.}	34 µl

PCR-Ansatz SOE II (Assembly)

5 x Puffer	10,0 µl
dNTP-Mix	1,0 µl
Primer f	0,5 µl
Primer r	0,5 µl
Templates je	10 ng
DMSO	1,5 µl
Polymerase	0,5 µl
H ₂ O _{deion.}	34 µl

Das folgende PCR-Programm wurde zur Amplifikation genutzt:

Tabelle II.15: PCR-Programm SOE-PCR I und II mit Hilfe der *Phusion™ High Fidelity DNA-Polymerase*. Die Schritte 2-4 wurden 25-mal (SOE I) bzw. 15-mal (SOE II) im Thermocycler durchgeführt. Nach Schritt 5 wird der Ansatz auf 4°C abgekühlt. Die *Annealing*-Temperatur x muss den verwendeten Primern angepasst werden, die Elongationszeit (y ; Schritt 4) an die Länge des erwarteten Amplifikats (1 min/kb).

SOE I und SOE II (Assembly)		
PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [s]
1. Denaturierung	98	30
2. Denaturierung	98	10
3. <i>Annealing</i> / Elongation	72	30
5. Elongation	72	10
6. Abkühlung	4	∞

7.2 Zufallsmutagenese: *error-prone*-PCR

Zur Einführung zufälliger Mutationen in ein Gen von Interesse, wurde die *error-prone*-PCR-Methode genutzt. Das Gen wurde dabei mit einer Polymerase ohne *proof-reading*-Funktion amplifiziert (Axon). Um die Fehlerrate noch zu steigern, wurden dem Ansatz erhöhte Konzentrationen an Magnesiumchlorid zugesetzt und unterschiedliche Konzentrationen an Manganchlorid verwendet. Durch Einsatz unbalancierter Nucleotidkonzentrationen, Mischungen mit Nucleosidanaloga oder einer Kombination dieser Möglichkeiten kann die Fehlerrate weiter gesteigert werden. Folgende Tabellen (II.16 und II.17) zeigen die Pipettierschemata und PCR-Programme für die *error-prone*-PCR (modifiziert nach Leung et al., 1989; Jaeger et al., 2002; Jaeger und Eggert, 2002). Zur Expression der unterschiedlichen PCR-Produkte wurden sie in den Expressionsvektor pET-24a(+) kloniert (siehe II.6.5.2), *E. coli* BL21Gold(DE3)pLysS wurden mit den rekombinanten Plasmiden transformiert (siehe

II.6.7) und schließlich im Mikrotiterplattenmaßstab auf verbesserte Enzymvarianten gescreent (siehe II.8.2).

Tabelle II.16: Pipettierschema zur *error-prone*-PCR (modifiziert nach Jaeger et al., 2002).

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
10x Reaktionspuffer	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	12,0 µl (6 mM)	12,0 µl (6 mM)	12,0 µl (6 mM)
MnCl ₂ (25 mM)	-	0,3 µl (0,15 mM)	0,6 µl (0,3 mM)
dNTP-Mix	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Primer <i>forward</i>	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Primer <i>reverse</i>	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Template DNA	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Taq-Polymerase	0,6 µl	0,6 µl	0,6 µl
H ₂ O _{deion.}	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl	ad 50,0 µl

Tabelle II.17: PCR-Programm zur *error-prone*-PCR. Die Schritte 2 bis 4 wurden 35-mal wiederholt. Die *Annealing*-Temperatur (x) muss den verwendeten Primern angepasst werden, die Elongationszeit (y) an die Länge des Amplifikats (1 min/kb).

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]
1. Denaturierung	95	3
2. Denaturierung	95	0,5
3. <i>Annealing</i>	x	1
4. Elongation	72	y
5. Finale Elongation	72	7
6. Abkühlung	4	∞

8. Expression rekombinanter Gene in *E. coli*

8.1 Expression im Erlenmeyerkolben

Zur Anzucht genetisch veränderter *E. coli*-Stämme wurde zunächst eine Vorkultur erstellt, indem 5 ml LB_{Kan}-Medium in einem Rollrandröhrchen mit einer Kolonie oder mit 5 µl einer Glycerinkultur beimpft wurden. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 28°C und 170 rpm inkubiert. Mit 2,5 ml dieser Vorkultur wurde am folgenden Tag eine Hauptkultur (V = 250 ml) beimpft. Nach einer weiteren Inkubation bei 28°C und 170 rpm für vier Stunden, konnte die Expression des rekombinanten Gens durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mM induziert werden. IPTG induziert in den *E. coli*-Zellen die Expression der T7-RNA-Polymerase, die wiederum für die Expression des rekombinanten Gens verantwortlich ist. Nach der Induktion wurden die Kulturen für weitere 19 Stunden bei 28°C und 170 rpm inkubiert.

8.2 Expression in Mikrotiterplatten

Das Screening verbesserter Enzymvarianten wurde im Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführt. Um die Zelldichte zu erhöhen, wurden zunächst von den entsprechenden Klonen Masterplatten angefertigt, indem die Klone mit einem sterilen Zahnstocher auf eine nummerierte LB_{Kan}-Platte übertragen und über Nacht bei 37°C kultiviert wurden. Die Klone wurden am folgenden Tag in mit 200 µl LB_{Kan} gefüllte *Wells* einer Mikrotiterplatte überimpft und bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Expression des Fremdgens wurde nach zwei Stunden durch Zugabe von 20 µl Induktionslösung (10 mM IPTG in LB_{Kan}) induziert. Nach der Induktion wurden die Zellen bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Nach weiteren 18 Stunden konnten die Zellen geerntet (700 x g, 10 min, 4°C) werden. Der Zellaufschluss in den Mikrotiterplatten erfolgte mit dem milden Detergenz Triton-X 100, das die Cytoplasmamembran angreift. Dadurch wird das in den Zellen (BL21Gold(DE3)pLysS) befindliche Lysozym freigesetzt. Lysozym zerstört die 1,4-glykosidischen Bindungen zwischen *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylmuraminsäure im Peptidoglykan der Zellwand, was schließlich zur Zellyse führt. Nach der Zellernte, werden die Zellen in Aufschlusspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7 mit DNaseI und 0,06% Triton-X 100) resuspendiert und 45 min bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Zellfragmente wurden schließlich 15 min bei 700 x g und 4°C abzentrifugiert. Der zellfreie Überstand konnte schließlich zum Screening verbesserter Enzymvarianten eingesetzt werden.

8.3 Coexpression mit Chaperonen

Wörtlich übersetzt bedeutet das englische Wort „*chaperon*“ Anstandsdame oder Begleitperson. Chaperone können somit als „molekulare Anstandsdamen“ oder Führungsproteine bezeichnet werden. Angetrieben durch ATP, minimieren sie die Aggregation von Proteinen und lösen bereits vorhandene Protein-Aggregate wieder auf. Sie sind Enzyme, die die korrekte Faltung von Proteinen in der Zelle unterstützen, indem sie falsche Kontakte verhindern und unerlaubte intermolekulare Wechselwirkungen unterbinden. Chaperone sind langsame ATPasen, die prinzipiell mehr Zeit für die Faltung schaffen. Die Faltung selbst wird durch die Gesetze der Thermodynamik angetrieben. Ungefaltete Proteine – im Gegensatz zu nativen Proteinen – binden mit hoher Affinität an einen Komplex aus ADP und Chaperon. Durch die Bindung eines entfalteten Proteinsegments an das Chaperon wird das ADP freigesetzt und ATP kann in das aktive Zentrum des Chaperons eintreten. Das Peptidsegment wird dann aus dem ATP-Chaperon-

Komplex freigesetzt. Durch anschließende Hydrolyse des ATP kann das Chaperon wieder ein ungefaltetes Segment binden. Dabei bestimmt die Geschwindigkeit der Hydrolyse den Zeitraum zwischen Freisetzung und Bindung. Das Chaperon bindet zunehmend weniger der entstehenden Peptidkette während die Faltung voranschreitet. Hitzeschockproteine, eine Gruppe der Chaperone, werden von allen Zellen als Antwort auf einen Temperaturanstieg synthetisiert. Schädigungen durch freie Radikale oder andere Stressfaktoren erzielen einen ähnlichen Effekt. Allerdings werden viele Proteine dieser Gruppe nicht induziert, sondern sind in nahezu allen zellulären Kompartimenten auch unter normalen Umständen vorhanden. In der Vergangenheit wurde berichtet, dass die Überexpression der Chaperone DnaK-DnaJ oder Triggerfaktor (Tf) die Löslichkeit ausgewählter Proteine bei Expression in *E. coli* erhöhte (Nishihira et al., 2000). Dabei wurden gute Ergebnisse für Proteine berichtet, die ein Molekulargewicht von über 60 kDa besitzen. Ein weiterer Mechanismus auf der Basis der Chaperone GroES-GroEL kann nützlich sein für kleinere Proteine mit einem Molekulargewicht unter 60 kDa (Baneyx und Mujacic, 2004). Ungeachtet der in der Vergangenheit erzielten Fortschritte hinsichtlich der funktionalen Expression von heterologen Proteinen in *E. coli* ist eine erfolgreiche Expression jedoch nicht vorhersagbar, sondern hängt stark vom jeweils verwendeten Protein ab. Elektrokompente *E. coli* BL21Gold(DE3) werden mit den einzelnen Chaperon-Plasmiden transformiert. Zur Überprüfung der Anwesenheit der Chaperon-Plasmide muss zunächst eine Plasmid-Minipräparation durchgeführt werden. Die so isolierte Chaperon-Plasmid-DNA wird dann mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, um anhand der erhaltenen Fragmente die Anwesenheit der Chaperon-Plasmide zu überprüfen. Die Fragmentgröße wird im Agarosegel überprüft. Die Plasmidgrößen, sowie die Größen der nach Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen erwarteten Fragmente sind in Tabelle II.18 zusammengefasst.

Tabelle II.18: Für den Kontrollverdau der Chaperon-Plasmide verwendete Enzyme und die erwarteten Fragmentgrößen.

Chaperon-Plasmid	Größe [kb]	Restriktionsenzym	erwartete Fragmentgrößen [bp]
pG-KJE8	11,1	<i>NheI, XhoI</i>	8673, 2427
pGro7	5,4	<i>NheI, HindIII</i>	939, 4461
pKJE7	7,2	<i>NheI, KpnI</i>	946, 6254
pG-Tf2	8,3	<i>NheI, HindIII</i>	940, 7360
pTf16	5	<i>NheI, HindIII</i>	946, 4060

Solche Zellen, die die Chaperon-Plasmide tragen werden erneut elektrokompent gemacht und mit einem rekombinanten Expressionsvektor pET-24a(+) transformiert (siehe II.6.7). Die Anwesenheit des rekombinanten Expressionsvektors wird durch *Colony-PCR* überprüft (siehe II.6.5.3). Ein zusätzlicher Beweis für die Anwesenheit beider Plasmide ist das Wachstum der Zellen in kanamycin- und chloramphenicolhaltigem Medium. Tabelle II.19 fasst die verschiedenen Chaperon-Plasmide, ihre Promotoren, Resistenzmarker und Induktoren zusammen.

Tabelle II.19: Die Chaperon-Plasmide, die kodierten Chaperone, ihre Promotoren, Induktoren und Resistenzmarker.

Chaperon-Plasmid	Chaperone	Promotor	Induktor	Resistenzmarker
pG-KJE8	DnaK-DnaJ-GrpE	<i>araB</i>	L-Arabinose	Cm
	GroEL-GroES	<i>Pzt1</i>	Tetracyclin	
pGro7	GroEL-GroES	<i>araB</i>	L-Arabinose	
pKJE7	DnaK-DnaJ-GrpE	<i>araB</i>	L-Arabinose	
pG-Tf2	GroES-GroEL-tig	<i>Pzt1</i>	Tetracyclin	
pTf16	tig	<i>araB</i>	L-Arabinose	

Zur Anzucht einer Vorkultur werden 5 µl einer Glycerinkultur der entsprechenden Klone in 5 ml Komplexmedium mit Kanamycin und Chloramphenicol resuspendiert und über Nacht bei 28°C und 220 rpm kultiviert. Die Hauptkultur wird erstellt, indem 250 ml Komplexmedium mit Kanamycin und Chloramphenicol mit 2,5 ml der Vorkultur beimpft und erneut bei 28°C und 220 rpm inkubiert werden. Nach vier Stunden erfolgt die gleichzeitige Induktion der Chaperone und des rekombinanten Gens durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 24 µg/ml und von L-Arabinose (Endkonzentration 2 mg/ml) bzw. Tetracyclin (Endkonzentration 10 ng/ml) oder beidem (siehe II.1.3).

9. Zellernte und Herstellung zellfreier Extrakte

9.1 Herstellung des Rohextrakts

Die Zellernte erfolgte 18-20 Stunden nach der Induktion bei 4.200 x g und 4°C für 15 Minuten. Das so erhaltene Zellpellet wird zunächst in 100 ml Waschpuffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 7 ml Waschpuffer je Gramm feuchte Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden meist mittels Ultraschall aufgeschlossen. Ultraschall erzeugt mechanische Schwingungen, wodurch Zellwände und Membranen zerstört werden. Die Zellen werden mit einer gerätespezifischen Leistung von 22 *microns* 6 x 15 s aufgeschlossen. Nach jedem

Beschallungsintervall erfolgte eine Abkühlungsphase von 30 s, also doppelt so lang wie die Zellen dem Ultraschall ausgesetzt waren. Nach dem Aufschluss werden die Zelltrümmer bei 22.800 x g und 4°C 30 Minuten lang abzentrifugiert.

Alternativ können die Zellen mit Hilfe der *French Press* aufgeschlossen werden. Dabei werden die Zellen unter hohem Druck durch ein enges Ventil gepresst und es entstehen Kavitationskräfte, die die Zellen zerstören. Um die Zellen mittels *French Press* aufzuschließen, wurde die Zellsuspension dreimal bei 120 MPa passagiert. Im Anschluss erfolgte die Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 22.800 x g und 4°C für 30 Minuten.

9.2 Präparation der Vesikelfraktion aus *Pseudomonas putida* und *E. coli*

Für die Präparation der Vesikelfraktion aus *Pseudomonas putida* wurden folgende Lösungen verwendet:

Waschpuffer (pH 6,8)

K₂HPO₄ 50 mM

Zur Präparation der Vesikelfraktion aus *Pseudomonas putida* und *E. coli* wurde zunächst eine Vorkultur erstellt, indem 5 ml Nährlösung mit 100 µl einer entsprechenden Glycerinkultur beimpft wurden. Die Vorkultur wurde ü.N. bei 28°C und 220 rpm auf dem Rundschtüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag eine 250 ml-Hauptkultur beimpft und zwölf Stunden bei 28°C und 220 rpm auf dem Rundschtüttler inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 6000 x g und 4°C für zehn Minuten. Das Zellpellet wurde in 30 ml Waschpuffer gewaschen und nach Zentrifugation in 5 ml Waschpuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte ebenfalls mittels Ultraschall, wobei die Zellen insgesamt 6 x 30 s beschallt wurden. Zwischen den Beschallungsintervallen erfolgte eine Abkühlphase von ebenfalls 30 s. Die Zelltrümmer wurden nach dem Zellaufschluss 20 min bei 5000 x g und 0°C abzentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen. Der Überstand wurde 60 min in der Ultrazentrifuge bei 150000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment, welches die Partikelfraktion repräsentiert, langsam in 2 ml kaltem Waschpuffer resuspendiert. Die enzymatischen Bestimmungen sollten noch am gleichen Tag durchgeführt werden.

10. Enzymanreicherung

10.1 Ammoniumsulfatfällung

Um unerwünschte Proteine auszufällen, wurde dem zellfreien Rohextrakt langsam unter Rühren im Eisbad gemahlene Ammoniumsulfat zugegeben, so dass insgesamt eine Sättigung von 25 % erreicht wurde. Die Fällung wurde unter fortlaufendem Rühren über Nacht im Kühlraum durchgeführt. Im Anschluss wurden die denaturierten Proteine eine Stunde und 30 Minuten bei $14.000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand mit dem angereicherten Protein wurde für die anschließende Chromatographie verwendet.

10.2 Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)

Für die Hydrophobe Interaktionschromatographie wurden folgende Puffer verwendet:

Bindungspuffer (pH 6,4)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,7 M (40 % Sättigung)
 KH_2PO_4 100 mM

Elutionspuffer (pH 6,4)

KH_2PO_4 100 mM

Basierend auf den Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Resten der Proteinoberfläche und dem apolaren Material der stationären Phase der Säule können Proteine voneinander getrennt werden. Durch Salze kann die Hydrathülle eines Proteins aufgelöst werden, wodurch die im Innern des Proteins lokalisierten hydrophoben Seitenketten frei gegeben werden. Je hydrophober die Oberfläche der Proteinaußenseite beschaffen ist, desto leichter absorbiert das Protein an die Säulenmatrix. Die Elution der über Van-der-Waals-Kräfte gebundenen Proteine erfolgt mit einem absteigenden Salzgradienten, wobei Proteine mit wenigen apolaren Gruppen zuerst eluieren. Die HIC wurde mit Hilfe der Säule XK16/20 (GE Healthcare, Höhe: 10 cm, Phenylsepharose HP) durchgeführt. Die Säule wurde zunächst mit einer Flussrate von 10 ml/min mit Bindungspuffer äquilibriert. Die Probe aus der Ammoniumsulfatfällung wurde komplett mit einer Flussrate von 10 ml/min auf die Säule aufgetragen. Auch während des gesamten Laufs betrug die Flussrate 10 ml/min. Nicht gebundene Proteine wurden zunächst durch einen Waschschriff von der Säule entfernt. Der absteigende lineare Gradient von 25 % auf 0 % Ammoniumsulfat wurde durch den Bindungs- und Elutionspuffer als Laufmittelgemisch eingestellt. Das Eluat wurde

in Fraktionen zu je 8 ml gesammelt und auf Enzymaktivität getestet. Die aktiven Fraktionen wurden gepoolt und gegebenenfalls eingeeengt.

10.3 Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (HisTrap)

Für die Affinitätschromatographie an Nickelsepharose wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

Binding Buffer (pH 7,4)

NaH ₂ PO ₄	0,02 M
NaCl	0,5 M

Elution Buffer (pH 7,2)

NaH ₂ PO ₄	0,02 M
NaCl	0,5 M
Imidazol	0,5 M

Ethanol 20%

Ethanol	200 ml
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

Alle für die Proteinanreicherung verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch durch einen Cellulose-Acetat-Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Diese Methode zur Anreicherung Histidin-getaggtter Proteine erfolgte an 5 ml *HiTrap FF Crude*-Säulen (GE Healthcare). Das Säulenmaterial besteht aus stark verknüpften Agarose-Perlen, an die eine Chelatgruppe immobilisiert wurde, an die wiederum Nickelionen (Ni²⁺) gebunden sind. Hierbei wird ausgenutzt, dass der Histidin-Rest, der an der Oberfläche exponiert vorliegt, spezifisch an Nickelionen bindet, die an das Säulenmaterial gekoppelt sind. Alle anderen Proteine binden weniger stark an das Säulenmaterial und werden ausgewaschen. Die gebundenen Proteine können dann mit einem imidazolhaltigen Puffer eluiert werden. Das Imidazol konkurriert mit den Proteinen aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum Histidin um die Bindestellen auf der Säule und eluiert so das Protein von der Säule. Die Anreicherung wurde mit dem *Äkta Purifier* (GE Healthcare) durchgeführt. Die Säule wurde zunächst mit *Binding Buffer* äquilibriert. Dann wurde die Probe mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen und die Säule erneut mit *Binding Buffer* gespült, um ungebundene Proteine auszuwaschen. Histidin-getaggte Enzyme wurden anschließend mit *Elution Buffer* eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen à 2 ml gesammelt und die Fraktionen auf Aktivität getestet.

11. Proteinbestimmung

11.1 Umpufferung

Um Imidazol, das bei der Proteinbestimmung stören würde, zu entfernen, ist es notwendig, das Protein in einen imidazolfreien Puffer zu überführen. Die Umpufferung in den geeigneten Puffer erfolgte an der *Desalting_XK26/20_G_25*-Säule mit Hilfe des *Äkta Purifier* (GE Healthcare) nach dem Prinzip einer Gelpermeationschromatographie. Die Probe wird mit einer Flussrate von 9 ml/min auf die Säule aufgetragen und anschließend mit imidazolfreiem Puffer wieder eluiert. Das Eluat wird in Fraktionen à 8 ml gesammelt. Die einzelnen Fraktionen werden auf Aktivität getestet, Fraktionen mit ähnlicher Aktivität werden gepoolt.

11.2 BCA-Assay nach Pierce zur Bestimmung des Proteingehalts

Für den BCA-Assay nach Pierce wurden folgende Lösungen verwendet:

BSA-Stammlösung		Working Reagent	
BSA	2 mg/ml	BCA-Lösung	50 ml
		CuSO ₄ -Lösung (4%)	1 ml

Zur Bestimmung des Proteingehalts wird ein BCA-Assay durchgeführt. Bei dieser Methode, die eine Modifikation der Proteinbestimmung nach Lowry darstellt (Hartree, 1972) und auf der Biuret-Reaktion beruht, bildet Bicinchoninsäure (BCA) zusammen mit Cu⁺ einen farbigen Komplex. Das Cu⁺ wird durch Reduktion von Cu²⁺ mittels des zu bestimmenden Proteins gebildet. Die Absorption dieses Komplexes wird photometrisch bestimmt. Zur Evaluation wird zunächst eine Eichgerade erstellt. Dazu werden aus einer BSA-Stammlösung verschiedene Verdünnungsstufen hergestellt. Bei der Farbreaktion handelt es sich um den so genannten Assay mit Bicinchoninsäure. BCA ist in Form eines wasserlöslichen Salzes ein sensibles, stabiles und hochspezifisches Reagenz für Cu⁺-Ionen. Das violette Reaktionsprodukt, welches durch die Interaktion (Komplexbildung) zweier BCA-Moleküle mit einem Cu⁺-Ion entsteht, ist ebenfalls wasserlöslich und zeigt eine starke Absorption bei 562 nm und eine lineare Absorptionzunahme über weite Proteinkonzentrationen. Die Messung der Absorption des Komplexes ist im Bereich von 540 bis 590 nm möglich. Die erforderlichen Cu⁺-Ionen werden im alkalischen Milieu aus Protein-

Cu²⁺-Komplexen gebildet. Die verantwortlichen Proteinabschnitte sind die Peptidbindungen und die drei Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin. Bei dieser Quantifizierungsmethode wird das Gesamtprotein bestimmt, eine Differenzierung der Proteine ist nicht möglich. Allerdings unterscheiden sich die Proteine leicht in der Stärke des resultierenden Komplexes. Verantwortlich dafür sind die Aminosäuresequenz, der isoelektrische Punkt (pI), die Proteinstruktur, bestimmte Seitenketten oder prosthetische Gruppen. Zu jeweils 25 µl der Proteinprobe werden 200 µl *working reagent* in eine Mikrotiterplatte gegeben. Die automatisierte Proteinbestimmung wird in einem *Microplate Reader* (Biorad, Model 680XR) bei 37°C durchgeführt.

12. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970)

Für die SDS-PAGE wurden folgende Lösungen verwendet:

Trenngelpuffer (pH 8,8)

Tris	18,5 g
SDS	0,4 g
H ₂ O _{deion.}	ad 100 ml

Sammelgelpuffer (pH 6,8)

Tris	3,0 g
SDS	0,2 g
H ₂ O _{deion.}	ad 100 ml

Trenn- und Sammelgelpuffer werden vor der Benutzung im Ultraschallbad entgast.

APS-Lösung

Ammoniumpersulfat	0,1 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1,0 ml

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R-250	1,0 g
Fixierer	ad 100 ml

Elektrodenpuffer

Tris	3,0 g
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

Fixierer

Essigsäure	100 ml
Methanol	300 ml
H ₂ O _{deion.}	500 ml

Solubilisierungspuffer

0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	1,25 ml
10% SDS	2,0 ml
Glycerin	2,5 ml
0,5% Bromphenolblau	0,2 ml
H ₂ O _{deion.}	3,55 ml

Kurz vor Gebrauch werden 950 μl Solubilisierungspuffer mit 50 μl β -Mercaptoethanol versetzt und gut gemischt.

Zur Überprüfung der Expression rekombinanter Gene sowie zur Reinheitskontrolle der Proteinproben wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Bei dieser Methode werden Proteine nach ihrer Größe getrennt. SDS, ein anionisches Detergens, lagert sich an die Aminosäurereste an und zerstört alle nicht-kovalenten Bindungen im Protein. Dadurch werden die Proteine denaturiert und stark negativ aufgeladen, wobei die Ladung des SDS die Eigenladung der Proteine überdeckt. Somit besitzen alle SDS-Protein-Komplexe eine ähnliche Ladungsdichte und unterscheiden sich nur noch in ihrer Größe. Legt man an das Gel Spannung an, so wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode, wobei kleine Proteine schneller wandern als größere, da das poröse Gel wie ein Sieb wirkt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Gel ist dabei proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts des Proteins. Das Polyacrylamidgel, in dem die Elektrophorese durchgeführt wird, ist porös. Die Proteine werden in einer Matrix aus Acrylamid-Polymeren, die durch radikalische Polymerisation entstehen, aufgetrennt. Die Porengröße kann hierbei durch die Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration variiert werden. Die Polymerisation wird durch Zugabe von N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat gestartet. Bei einer diskontinuierlichen SDS-PAGE unterscheidet man das engporige Trenngel von einem großporigen Sammelgel, welches das Trenngel überschichtet. Im Sammelgel werden die Proben konzentriert. Dies geschieht durch eine pH-Phasengrenze, wo die Proben fokussiert werden. Im Trenngel werden sie durch den Siebeffekt nach ihrer Größe aufgetrennt. Trenn- und Sammelgel setzen sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle II.20: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

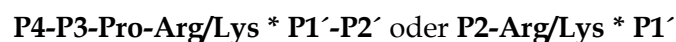
	Trenngel 12%	Sammelgel 6%
Trenngelpuffer	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,5 ml
H₂O_{deion.}	4,5 ml	6,0 ml
Acrylamidstammlösung (40%)	3,0 ml	1,5 ml
APS-Lösung	50 μl	50 μl
TEMED	5 μl	10 μl

Zuerst wird das Trenngel gegossen. Es benötigt etwa 45 min um auszupolymerisieren. Um eine Austrocknung zu verhindern, wird es dabei mit Isopropanol überschichtet. Außerdem entsteht so eine glatte Phasengrenze zwischen Trenn- und Sammelgel. Bevor das Sammelgel

gegossen wird, wird das Isopropanol vollständig entfernt. Das Trenngel wird dann mit dem Sammelgel überschichtet. Zur Probenvorbereitung werden 20 µl Proteinprobe mit 40 µl Solubilisierungspuffer versetzt. Werden Zellpellets, die aus Zelltrümmern bestehen, direkt betrachtet, so werden diese zunächst in 1,5 ml Waschpuffer resuspendiert. Von dieser Zelltrümmersuspension werden 20 µl entnommen und ebenfalls mit 40 µl Solubilisierungspuffer versetzt. Das im Solubilisierungspuffer enthaltene β-Mercaptoethanol dient als Reduktionsmittel, das die Disulfidbrücken zwischen den oder innerhalb der Proteine zerstört, wodurch sich die Proteine vollständig entfalten. Um die Proteine vollständig zu denaturieren, werden die Proben zehn Minuten im Thermoblock gekocht. Von den Rohextraktproben werden 10 µl, von den Pelletproben 5 µl und vom Proteinmarker (siehe VII.2.1) 7,5 µl in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung der Proteine findet bei einer Spannung von 200 V statt. Hat die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht, kann die Trennung beendet werden. Zur gleichzeitigen Färbung und Fixierung (modifiziert nach Weber und Osborn, 1969) wird das SDS-Gel mit Färbelösung überschichtet und dreimal 20 s bei 360 Watt in der Mikrowelle inkubiert; dazwischen liegen jeweils 40 s zum Abkühlen. Anschließend wird die Färbelösung entfernt und das Gel mit Fixierer entfärbt. Die Fixierlösung wird in regelmäßigen Abständen ausgewechselt bis das Gel hinter den gefärbten Proteinen farblos erscheint.

13. Enzym-Varianten mit Protease-Schnittstelle für die Kristallisation

Zur Abspaltung des His-Tags sollte die Serin-Protease Thrombin verwendet werden. Die optimalen Schnittstellen für diese Protease sind:



P4 und P4 sind dabei hydrophobe Aminosäuren, P1' und P2' sind nicht-saure Aminosäuren. Der Stern (*) markiert die Schnittstelle (Chang, 1985). Die hier verwendete Schnittstelle lautet LVPRGS (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser). Abbildung II.3 zeigt schematisch die Platzierung der Protease-Schnittstelle zwischen dem His-Tag und dem Protein.



Abbildung II.3: Schematische Darstellung der Thrombin-Schnittstelle (grün) hinter dem His₆-Tag (gelb) und vor dem Protein (blau).

13.1 Konstruktion von Enzym-Varianten mit Thrombin-Schnittstelle

Die Schnittstelle für die Abspaltung des N-terminalen His-Tags der LSDH wurde mittels SOE-PCR mit den Primern LSDH_NHis_Thrombin_P1 und LSDH_NHis_Thrombin_P2 bzw. LSDH_NHis_Thrombin_P3 und LSDH_NHis_Thrombin_P4 angefügt. Für die GatDH mit N-terminalem His-Tag und die DSDH mit N-terminalem His-Tag erfolgte die SOE-PCR mit den entsprechenden Primern (GatDH_NHis_Thrombin_P1-P4 bzw. DSDH_NHis_Thrombin_P1-P4). Die *Annealing*-Temperatur lag 5°C unter der in Tabelle II.3 angegebenen Schmelztemperatur der Primer, die Elongationszeit wurde der Schnelligkeit der Polymerase und der Produkt-Länge angepasst. Als Polymerase wurde die *Crimson LongAmp Taq DNA Polymerase* (New England Biolabs) verwendet. Die PCR-Produkte aus der ersten SOE-PCR (siehe II.7.1.2) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe II.6.3) und aus dem Gel reisoliert (siehe II.6.4). Diese PCR-Produkte dienten als Template für die *Assembly*-PCR. Durch die verwendeten Primer wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Nde*I an die PCR-Produkte angefügt. Das PCR-Produkt aus der *Assembly*-PCR wurde mit diesen beiden Restriktionsenzymen verdaut und in den *E. coli*-Expressionsvektor pET-24a(+) inkloniert (siehe II.6.5.2). Zuletzt wurden elektrokompente *E. coli* BL21Gold(DE3)-Zellen mit dem rekombinanten Plasmid transformiert (siehe II.6.7). Die Anzucht der Zellen und die heterologe Expression des Enzyms mit Thrombin-Schnittstelle erfolgten wie unter II.8.1 beschrieben. Die Anreicherung des Enzyms mit Thrombin-Schnittstelle erfolgte durch Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (siehe II.10.3) und anschließender Umpufferung (siehe II.11.1) mittels Gelfiltration in 50 mM Tris/HCl (pH 8).

13.2 Abspaltung des His₆-Tags

Die Abspaltung des His₆-Tags erfolgte mit Hilfe des *Thrombin CleanCleave*TM-Kits von Sigma-Aldrich. Die Protease ist dabei an Agarose-Kügelchen gebunden, wodurch nach der Abspaltung des Tags eine einfache Entfernung der Protease aus der Proteinlösung durch Zentrifugation oder durch die Verwendung der im Kit enthaltenen Säule möglich ist. Die Abspaltung des His₆-Tags erfolgte bei pH 8 und bei Raumtemperatur. Thrombin-Agarose ist jedoch über einen weiteren Bereich aktiv (Di Cera et al., 1991).

Die folgenden Angaben gelten für die Tag-Abspaltung von 1 mg Fusionsprotein. Von der homogenisierten Thrombin-Agarose wurden 100 µl in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zentrifugation bei 500 x g wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 500 µl 1 x *Cleavage Buffer* resuspendiert. Der Waschschritt wurde einmal wiederholt. Zu den

abzentrifugierten Beads wurden 100 μl 10 x *Cleavage Buffer* gegeben. Die Beads wurden resuspendiert, das Protein wurde zugegeben und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ auf 1 ml aufgefüllt. Die Abspaltung des Tags erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 48 Stunden. Die vollständige Abspaltung des Tags wurde im SDS-Gel überprüft. Die Rückgewinnung des Proteins ohne Tag erfolgte durch Abzentrifugieren der Thrombin-Agarose bei 500 x g oder durch die Verwendung der im Kit enthaltenen Säule. Die Thrombin-Agarose kann nach Herstellerangaben regeneriert und wiederverwendet werden.

14. Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die Aktivitäten der einzelnen Dehydrogenasen in *Units* [U] wurden mit Hilfe eines photometrischen Assays bestimmt. Die in dieser Arbeit verwendeten Dehydrogenasen benötigen als Cofaktor NAD^+ bzw. $\text{NADH} + \text{H}^+$. Letzteres zeigt im Gegensatz zu NAD^+ ein Absorptionsmaximum bei 340 nm. Aufgrund der Unterschiede in den Absorptionsspektren dieser beiden Verbindungen, kann die Entstehung bzw. der Verbrauch von $\text{NADH} + \text{H}^+$ photometrisch verfolgt werden. Da pro Substratmolekül auch ein Molekül des Cosubstrats verbraucht wird, kann die Umsetzung des Cosubstrats mit der Umsetzung des Substrats gleichgesetzt und damit die Änderung der Absorption zur Berechnung der Enzymaktivität herangezogen werden. Die Einheit der Enzymaktivität *Units* [U] beschreibt dabei den Umsatz von 1 μmol Substrat pro Minute. Mit folgender Formel kann die Volumenaktivität [U/ml] berechnet werden:

$$[U / ml] = \frac{\Delta E \times V_k}{V_p \times \varepsilon \times d \times t}$$

[U/ml]: Volumenaktivität, ΔE : Extinktionsänderung, V_k : Volumen der Küvette, V_p : Volumen der eingesetzten Enzymprobe, ε : molarer Extinktionskoeffizient (für NADH: 4,6 l / (mmol x cm), für DCPIP: 20,36 l / (mmol x cm), d: Schichtdicke

Die Enzymaktivitäten der Diaphorase (NADH-Dehydrogenase) und der LMDH werden mit Hilfe des Elektronenakzeptors DCPIP bestimmt. In diesem Enzymtest wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert, während DCPIP reduziert wird. Die Extinktionsabnahme während der Reduktion des DCPIP kann im Photometer bei 600 nm beobachtet werden. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgt auf die gleiche Weise wie weiter oben beschrieben. Alle Messungen wurden bei 30°C durchgeführt.

14.1 Bestimmung von Extinktionskoeffizienten

Um die Enzymaktivität in *Units* berechnen zu können, ist es notwendig, den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ zu bestimmen. Zunächst ist es erforderlich, das Absorptionsmaximum der jeweiligen Substanz zu kennen. Bei dieser Wellenlänge wird dann die Absorption unterschiedlich konzentrierter Lösungen (5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM und 200 μM) gemessen. Durch Umstellung folgender Formel lässt sich der molare Extinktionskoeffizient berechnen:

$$E = \epsilon \times c \times d$$

E: Extinktion; ϵ : molarer Extinktionskoeffizient [$\text{l}/(\text{mmol} \times \text{cm})$]; c: Konzentration [mol/l]; d: Schichtdicke [cm].

Somit lässt sich durch Quotientenbildung aus Absorption und der dazu gehörigen Konzentration ein Wert für ϵ errechnen. Durch Mittelwertbildung aus den unterschiedlichen Werten erhält man den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ .

14.2 Küvettentest

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten der verschiedenen Dehydrogenasen wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

Messpuffer für LSDH

Oxidationsreaktion (pH 7,5):

Tris/HCl 200 mM

Reduktionsreaktion (pH 6,5):

K_2HPO_2 200 mM

Messpuffer für DSDH

Oxidationsreaktion (pH 9):

Tris/HCl 200 mM

Reduktionsreaktion (pH 6,5):

K_2HPO_4 200 mM

Substrate für L- bzw. DSDH

L-Sorbitol 1 M
D-Sorbitol 1 M
D-Fructose 2 M

Messpuffer für GatDH (pH 9)

BisTris 200 mM
MgCl₂ 1 mM

Substrat für GatDH

1,2-Hexandiol 1 M

Messpuffer für DMDH (pH 9)

K₂HPO₄ 400 mM
Triton X-100 1 %

Substrat für DMDH

D-Mandelat 100 mM

Cofaktoren für L-/DSDH, GatDH und DMDH**Oxidationsreaktion:**

NAD⁺ 36 mM

Reduktionsreaktion:

NADH+H⁺ 15 mM

Messpuffer für LMDH (pH 7)

K₂HPO₄ 200 mM

Substrat für LMDH

L-Mandelat 250 mM

Messpuffer für Diaphorase (pH 8,5)

Tris/HCl 200 mM
ZnSO₄ 4 mM

Substrat für Diaphorase

NADH + H⁺ 6 mM

Elektronenakzeptor für LMDH und Dia

DCPIP 4 mM

Tabelle II.21: Komponenten des Aktivitätstests für die unterschiedlichen Enzyme.

	L- /DSDH, GatDH Oxidation	LSDH, DSDH Reduktion	DMDH	LMDH	Diaphorase
Puffer	500 µl	500 µl	500 µl	330 µl	2,7 ml
H ₂ O	250 µl	280 µl	270 µl	500 µl	-
NAD ⁺	50 µl	-	30 µl	-	-
NADH + H ⁺	-	20 µl	-	-	siehe Substrat
Enzymlösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Substrat	100 µl	100 µl	100 µl	37 µl	100 µl
DCPIP	-	-	-	33 µl	100 µl

14.3 Screening verbesserter Enzymvarianten im Mikrotiterplattenmaßstab

14.3.1 Colorimetrischer Assay (Mayer und Arnold, 2002)

Um verbesserte Enzymvarianten im Mikrotiterplattenmaßstab schneller und vor allem deutlicher identifizieren zu können, wurde nach einem colorimetrischen Assay für Dehydrogenasen gesucht. Während der durch die Dehydrogenase katalysierte Substratoxidation entsteht $\text{NADH} + \text{H}^+$. Dieses bildet zusammen mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) in Anwesenheit von Phenazinmethosulfat (PMS) ein unlösliches, blauviolett Formazan, dessen Absorptionsmaximum bei ca. 550 nm liegt. Diese Methode wurde bereits erfolgreich verwendet, um die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase auf Nitrocellulose-Membranen (El Hawrani et al., 1996), die Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase in der flüssigen Phase (Fibla et al., 1993) und um die Aktivität der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase-Aktivität nach Elektrophorese (Manchenko, 1994) zu bestimmen. Die Reaktionslösung (in Tris/HCl, 50 μM , pH 8) setzt sich folgendermaßen zusammen:

NAD ⁺	300 μM
Substrat	300 μM
NBT	300 μM
PMS	30 μM

In die *wells* der Mikrotiterplatte werden 50 μl zellfreier Rohextrakt vorgelegt und mit 150 μl Reaktionslösung versetzt. Die Messung der Absorption bei 580 nm erfolgte sofort im Anschluss über einen Zeitraum von drei Minuten im Mikrotiterplatten-Reader.

14.3.2 Assay basierend auf NADH-Fluoreszenz (Kerstens, 1967)

Eine weitere Möglichkeit, verbesserte Klone schneller zu identifizieren ist ein Assay, der auf der Fluoreszenz des während der Reaktion entstehenden $\text{NADH} + \text{H}^+$ unter UV-Licht basiert. NAD⁺ zeigt unter UV-Licht keine Fluoreszenz. In diesem Fall setzt sich die Reaktionslösung folgendermaßen zusammen:

Messpuffer (je nach Enzym)	50,0 ml
NAD ⁺ (36 mM)	5,0 ml
H ₂ O _{deion.}	25,0 ml

In die *wells* der Mikrotiterplatten werden 20 μl zellfreier Rohextrakt vorgelegt und mit 160 μl der Reaktionslösung versetzt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 μl Substratlösung (1 M) gestartet. Nach drei Minuten kann die Mikrotiterplatte auf dem UV-Transilluminator fotografiert werden.

15. Biokonversionen

15.1 Analytische Umsätze mit LSDH

Zur Bestimmung der Oxidationsprodukte der LSDH wurden analytische Umsätze im 10 ml-Maßstab durchgeführt. Das Coenzym NAD^+ wurde durch das Pyruvat-Lactat-Dehydrogenase-System regeneriert. NADH , das bei der Oxidation der Polyole durch Reduktion des Cofactors NAD^+ entsteht, kann mit diesem System fortlaufend reoxidiert werden. Dabei führt die Reduktion des Pyruvats durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH) zur Entstehung von Lactat und NAD^+ . So übernimmt der Cofactor die Funktion eines Mediators. Das Oxidationsmittel ist in diesen Umsätzen das in großem Überschuss vorhandene Pyruvat. Für die analytischen Umsätze wurden folgende Ansätze gewählt:

Pyruvat	200 mM
Substrat	100 mM
NAD^+	3,6 mM
LDH	20 U
LSDH	180 U

Die Umsätze wurden in 50 ml-Erlenmeyerkolben auf dem Magnetrührer bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Substrat wurde L- bzw. D-Sorbitol eingesetzt. Nach unterschiedlichen Zeitintervallen wurden Proben gezogen und analysiert.

15.2 Produktbestimmung durch HPLC

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde an einer Ca^{2+} -beladenen Säule (Rezex RCM Monosaccharide Ca^{2+} 300 x 7,8 mm, Phenomenex), welche auf 80°C temperiert war, durchgeführt. $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ diente als isokratischer Eluent mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Detektion erfolgte mit einem auf 35°C temperierten Brechungsindexdetektor (Beckmann 156 Refractive Index Detektor), an den ein Integrator (Shimadzu C-RCA Chromatopac) angeschlossen war. Anhand der Retentionszeiten und der integrierten Peakflächen der eingespritzten Zuckerstandards (5-10 mM) konnte der Anteil von Produkt

und Substrat bestimmt werden. Die verschiedenen Proben wurden vor dem Einspritzen durch Filtration von Proteinen befreit (Vivaspin 500, 10000 MWCO, Sartorius) und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$ verdünnt.

16. Biochemische Charakterisierung von Enzym-Varianten

16.1 Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden folgende Lösungen verwendet:

Fixierlösung: Trichloressigsäure (TCA) 20% in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$

Kühlmittel: Petroleumbenzin

Anodenlösung 3 (Serva)

L-Asparaginsäure	0,17 g
L-Glutaminsäure	0,18 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$	ad 50 ml

Kathodenlösung 10 (Serva)

L-Arginin	0,22 g
L-Lysin	0,18 g
Ethylendiamin	6,0 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$	ad 50 ml

Entfärbelösung

Essigsäure	100 ml
Methanol	400 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$	500 ml

Färbelösung

Serva Blue-R-Tabletten	4 Tabletten (à 50 mg)
Entfärbelösung	ad 250 ml

Proteine sind amphotere Moleküle, d.h. ihre Nettoladung ist abhängig vom pH-Wert der Umgebung, in der sie sich befinden. Der pH-Wert, an dem die Nettoladung eines Proteins gleich Null ist, ist der isoelektrische Punkt (pI). Unterhalb ihres pI sind Proteine positiv geladen, oberhalb ihres pI negativ. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine Methode, Proteine aufgrund ihres pI elektrophoretisch zu trennen. Im Gel befindet sich dabei ein pH-Gradient. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes wandert ein Protein mit positiver Nettoladung zur Kathode, eines mit negativer Nettoladung wandert zur Anode. An der Position im Gel, an dem der pH-Wert des Gels dem pI des Proteins entspricht, fokussiert sich das Protein, da hier seine Nettoladung Null beträgt. Würde ein Protein über seinen pI hinaus wandern, wechselt es die Nettoladung und würde gezwungen, zurück zu wandern. Hierbei liegt die fokussierende Wirkung der IEF. Der Grad der Auflösung wird durch den Bereich des pH-Gradienten und die Stärke des elektrischen Feldes bestimmt. Durch Anlegen sehr hoher Spannung (bis zu mehreren Tausend Volt) ist es möglich, scharf fokussierte Banden zu

erhalten. Bei der isoelektrischen Fokussierung wurden fertige *SERVALYT® PRECOTES®*-Gele der Firma SERVA verwendet. Sie haben eine Schichtdicke von 150 μm und sind 125 x 125 mm groß. Der pH-Gradient reicht von 3 bis 10. Die Kammer für die isoelektrische Fokussierung (*2117 Multiphor II-Electrophoresis-Unit*, LKB) wird zunächst auf 6-7°C vorgekühlt (Kühlanlage: *DLK 300*, FRYKA Kältetechnik). Als Kühlungsvermittler wird Petroleumbenzin auf der Kühlplatte verteilt. Anschließend wird das Gel mit der Schutzfolie nach oben auf die Kühlplatte gelegt; eventuell vorhandene Luftblasen werden entfernt und die Schutzfolie abgezogen. Die Elektrodenstreifen werden etwas kleiner als das Gel zugeschnitten, mit Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt und auf die markierten Stellen auf dem Gel aufgelegt. Die Elektroden werden auf den Elektrodenstreifen ausgerichtet und die Verbindung zu Anode und Kathode hergestellt. Die Kammer wird geschlossen. Es folgt die Präfokussierung bei 6 W und 3 mA, solange bis die Spannung bei 500 V liegt (Präfokussierungsbedingungen: *low range*, $U_{\text{Grenze}} = 2000 \text{ V}$, $P_{\text{Grenze}} = 6 \text{ W}$). Ist die Präfokussierung abgeschlossen, wird die Spannung abgeschaltet, die Kammer geöffnet und die Proben (20 μl) sowie der Marker (10 μl) mit Hilfe eines Applikatorstreifens aus Silikon auf das Gel aufgetragen. Die Kammer wird wieder geschlossen und die Proteine solange bei 6 W und 3 mA fokussiert, bis die Spannung 2000 V erreicht hat. Dann wird das Gel aus der Kammer genommen und zur Fixierung 20 Minuten in Trichloressigsäure inkubiert. Das Gel wird dann kurz mit Entfärber gespült und zehn Minuten in der Färbelösung gefärbt. Danach wird das Gel wieder entfärbt, wobei es zwei- bis dreimal in 200 ml Entfärber inkubiert wird. Abschließend wird das Gel über Nacht unter dem Abzug getrocknet.

16.2 Bestimmung von K_m -Werten und Berechnung von k_{cat}

Die Michaelis-Konstante K_m ist ein für ein Enzym und ein Substrat charakteristischer Wert und entspricht der Substratkonzentration $[S]$, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit v die Hälfte ihres Maximalwertes v_{max} erreicht. Die drei Größen sind über die Michaelis-Menten-Gleichung miteinander verknüpft. Zur Bestimmung des K_m -Wertes wurden verschiedene Enzymkonzentrationen auf ihre Aktivität gegenüber verschiedenen Substratkonzentrationen getestet. Die graphische Darstellung erfolgte im *Lineweaver-Burk-Plot*. Der K_m -Wert ergibt sich aus der Geradengleichung. Durch Mehrfachbestimmung kann eine Standardabweichung berechnet werden. Die Wechselzahl k_{cat} (auch *turnover number*) ergibt sich aus der spezifischen Aktivität v_{max} [$\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{g}^{-1}$] multipliziert mit dem Molekulargewicht M [$\text{g} \times \text{mol}^{-1}$]. Den Quotienten k_{cat}/K_m bezeichnet man als katalytische Effizienz. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit Hilfe des Programms *SIGMA PLOT*.

16.3 Bestimmung der maximalen Temperatur

Zur Bestimmung der maximalen Temperatur eines Enzyms wurden die gereinigten Enzymproben zunächst bei der zu messenden Temperatur zehn Minuten inkubiert. Für Verdünnungen wurde auch der Messpuffer entsprechend temperiert. Die Messung erfolgte jedoch bei 30°C. Alle Messungen wurden doppelt durchgeführt, um falsche Werte auszuschließen.

16.4 Bestimmung der Temperaturstabilität

Die Stabilität der Enzyme bei einer bestimmten Temperatur wurde innerhalb einer Stunde gemessen. Zunächst wurde die Enzymaktivität unter optimalen Bedingungen bestimmt. Dann wurde das Enzym bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Es erfolgte nun alle zehn Minuten eine Aktivitätsmessung mit dem Hauptsubstrat des jeweiligen Enzyms. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmungen verifiziert.

16.5 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums der verschiedenen Enzyme wurden Messungen unter Verwendung verschiedener Puffer, die einen pH-Bereich zwischen 3,0 und 12,0 abdeckten (pH 3 bis 5: Citrat-Puffer; pH 5,5 bis 7: Kaliumphosphat-Puffer; pH 7,5 bis 9: Tris-Puffer; pH 9,5 bis 10,5: Piperazin; pH 11 bis 12: Glycin-Puffer), durchgeführt. Substrate, Cosubstrate, sowie Enzymverdünnungen wurden ebenfalls in dem jeweiligen Puffersystem angesetzt. Die jeweils höchste Aktivität wurde als 100 % angenommen und mit den restlichen Aktivitäten ins Verhältnis gesetzt. Auch hier wurden alle Messungen zur Verifizierung doppelt durchgeführt.

16.6 Bestimmung des Molekulargewichts durch Gelfiltration und native PAGE

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der nativen Enzyme wurden zwei verschiedene Verfahren eingesetzt.

16.6.1 Gelpermeationschromatographie

Für die Gelpermeationschromatographie wurden folgende Puffer verwendet:

Laufpuffer (pH 7)

Na-Phosphat	0,05 M
NaCl	0,15 M

Säulenlagerpuffer (pH 7)

BisTris	50 mM
Natriumazid	0,03 %

Eine Möglichkeit zur Bestimmung des annähernden Molekulargewichts eines Proteins ist die Gelfiltration. Tatsächlich wird durch dieses Verfahren der Stoke'sche Radius r_s bestimmt. Dieser lässt zusammen mit dem Sedimentationskoeffizient $S_{20,W}$ eine recht genaue Berechnung des Molekulargewichts zu (Siegel und Monty, 1966). Zur Erstellung einer Eichgerade wurden verschiedene Proteine bekannten Molekulargewichts in einer Konzentration von ca. 4 mg/ml in Laufpuffer gelöst. Vor dem Auftragen der Probe wurde die Säule mit einem Säulenvolumen äquilibriert. Der Trennbereich der Superdex S200-HR liegt zwischen 10 und 600 kDa. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min während des gesamten Laufs. Die Fraktionen ($V = 0,75$ ml) wurden in Mikrotiterplatten gesammelt und per SDS-PAGE untersucht. Folgende Eichproteine wurden verwendet:

- Ferretin (450 kDa)
- Catalase (240 kDa)
- β -Glucosidase (135 kDa)
- *Albumin bovine* (67 kDa)
- *Albumin egg* (45 kDa)
- β -Lactoglobulin (36,56 kDa)
- Ribonuclease A (13,7 kDa)

16.6.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Native PAGE)

Für die native PAGE wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

Elektrodenpuffer

Tris	3,0 g
Glycin	14,4 g
H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml

Solubilisierungspuffer

0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	1,25 ml
Glycerin	2,5 ml
0,5% Bromphenolblau	0,2 ml
H ₂ O _{deion.}	3,55 ml

APS-Lösung, Fixierer und Fäbrelösung entsprechen denen der SDS-PAGE.

Mit Hilfe der nativen PAGE ist es möglich, Proteine in ihrem ursprünglichen (also nativen) Zustand elektrophoretisch aufzutrennen. Die Proteine werden dabei nicht durch SDS, Kochen oder β -Mercaptoethanol denaturiert und liegen in ihrer natürlichen Konformation

vor. Bei der nativen PAGE werden fertige 4-20% *Mini PROTEAN®TGX™ Precast*-Gele der Firma Biorad verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden auch hier 20 µl Proteinprobe mit 40 µl nativem Solubilisierungspuffer versetzt und ohne zu kochen direkt auf das native Gel aufgetragen. Hierbei wurden die mittels Affinitätschromatographie an Nickelsepharose angereicherten Proteinproben eingesetzt. Von der Proteinprobe wurden 30 µl in die Geltaschen gefüllt, vom Marker 10 µl. Die Spannung wurde bei einer Spannung von 25 V über einen Zeitraum von zehn Stunden durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel wie nach einer SDS-PAGE gefärbt.

Alternativ kann nach einer nativen PAGE ebenso wie nach einer isoelektrischen Fokussierung eine Aktivitätsfärbung der Dehydrogenasen durchgeführt werden. Dadurch können die Proteine in den nativen Gelen lokalisiert werden. Nach der IEF entfällt dabei allerdings der Schritt der Fixierung mit Trichloressigsäure, da hierbei die Proteine denaturiert werden und keine Aktivität mehr zeigen. Für die Aktivitätsfärbung wurde folgende Reaktionslösung verwendet:

Puffer (je nach Enzym)	50 ml
NAD ⁺ -Lösung (90 mM)	1 ml
NBT-Lösung (10 mg/ml)	1 ml
PMS-Lösung (1 mg/ml)	1 ml
Substrat (1,5 M)	10 ml
H ₂ O _{deion.}	37 ml

Das Gel wurde in der Färbelösung im Dunkeln inkubiert bis eine violette Bande zu erkennen war. Nachdem die Bande deutlich sichtbar war, erfolgte die Fixierung.

17. MALDI-TOF

17.1 Tryptischer in-Gel-Verdau

Für den tryptischen In-Gel-Verdau wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

Acetonitril/Wasser-Gemisch (1:1)

Acetonitril	1 ml
H ₂ O _{millipore}	1 ml

Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer

NH ₄ HCO ₃	32 mg
H ₂ O _{millipore}	ad 10 ml

Trypsin-Lösung

Trypsin	1,6 µl
NH ₄ HCO ₃ -Puffer	250 µl

Die Serinprotease Trypsin schneidet in einer Polypeptidkette spezifisch nach jedem Lysin bzw. Arginin, sofern diese nicht von einem Prolin gefolgt sind, da jene Bindung fast vollständig resistent für die Spaltung von Trypsin ist. Um einen geringeren Selbstverdau zu gewährleisten, wird hier methyliertes Trypsin verwendet (Trypsin, *Sequencing Grade Modified*, Promega, Mannheim). Da eine Proteinprobe auch nach mehreren Anreicherungsschritten immer noch unerwünschte Fremdproteine enthalten kann, wurde die Proteinlösung elektrophoretisch aufgetrennt, um nur die gewünschten Banden dem Verdau zu unterziehen (Shevchenko et al., 1996). Die zu untersuchende Probe wurde auf ein 1,5 mm dickes, präparativess SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel zwei Stunden mit Coomassie gefärbt. Die Hintergrundfärbung wurde mehrmals mit frischem Fixierer ausgewaschen. Die gewünschten Banden wurden anschließend mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und zerkleinert. Die Gelstücke wurden in ein steriles Reaktionsgefäß gegeben und 2 x 15 Minuten in H₂O_{millipore} gewaschen. Es folgte eine 2 x 15-minütige Inkubation in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch. Durch den anschließenden Waschschriff (15 Minuten) in reinem Acetonitril schrumpfen die Gelstücke stark zusammen. Nachdem die Gelstücke 15 Minuten an der Luft vollständig getrocknet waren, wurden 20 µl Trypsin-Lösung (in 40 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer) zugegeben. Der Verdau lief über Nacht bei 37°C. Der Überstand wurde in ein neues, steriles Gefäß gegeben und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

17.2 MALDI-TOF

Das Prinzip der MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*) Massenspektrometrie beruht auf dem 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. Dabei entstehen Ionen, die in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. In Abhängigkeit von ihrer Masse besitzen die Ionen unterschiedliche Geschwindigkeiten und werden in einem Flugzeitanalysator (TOF: *Time of Flight*) detektiert. Zunächst erfolgt eine Eichung mit Referenzsubstanzen bekannter Massen, anhand derer sich die zu untersuchenden Proteine bestimmen lassen.

Die Messung wurde mit dem Massenspektrometer Bruker Reflex III™, der SCOUT 386 Ionenquelle (Bruker Daltonics, 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 dienten die mit Trypsin verdauten

Proteinproben, die mit der Matrix im Verhältnis 1:1 bzw. 1:9 vermischt wurden. Als Matrix wurde CCA (α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure) verwendet. Auf einen Proben-teller wurden je 1 μ l des Proben-Matrix-Gemischs aufgetragen. Nach Verdunsten des Lösungsmittels erfolgte die Kokristallisation 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 Mascot² abgeglichen.

² <http://www.matrixscience.com>

III. Ergebnisse

1. Screening nach bakteriellen L-Sorbitol-Dehydrogenasen

1.1 Anreicherung von Mikroorganismen auf L-Sorbitol-Screening-Agar

Zur Durchführung einer spezifischen, stereoselektiven Oxidation des Zuckeralkohols L-Sorbitol wurde nach bakteriellen L-Sorbitol-Dehydrogenasen gesucht. Da Zuckeralkohole vor allem in Obst vorkommen, wurden vor allem Bodenproben gewählt, die von privaten Kompostanlagen, Weinbergen oder Streuobstwiesen stammten, um beim Screening auf L-Sorbitol-verwertende möglichst verschiedene Mikroorganismen erfassen zu können. Zur Selektion der gesuchten Organismen wurde ein mineralisches Medium verwendet, welches L-Sorbitol als alleinige Kohlenstoffquelle enthielt. Die Bodenproben wurden mit 0,9% Natriumchlorid-Lösung verdünnt und auf dem festen Mineralmedium ausplattiert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Verdünnungsstufe nicht zu niedrig gewählt wird, um möglichst wenig Bodensubstrat und damit andere Kohlenstoffquellen auf die Platten zu übertragen. Die Agarplatten wurden schließlich unter regelmäßigen Kontrollen bis zu 15 Tage bei 28°C inkubiert (siehe II.4.1). Insgesamt konnten so zahlreiche Mikroorganismen isoliert werden, die mit L-Sorbitol als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen konnten. Jedoch waren nur wenige davon in der Lage, in flüssigen Selektivmedien zu wachsen, so dass die Zellen geerntet und mittels Ultraschall aufgeschlossen werden konnten (siehe II.4.4). Die so erhaltenen zellfreien Rohextrakte wurden auf L-Sorbitol-Dehydrogenase-Aktivität untersucht, indem der NAD⁺-Verbrauch in einem Oxidationsassay verfolgt wurde (siehe II.14.2). Dabei konnte nur bei einem einzigen Bodenisolat LSDH-Aktivität nachgewiesen werden. Es handelte sich dabei um das Isolat mit dem Arbeitstitel K5.



Abbildung III.1: Kolonien des Bodenisolats mit dem Arbeitstitel K5 in Reinkultur auf L-Sorbitol-Screening-Agar.

Das Bakterium stammte aus einer Bodenprobe aus einer privaten Kompostanlage in Mandelbachtal/Erfweiler-Ehlingen. Die spezifische Aktivität für die Oxidation von L-Sorbitol betrug 1,6 U/mg. Für Ribitol konnte eine Aktivität von 1,8 U/mg gemessen werden,

für Xylitol sogar 3,1 U/mg. Die Kolonien sind weiß und glänzend, erhaben, haben einen glatten Rand, sind milchig trüb bis leicht durchsichtig. Im Lichtmikroskop konnten die Zellen vermessen werden. Sie sind stäbchenförmig, etwa 2,5 µm lang und 0,5 bis 1 µm breit.

1.2 Identifizierung und Charakterisierung von Bodenisolat K5

1.2.1 Bestimmung des Gram-Typs: Gramfärbung, KOH-Test, Amino-peptidase-Test

Zur Bestimmung des Gram-Typs des Testorganismus K5 wurden verschiedene Methoden durchgeführt (siehe II.5.1). Bei der Garmfärbung wird ein hitzefixierter Ausstrich des zu testenden Bakteriums mit einem Triphenylmethanfarbstoff und mit Iod gefärbt. Danach wird der Ausstrich mit Ethanol wieder entfärbt. Bei gramnegativen Bakterien wird der Iodfarbstoffkomplex leichter extrahiert als bei grampositiven. Letztere erscheinen dunkelviolett, gramnegative dagegen hellrot. Trotz mehrmaligen Wiederholens konnte mit Hilfe der Gramfärbung sowohl beim Testorganismus K5 als auch bei den Kontrollorganismen *E. coli* (negativ) und *Bacillus subtilis* (positiv) kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden.

Die KOH-Probe ist ein Schnellverfahren zur Gram-Identifizierung, bei dem die gramnegative Zellwand durch das Einwirken von 0,5 M KOH zerstört wird, wodurch die DNA freigesetzt wird und als viskoser Faden in Erscheinung tritt. Grampositive Bakterien lysieren nicht unter der Einwirkung von KOH. Beim Testorganismus K5 konnte kein viskoser DNA-Faden nachgewiesen werden, was auf einen grampositiven Organismus hindeutet. Bei den Kontrollorganismen *E. coli* und *Bacillus subtilis* verlief die Reaktion den Erwartungen entsprechend.

Ein weiterer Schnelltest zur Gram-Identifizierung ist der L-Amino-peptidase-Test. Dieses Enzym ist mit wenigen Ausnahmen (*Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter spec.*, *Veillonella parvula*) nur bei gramnegativen Bakterien nachweisbar. Der Test beruht darauf, dass L-Anilin-4-Nitroanilid mit Hilfe der L-Amino-peptidase in L-Alanin und das gelbe 4-Nitroanilid gespalten wird. Der Teststreifen färbt sich deshalb bei gramnegativen Bakterien gelb, bei grampositiven bleibt er weiß. Bei *E. coli* war eine deutliche Gelbfärbung des Streifens zu erkennen, während die Verfärbung bei K5 ausblieb. Dies deutet ebenfalls auf einen grampositiven Organismus hin.

1.2.2 Katalase- und Cytochromoxidasenachweis (siehe II.5.2)

Die Katalase katalysiert die Zersetzung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser. In der Bakterienzelle kann Luftsauerstoff zu Peroxid-Radikalen, Radikal-Anionen und H_2O_2 hydriert werden. Fehlen Superoxid-Dismutase und Katalase, so sind die Bakterien sauerstoffempfindlich und obligat anaerob. Um die Katalase nachzuweisen, werden Agarplatten, die mit dem Testorganismus bewachsen sind mit 3-prozentiger Wasserstoffperoxidlösung überschichtet. Bei K5 setzte keine Gasbildung ein (siehe Abbildung III.2), was auf einen katalasenegativen Organismus hindeutet. Als Kontrollorganismen für den Katalasenachweis dienten *Pseudomonas fluorescens* (katalasepositiv) und *Streptococcus faecalis* (katalasenegativ), deren Reaktion erwartungsgemäß verlief.



Abbildung III.2: Katalase-Nachweis bei verschiedenen Testorganismen. a: Positivkontrolle *Pseudomonas aeruginosa*; b: Testorganismus K5; c: Negativkontrolle *E. coli*



Abbildung III.3: Cytochromoxidase-Nachweis bei verschiedenen Testorganismen. a: Positivkontrolle *Pseudomonas aeruginosa*; b: Testorganismus K5; c: Negativkontrolle *E. coli*

Die Cytochromoxidase ist das terminale Enzym der Atmungskette, welche in den Mitochondrien der Eukaryonten und in den Membranen vieler Bakterien lokalisiert ist. Zum Nachweis der Cytochromoxidase werden mit dem Testorganismus bewachsene Agarplatten mit dem frisch gemischten Nachweisreagenz beträufelt. Organismen, bei denen in weniger als 30 Sekunden eine Blaufärbung eintritt, gelten als cytochromoxidase-positiv. Dabei oxidiert die Cytochromoxidase Cytochrom c, welches wiederum das Nachweisreagenz oxidiert, was durch eine Blaufärbung angezeigt wird. Bei K5 trat sofort nach dem Aufgeben

des Nachweisreagenz eine deutliche Blaufärbung ein (siehe Abbildung III.3). K5 ist also cytochromoxidase-positiv. Als Kontrollorganismen dienten *Pseudomonas aeruginosa* (cytochromoxidase-positiv) und *E. coli* (cytochromoxidase-negativ), bei denen die Reaktion den Erwartungen entsprechend verlief.

1.2.3 Weitere Tests zur Stammidentifizierung

Neben der Identifizierung des Gram-Typs und des Katalase- und Cytochromoxidase-Nachweises wurden außerdem eine „Bunte Reihe“ mit den Substraten Glucose, Lactose und Galactose durchgeführt (siehe II.5.3), um die Verwertbarkeit dieser Substrate nachzuweisen. Der Organismus K5 konnte jedoch keinen dieser Zucker verwerten. Es fand weder Säure- noch Gasbildung statt.

Auch ein Hugh-Leifson-Test zur Unterscheidung zwischen oxidativer und fermentativer Zuckerverwertung (siehe II.5.3) lieferte ein negatives Ergebnis. Weder oxidativ noch fermentativ konnte ein Wachstum festgestellt werden. Der im Weichagar enthaltene Indikator zeigte keine Verfärbung und es bildeten sich keine Gasblasen.

Die Nachweise von Exoenzymen zur Stärkehydrolyse und zum Casein-Abbau (siehe III.5.4) verliefen ebenfalls negativ. Die hier verwendeten Kontrollorganismen zeigten die erwarteten Reaktionen.

1.2.4 Identifizierung mit Hilfe der 16S-rDNA-Analyse

Zur Identitätsüberprüfung des isolierten Bakterienstammes wurde auch eine 16S-rDNA-Sequenzanalyse durchgeführt (siehe II.5.5). Da diese ribosomale DNA unter allen Organismen stark konserviert ist, wird sie bevorzugt für phylogenetische Studien verwendet. Mit den Primern DiHo-27-f und DiHo-1525-r, die aus homologen Bereichen abgeleitet wurden, konnten DNA-Fragmente amplifiziert werden, die für Homologievergleiche und Datenbankanalysen herangezogen werden konnten (Woese et al., 1980; Weisburg et al., 1991). Zunächst wurde die genomische DNA aus einer frischen Übernachtskultur von K5 isoliert. Die genomische DNA diente dann als Template für die Amplifikation der 16S-rDNA mit Hilfe der *FideliTaq*TM-DNA-Polymerase (USB Corporation). Das mit den oben genannten Primern amplifizierte Fragment hatte eine Länge von etwa 1500 bp, was im Agarose-Gel nachgewiesen wurde. Im Anschluss an die PCR wurde eine TOPO-TA-Klonierung durchgeführt (siehe II.6.5.1). Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht wurden ausgewählte weiße Kolonien mittels *Colony*-PCR (siehe II.6.5.3) auf das gewünschte

16S-rDNA-Insert überprüft. Aus solchen Klonen, die das gewünschte Insert trugen, wurden die Plasmide isoliert (siehe II.6.1.1) und sequenziert (siehe II.6.6). Aus den Sequenzabschnitten der eingesetzten Sequenzierprimer konnte mit Hilfe des Programms *Contig Express* (Invitrogen) ein Alignment aus 1446 bp erstellt werden. Um den vorliegenden Bakterienstamm taxonomisch zu identifizieren, wurde die Sequenz mit der Internetdatenbank BLAST (NCBI)³ abgeglichen. Es ergaben sich folgende Übereinstimmungen.

Tabelle III.1: Ergebnis des Sequenzabgleichs der 1479 bp der 16S-rDNA Sequenz mit der NCBI-Datenbank.

	Organismus	Übereinstimmung [%]
1	<i>Sinorhizobium</i> sp. L1 partial 16S rRNA gene (AJ879127.1)	98
2	<i>Sinorhizobium</i> sp. AFK-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (DQ911548.1)	96
3	<i>Mycoplana ramosa</i> strain DSM 7292 16S ribosomal RNA gene, partial (EU022308.1)	97
4	<i>Sinorhizobium</i> sp. R-24605 16S rRNA gene, strain R-24605 (AM084000.1)	96
5	<i>Sinorhizobium</i> sp. C4 16S ribosomal RNA gene. partial sequence AF227753.1)	96
6	<i>Sinorhizobium</i> sp. B69sp 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (DQ335107.1)	96
7	<i>Sinorhizobium</i> sp. 16S rRNA gene, strain BK10 (AJ012211.1)	96
8	<i>Sinorhizobium</i> sp. 16S rRNA gene, strain BK1 (AJ012210.1)	96
9	<i>Sinorhizobium</i> sp. S002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AF285962.1)	96
10	<i>Sinorhizobium</i> sp. TJ170 partial 16S RNA gene, strain TJ170 (AJ505297.1)	96

Es ergaben sich für das amplifizierte 16S-rDNA-Fragment fast ausschließlich Übereinstimmungen mit *Sinorhizobium*-Arten. Die höchste Übereinstimmung ergab sich dabei für *Sinorhizobium* sp. L1. Allerdings betrug auch hier die Übereinstimmung nur 98%. Somit kann der isolierte Organismus nicht eindeutig als *Sinorhizobium* identifiziert werden. Eine 97%ige Übereinstimmung konnte außerdem für einen *Mycoplana ramosa*-Stamm gefunden werden. Jedoch stimmen die physiologischen Eigenschaften beider Gattungen nicht mit den für den Organismus K5 gefundenen Eigenschaften überein. Tabelle III.2 fasst die physiologischen Eigenschaften von K5 und *Sinorhizobium*-Arten vergleichend zusammen.

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>

Tabelle III.2: Vergleich der morphologischen und physiologischen Eigenschaften des neuen Bodenisolats „K5“ und von *Sinorhizobium* (Kühn, 2004).

	neues Isolat „K5“	<i>Sinorhizobium</i>
Morphologie der Kolonien	weiß und glänzend, erhaben, glatter Rand, milchig trüb, leicht durchsichtig	erhaben, glatter Rand, milchig trüb, leicht durchsichtig
Morphologie der Zellen	stäbchenförmig; 2,5 µm lang; 0,5-1 µm breit	stäbchenförmig 2 µm lang; 0,5 µm breit polar begeißelt
Gramtyp	wahrscheinlich positiv	negativ
Katalase	negativ	positiv
Cytochromoxidase	positiv	negativ
Caseinase	negativ	
Stärkehydrolyse	negativ	
Wachstum auf:		
- Glucose	-	+
- Galactose	-	+
- Lactose	-	+

Abbildung III.4 zeigt die ermittelte Sequenz der 16S-rDNA von K5 im Vergleich mit der von *Sinorhizobium* sp. L1, dessen 16S-rDNA-Sequenz die höchste Übereinstimmung zu der von K5 aufwies.

```

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      5      15      25      35      45
K5      taccttgttacgacttcaccccagtcgctgaccctaccgtggtagctgc
AJ879127.1 taccttgttacgacttcaccccagtcgctgaccctaccgtggtagctgc

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      55     65     75     85     95
K5      ctcccttgccggttagcgcactaccttcgggtaaaaccaactcccatgggtgt
AJ879127.1 ctcccttgccggttagcgcactaccttcgggtaaaaccaactcccatgggtgt

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      105    115    125    135    145
K5      gacgggcccgggtgtgtacaaggcccgggaacgtattcaccgcccgcattgctga
AJ879127.1 gacgggcccgggtgtgtacaaggcccgggaacgtattcaccgcccgcattgctga

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      155    165    175    185    195
K5      tccgcgattactagcgcattccaacttcattgcactcgagttgcagagtgca
AJ879127.1 tccgcgattactagcgcattccaacttcattgcactcgagttgcagagtgca

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      205    215    225    235    245
K5      atccgaactgagatggccttttggagattagctcgacctcgccggtctcgct
AJ879127.1 atccgaactgagatggccttttggagattagctcgacctcgccggtctcgct

      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      255    265    275    285    295
K5      gccactgtcaccaccattgtagcacgtgtgtagcccagcccgtaagggc
AJ879127.1 gccactgtcaccaccattgtagcacgtgtgtagcccagcccgtaagggc

```



```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      305      315      325      335      345
K5      catgaggacttgacgtcatccccaccttctctcggcttatcaccggcag
AJ879127.1 catgaggacttgacgtcatccccaccttctctcggcttatcaccggcag

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      355      365      375      385      395
K5      tccccttagagtgcccaactgaatgctggcaactaagggcgaggggttgcg
AJ879127.1 tccccttagagtgcccaactgaatgctggcaactaagggcgaggggttgcg

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      405      415      425      435      445
K5      ctcgttgctgggacttaacccaacatctcacgacacgagctgacgacagcc
AJ879127.1 ctcgttgctgggacttaacccaacatctcacgacacgagctgacgacagcc

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      455      465      475      485      495
K5      atgcagcacctgtctccgatccagccgaactgaaggaacgtgtctccacg
AJ879127.1 atgcagcacctgtctccgatccagccgaactgaaggaacgtgtctccacg

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      505      515      525      535      545
K5      aaccgcatcgggatgtcaagggctggtaaggttctgctgcttgcg
AJ879127.1 aaccgcatcgggatgtcaagggctggtaaggttctgctgcttgcg

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      555      565      575      585      595
K5      attaaaccacatgctccaccgcttgtgctggggcccccgctcaattccttga
AJ879127.1 attaaaccacatgctccaccgcttgtgctggggcccccgctcaattccttga

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      605      615      625      635      645
K5      gttttaatcttgcgaccgtaactccccaggcggaatgtttaatgctttagc
AJ879127.1 gttttaatcttgcgaccgtaactccccaggcggaatgtttaatgctttagc

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      655      665      675      685      695
K5      tgcgccaccgaacagtaaaactgcccagcggtaacaattcatcgtttacg
AJ879127.1 tgcgccaccgaacagtaaaactgcccagcggtaacaattcatcgtttacg

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      705      715      725      735      745
K5      gcggtggaataccagggtatctaactcctggttgcctcccacgctttcgac
AJ879127.1 gcggtggaataccagggtatctaactcctggttgcctcccacgctttcgac

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      755      765      775      785      795
K5      ctcagcgtcagtaatggaccagtgagccgcttcgccactggtgttcctc
AJ879127.1 ctcagcgtcagtaatggaccagtgagccgcttcgccactggtgttcctc

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      805      815      825      835      845
K5      cgaatatctacgaatttcacctctacactcgggaattccactcacctcttc
AJ879127.1 cgaatatctacgaatttcacctctacactcgggaattccactcacctcttc

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      855      865      875      885      895
K5      catactcagataccagatataaaaggcagttccaggagttgagctccggg
AJ879127.1 catactcagataccagatataaaaggcagttccaggagttgagctccggg

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      905      915      925      935      945
K5      atttcaccctgacttaaata-tcgcctacgtgcgctttacgccagtaa
AJ879127.1 atttcaccctgacttaaataaccgcctacgtgcgctttacgccagtaa

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      955      965      975      985      995
K5      ttccgaacaacgctagcccccttctgtattaccgcggctgctggcacgaag
AJ879127.1 ttccgaacaacgctagcccccttctgtattaccgcggctgctggcacgaag

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     1005     1015     1025     1035     1045
K5      ttagccggggcttcttctccgactaccgtcattatcttcatcggtgaaag
AJ879127.1 ttagccggggcttcttctccggttaccgtcattatcttcatcggtgaaag

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     1055     1065     1075     1085     1095
K5      agctttacaaccctaaggccttcatcactcacgcggcatggctggatcag
AJ879127.1 agctttacaaccctaaggccttcatcactcacgcggcatggctggatcag

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     1105     1115     1125     1135     1145
K5      gcttgcgcccattgtccaatattccccactgctgcctcccgtaggagttt
AJ879127.1 gcttgcgcccattgtccaatattccccactgctgcctcccgtaggagttt

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     1155     1165     1175     1185     1195
K5      gggccgtgtctcagtcccaatgtggctgatcatcctctcagaccagctat
AJ879127.1 gggccgtgtctcagtcccaatgtggctgatcatcctctcagaccagctat

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     1205     1215     1225     1235     1245
K5      ggatcgtcgccttggtaggcctttaccccaccaactagctaataccaacgc
AJ879127.1 ggatcgtcgccttggtaggcctttaccccaccaactagctaataccaacgc

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     1255     1265     1275     1285     1295
K5      gggccgatcctttgccgataaatctttccccgaagggcacatacgggat
AJ879127.1 gggccgatcctttaccgataaatctttccccgaagggcacatacgggat

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     1305     1315     1325     1335     1345
K5      taattccagtttcccggagctgttccgtagc-aaagggtagcttcccacgc
AJ879127.1 taattccagtttcccggagctattccgtagt-aaagggtagcttcccacgc

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     1355     1365     1375     1385     1395
K5      gttactcaccgctctgccgctc-tgtattgtacagcgcctcgacttgcattg
AJ879127.1 gttactcaccgctctgccgctc-cccttgc-ggggcgctcgacttgcattg

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.
     1405     1415     1425     1435     1445
K5      tgtaagcctgccgcccagcgttcgttctgagccatgatcaaaactct
AJ879127.1 tgtaagcctgccgcccagcgttcgttctgagccatgatcaaaactct

```

Abbildung III.4: Alignment zum Homologievergleich der 16S-rDNA-Sequenz des Testorganismus K5 mit der in der Datenbank hinterlegten Sequenz von *Sinorhizobium* sp. L1 (AJ879127.1). Das Alignment wurde mit dem Programm *BioEdit* erstellt. Übereinstimmungen sind gelb markiert, Unterschiede rot.

1.3 Aktivitätstests und Anreicherung der LSDH aus K5

Der Assay zur Bestimmung der L-Sorbitol-Dehydrogenase-Aktivität in Rohextrakten aus dem Bodenisolat K5 enthielt Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 (100 mM), NAD⁺ (1,8 mM) und 100 µl Enzymlösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mM Substrat gestartet (siehe II.14.2). Angegeben ist jeweils die Endkonzentration in der Küvette. Nach Substratzugabe erfolgte die Messung der NADH-Bildung bei 340 nm über einen Zeitraum von einer Minute. Im Rohextrakt von K5 konnte eine spezifische L-Sorbitol-Dehydrogenase-Aktivität von 1.6 U/mg ermittelt werden. Aus 250 ml Kultur des Organismus K5 konnten insgesamt 38 U LSDH gewonnen werden. Als erster Anreicherungsschritt erfolgte eine Ammoniumsulfatfällung mit 25 % Ammoniumsulfat bei 4°C unter ständigem Rühren (siehe II.10.1). Nach 17,5 Stunden wurden die ausgefällten Proteine abzentrifugiert. Das Gesamtvolumen nach der Ammoniumsulfatfällung betrug 42,5 ml. Es waren keinerlei Aktivitätsverluste zu verzeichnen. Im Anschluss wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC; siehe II.10.2) gewählt, um die LSDH aus K5 weiter anzureichern, wobei hohe Aktivitätsverluste zu verzeichnen sind. Die Aktivität nach der HIC betrug lediglich 13,4 U. Das Elutionsdiagramm der HIC ist in Abbildung III.5 dargestellt.

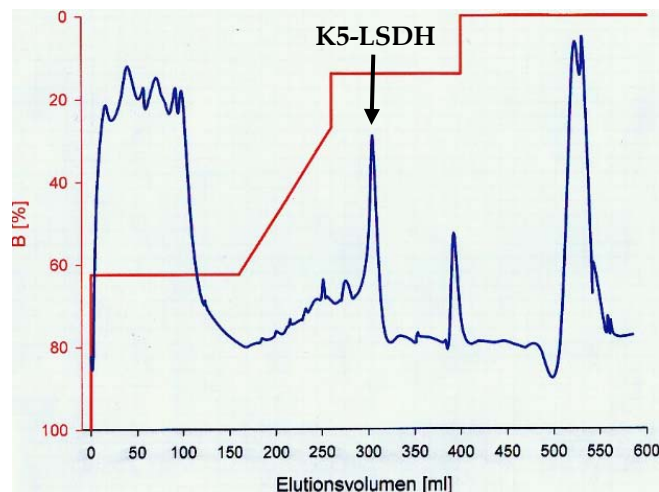


Abbildung III.5: Elutionsdiagramm der Hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) mit der LSDH-Probe aus der Ammoniumsulfatfällung. Die LSDH ist in den Fraktionen 37 und 38 (296-312 ml) enthalten.

Diejenigen Fraktionen, die die LSDH enthielten wurden gepoolt und zur Reinheitskontrolle auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe II.12), dessen Ergebnis in Abbildung III.6 dargestellt ist.

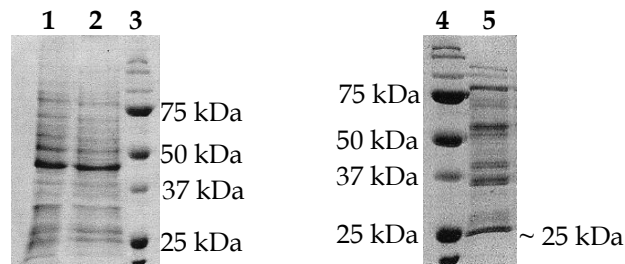


Abbildung III.6: SDS-PAGE zur Reinheitskontrolle nach zwei Anreicherungs-schritten. Spur 1: Rohextrakt; Spur 2: Ammoniumsulfatfällung; Spuren 3 und 4: *Precision Plus Protein Standard Dual Color* (Biorad); Spur 5: Hydrophobe Interaktionschromatographie.

In Abbildung III.6 ist deutlich eine prominente Bande bei etwa 25 kDa zu sehen (Spur 5). Diese Bande, die zu einer *short-chain*-Dehydrogenasen gehören könnte, wurde aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und tryptisch im Gel verdaut.

1.4 Tryptischer In-Gel-Verdau und MALDI-TOF-Analyse der LSDH aus K5

Durch MALDI-TOF-MS/MS (siehe II.17) lässt sich für jedes enzymatisch oder chemisch gespaltene Protein ein spezifischer Peptidfingerprint ermitteln, wobei die Massen aller flugfähigen einfach oder mehrfach geladenen Peptide gleichzeitig detektiert werden. Mit Hilfe der MS/MS-Methode werden außerdem bis zu zehn der prominentesten Massenpeaks (Mutterpeaks) nach der ersten Analyse nochmals einem Zerfall unterworfen. So kann ein noch spezifischerer Datensatz erhalten werden, der für eine Datenbankrecherche verwendet werden kann. Während der Anreicherung der LSDH aus K5 wurde eine prominente Bande bei etwa 25 kDa erhalten, deren Größe derer einer *short-chain*-Dehydrogenase entsprechen könnte. Um die Proteinbande bei 25 kDa tryptisch im Gel zu verdauen, wurden die Proteinproben zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit der Protease Trypsin verdaut. Vorteilhaft bei dieser Methode ist, dass die Proteinbanden zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt werden, wonach die gewünschten Proteinbanden gezielt aus dem Gel ausgeschnitten werden und weiter untersucht werden können (Kornberger, 2009). Bei bekannter Aminosäuresequenz besteht die Möglichkeit, einen *in silico*-Verdau eines Proteins durchzuführen und vorab zu klären, welche einzelnen Peptidmassen bei einem realen Verdau zu erwarten sind. Dabei ermittelt die Internet-Software *Protein Prospector*⁴ die Schnittstellen innerhalb einer Aminosäuresequenz für eine bestimmte Spaltung und gibt anschließend die in einem solchen Verdau zerlegten Massen an. Dabei werden auch solche Fragmente berücksichtigt,

⁴ prospector.ucsf.edu/

die aufgrund sogenannter *missed cleavages* entstehen und gegenüber den berechneten Fragmenten vergrößert sind. In der MALDI-TOF-Analyse sollten dann möglichst viele der Massenpeaks detektiert werden, um die Identität des verdauten Proteins bestätigen zu können. Da die Sequenz der LSDH aus K5 jedoch nicht bekannt ist, spielt ein theoretischer Verdau hier keine Rolle. Als Matrix diente CCA (α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure). Zur Herstellung der Matrix wird eine Lösung von CCA (5 mg/ml) in 50 % Acetonitril, 50 % H₂O und 0,1 % Trifluoressigsäure hergestellt. Es werden 0,5 μ l der Proteinlösung mit 12,5 μ l der Matrixlösung vermischt. Von dieser Mischung wird 1 μ l auf die Cal-Positionen des Targets gegeben. Nach Verdunsten des Lösungsmittels erfolgte die Kokristallisation des Analyten und der Matrix. Der Probeneller 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*⁵ abgeglichen. Das Ergebnis der Datenbankrecherche ist in Abbildung III.7 dargestellt.

Mascot Search Results

Match to: [gi|148252466](#) Score: **69** Expect: **0.93**
ribitol 2-dehydrogenase (RDH) [Bradyrhizobium sp. BTAi1]

Nominal mass (M_r): **25987**; Calculated pI value: **5.75**

Taxonomy: [Bradyrhizobium sp. BTAi1](#)

Sequence Coverage: **29%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MTRELEGKVA AVTGAASGIG LASSEAMLAA GARVVMIDRD ASALARLRER
51  HGEAVIPVVI DLLDSTDCAT LLPRILDAAG RLDILHANAG SYIGGDIVDA
101 RTDAIDRMLN LNVNVVMKNV RDALPHMIDR GSGDIIVTSS LAAHYPTPWE
151 PVYASSKWAI DCFVQTVRRQ VFKHGIRVGA ISPGPVVTAL IADWPAEKLK
201 EARESGSLLE PAEVANVIMF MLTRPRGMTI RDVVMLPTNF DL

```

Abbildung III.7: Ergebnis der Mascot-Datenbanksuche mit den MALDI-Fingerprints der 25 kDa-Bande aus der Anreicherung der LSDH aus K5. Dargestellt ist der höchste gefundene Hit zusammen mit der Datenbanknummer, dem Proteinscore, der molekularen Masse und dem Organismus, aus dem das gefundene Protein stammt. Die übereinstimmenden gefundenen Peptidfragmente sind rot markiert.

Die höchste Übereinstimmung ergab sich für eine Ribitol-2-Dehydrogenase (RDH) aus *Bradyrhizobium* sp. BTAi1. Allerdings betrug der Score lediglich 69, weshalb die Ergebnisse nur bedingt als signifikant gewertet werden können. Die Sequenzabdeckung betrug 29%. Ein Grund für die geringe Übereinstimmung ist die Tatsache, dass nur auf in der Datenbank hinterlegte Sequenzen zurückgegriffen werden kann. Außerdem ist es möglich, dass

⁵ <http://www.matrixscience.com>

aufgrund der starken Quervernetzung nicht alle Peptide aus den Gelstücken extrahiert wurden und daher erst gar nicht für die MALDI-Untersuchung zugänglich waren.

1.5 Isolation genomischer DNA und PCR-Amplifikation des LSDH-Gens

Zur Isolation genomischer DNA aus dem Bodenbakterium K5 wurde zunächst eine Vorkultur beimpft, indem 5 ml L-Sorbitol-Screening-Medium mit 5 µl einer Glycerinkultur einer Reinkultur von K5 versetzt wurde. Die Vorkultur wurde zwei Tage bei 28°C inkubiert. Die Isolation der genomischen DNA erfolgte mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche; siehe II.5.5.3). Die Amplifikation der LSDH aus dem Bodenorganismus K5 erfolgte mit Hilfe der Primer LGDH_f und LGDH_r. Die PCR wurde mit der *FideliTaq* DNA-Polymerase (USB) durchgeführt (siehe II.7). Die anschließende Amplifikationskontrolle (siehe II.6.3) ergab eine spezifische Bande bei etwa 750 kDa. Abbildung III.8 zeigt das Agarose-Gel zur Amplifikationskontrolle des LSDH-Gens aus der genomischen DNA von K5.

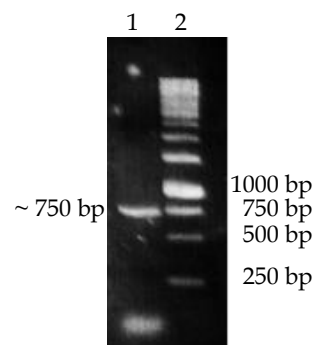


Abbildung III.8: Agarose-Gel zur Amplifikationskontrolle der einer LSDH aus K5. Spur 1: Amplifikat; Spur 2: Marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Fermentas.

1.6 Klonierung und heterologe Expression des LSDH-Gens

Das PCR-Produkt wurde in den Expressionsvektor pET-24a(+) kloniert (siehe II.6.5.2), sequenziert (siehe II.6.6) und in *E. coli* BL21Gold(DE3) exprimiert (siehe II.8.1). Abbildung III.9 zeigt eine SDS-PAGE (siehe II.12) zur Expressionskontrolle der LSDH aus dem Bodenisolat K5. In Abbildung III.9 ist eine deutlich stärkere Überexpression des rekombinanten Proteins als unlösliche *inclusion bodies* zu finden. Ein weitaus geringerer Anteil wird als lösliches Protein im Rohextrakt exprimiert. Im Rohextrakt konnte eine Aktivität von 6,8 U/ml für das Substrat D-Sorbitol (2,2 U/mg) und 0,015 U/ml für das Substrat L-Sorbitol (0,005 U/mg) gemessen werden (vgl. II.14.2).

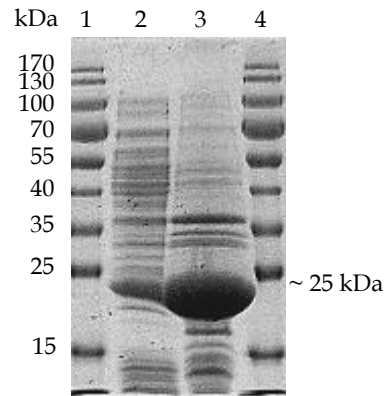


Abbildung III.9: SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der LSDH aus K5. Spuren 1 und 4: Marker *Page Ruler Prestained Protein Ladder*, Fermentas; Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Pelletfraktion.

Abbildung III.10 zeigt die Basen- und die daraus resultierende Aminosäure-Sequenz der LSDH aus K5. Das NAD-Bindemotiv lautet GAASGIG. Das Gen ist 729 bp lang, das resultierende Protein besteht aus 243 Aminosäuren. Ein Monomer hat ein Molekulargewicht von 26,2 kDa.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      5          15          25          35          45
LSDH K5
atggcgagagaatggaaggcaaggttgccgccgtgaccggagccgcgctc
M A R E L E G K V A A V T G A A S

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      55          65          75          85          95
LSDH K5
cggcatcggattggcgagtgccgagggcgatgctggctgcgggcgcgcgcg
G I G L A S A E A M L A A G A R V

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     105          115          125          135          145
LSDH K5
tggatggtgcgatcgcgacgaggtgctgctgaaggcgtctgcaacaag
V M V D R D E A A L K A L C N K

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     155          165          175          185          195
LSDH K5
cacggcgacaccgtgatcccgtggtcgtcgacctgctgatccagaaga
H G D T V I P L V V D L L D P E D

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     205          215          225          235          245
LSDH K5
cttcgcaacgctgttgccgcgctcttgagaaggccggccagctcgaca
F A T L L P R V L E K A G Q L D I

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     255          265          275          285          295
LSDH K5
tcctgcatgcaaacgcaggcacgtatgtcggcgcgatctggctgatgcc
L H A N A G T Y V G G D L V D A

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     305          315          325          335          345
LSDH K5
gacaccatggcgatcgaccgatgctgaacctgaatgtcaacgctcgtgat
D T M A I D R M L N L N V N V V M

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     355          365          375          385          395
LSDH K5
gaaaaacgtgcacgacgtgctaccgcacatgatcgaacgccggaccggcg
K N V H D V L P H M I E R R T G D

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      405      415      425      435      445
LSDH K5  acatcatcgtcagcagttcgctggcggcgcatTTTTccgacgcccgtggag
          I I V T S S L A A H F P T P W E

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      455      465      475      485      495
LSDH K5  ccggtctatgcgtcgtccaaatggcgatcaactgcttcgtccagacggt
          P V Y A S S K W A I N C F V Q T V

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      505      515      525      535      545
LSDH K5  gcggcgccaggcttcaagcatggcattcgcgtgggctcgatctcgcccg
          R R Q V F K H G I R V G S I S P G

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      555      565      575      585      595
LSDH K5  gcccggtcgtcagcgcgtgctcgcggactggccgcccgagaagctgaag
          P V V S A L L A D W P P E K L K

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      605      615      625      635      645
LSDH K5  gaagccagggactcgggaagcctgctggaagccagcgcgtggccgaggt
          E A R D S G S L L E A S D V A E V

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      655      665      675      685      695
LSDH K5  cgtgatgttcatgctgacgcggccgcggcatgaccattcgagacgtgg
          V M F M L T R P R G M T I R D V V

.....|.....|.....|.....|.....|.....
      705      715      725
LSDH K5  tgatgttgccgaccaatttcgatctttag
          M L P T N F D L *

```

Abbildung III.10: Basen- und daraus resultierende Aminosäuresequenz der „LSDH“ aus dem neu isolierten Bodenbakterium K5.

1.7 Optimierung der Anzuchtbedingungen

Zur Optimierung der Anzuchtbedingungen, wurden zunächst drei Vorkulturen beimpft, indem 5 ml Komplexmedium mit Kanamycin mit 5 µl einer entsprechenden Glycerinkultur versetzt wurden und über Nacht bei 37°C auf dem Rundschtüttler inkubiert. Mit diesen Vorkulturen wurden am nächsten Tag drei verschiedene Hauptkulturen beimpft, die für vier Stunden bei 37°C auf dem Rundschtüttler inkubiert wurden. Zur Induktion der Genexpression wurde den Kulturen IPTG zugesetzt. Nach der Induktion wurden die Kulturen bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert (20°C, 28°C, 37°C). Nach weiteren 18 Stunden konnten die Zellen geerntet werden (siehe II.8.1). Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (siehe II.9.1). Zur Expressionskontrolle wurde eine SDS-PAGE (siehe II.12) durchgeführt, deren Ergebnis in Abbildung III.11 dargestellt ist.

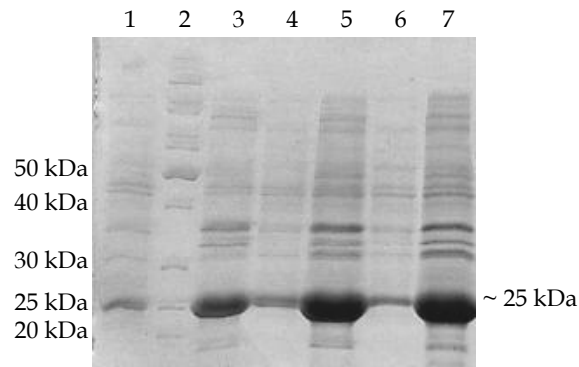


Abbildung III.11: SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der LSDH aus dem Bodenisolat K5. Spur 1: LSDH K5, 20°C, Rohextrakt; Spur 2: Proteinmarker *Unstained Protein Ladder* (Fermentas); Spur 3: LSDH K5, 20°C, Pellet; Spur 4: LSDH K5, 28°C, Rohextrakt; Spur 5: LSDH K5, 28°C, Pellet; Spur 6: LSDH K5, 37°C, Rohextrakt; Spur 7: LSDH K5, 37°C, Pellet.

In Abbildung III.11 ist deutlich ein überexprimiertes Protein einer Größe von etwa 25 kDa zu erkennen. Die Expression ist dabei umso stärker, je höher die Anzuchttemperatur ist. Jedoch wird das Protein in allen drei Fällen fast ausschließlich in Form unlöslicher *inclusion bodies* exprimiert und in der Pelletfraktion als unlösliches Protein abgelegt. Dabei scheint die Menge an löslichem Protein bei einer Anzuchttemperatur von 28°C noch am höchsten zu sein. Die LSDH-Aktivitäten der unterschiedlichen Rohextrakte sind in Tabelle III.3 zusammengefasst.

Tabelle III.3: LSDH-Aktivitäten für D- und L-Sorbitol im Rohextrakt nach Anzucht bei verschiedenen Temperaturen.

	20°C		28°C		37°C	
	Volumen-aktivität [U/ml]	spez. Aktivität [U/mg]	Volumen-aktivität [U/ml]	spez. Aktivität [U/mg]	Volumen-aktivität [U/ml]	spez. Aktivität [U/mg]
D-Sorbitol	2,55	0,7	6,79	2,17	3,64	0,84
L-Sorbitol	0,004	0,001	0,015	0,005	0,015	0,003

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten bestätigt das Ergebnis der SDS-PAGE. Die höchste Aktivität von 2,17 U/mg für D-Sorbitol bzw. 0,005 U/mg für L-sorbitol im Rohextrakt konnte bei 28°C gemessen werden. Bei 20°C wurde eine spezifische Aktivität von 0,7 (D-Sorbitol) bzw. 0,001 (L-Sorbitol) U/mg bestimmt, bei 37°C betrug die spezifische Aktivität 0,84 (D-Sorbitol) bzw. 0,003 (L-Sorbitol) U/mg.

1.8 Coexpression von Chaperonen

Der Ausdruck „Chaperon“ wurde ursprünglich geprägt, um die Funktion von Nucleoplasmin, einem nukleären Protein, das den Chromatin-Assembly durch das

Verhindern unerwünschter Interaktionen zwischen den Histonen und der DNA, zu beschreiben (Laskey et al., 1978). Der Gebrauch des Ausdrucks wurde später verallgemeinert, um funktionell verwandte, aber verschiedenartige Proteine, die bei der Faltung und der Zusammenlagerung von Proteinen assistieren, einzuschließen (Ellis, 1987). Chaperone verhindern falsche Kontakte und unterbinden unerlaubte intermolekulare Wechselwirkungen (Agashe und Hartl, 2000). Prinzipiell sind sie langsame ATPasen (Agashe und Hartl, 2000), die mehr Zeit für die Faltung schaffen. Für die Coexpression von Chaperonen mit der K5-LSDH wurde das Chaperon-Plasmid-Set von Takara verwendet. Zur Verbesserung der Löslichkeit der LSDH aus K5 wurden alle fünf Chaperon-Plasmide getrennt und bei drei verschiedenen Temperaturen (20°C, 28°C, 37°C) coexprimiert (siehe II.8.3).

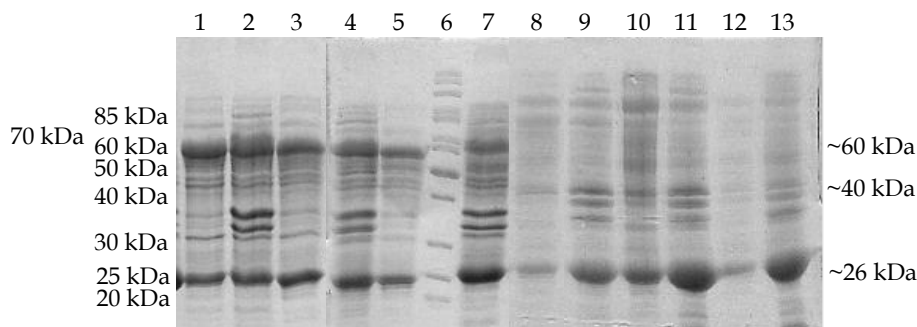


Abbildung III.12: SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der LSDH aus K5 bei Coexpression mit Chaperonen. RE: Rohextrakt; P: Pellet.

- | | |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1: LSDH-K5 + pGro7, 20°C, RE | 7: LSDH-K5 + pGro7, 37°C, P |
| 2: LSDH-K5 + pGro7, 20°C, P | 8: LSDH-K5 + pKJE8, 20°C, RE |
| 3: LSDH-K5 + pGro7, 28°C, RE | 9: LSDH-K5 + pKJE8, 20°C, P |
| 4: LSDH-K5 + pGro7, 28°C, P | 10: LSDH-K5 + pKJE8, 28°C, RE |
| 5: LSDH-K5 + pGro7, 37°C, RE | 11: LSDH-K5 + pKJE8, 28°C, P |
| 6: Marker <i>PageRuler Unstained Protein Ladder</i> ,
Fermentas | 12: LSDH-K5 + pKJE8, 37°C, RE |
| | 13: LSDH-K5 + pKJE8, 37°C, P. |

Durch die Coexpression der Chaperon-Plasmide pGro7 und pKJE8 konnte die Expression als lösliches Protein vor allem bei einer Inkubation bei 28°C nach der Induktion (Spuren 3 und 10) deutlich verbessert werden. Im Vergleich zur Abbildung III.11 ist in Abbildung III.12 deutlich mehr lösliches Protein in den Rohextrakten zu erkennen. Im Falle des Chaperon-Plasmids pGro7 sollten die Chaperone GroEL (60 kDa) und GroES (10 kDa) im Gel zu erkennen sein. In den Spuren 1 bis 6 ist deutlich ein stark überexprimiertes Protein bei etwa 60 kDa zu erkennen. Diese Bande kann dem Chaperon GroEL zugeordnet werden. Die Bande des Chaperons GroES, die bei 10 kDa liegt, hat das Gel wahrscheinlich vollständig passiert und ist hier nicht mehr zu sehen. Wird das Chaperon-Plasmid pG-KJE8 coexprimiert, sollten folgende Chaperone im Gel zu erkennen sein: DnaK (70 kDa), DnaJ (40 kDa), GrpE (22 kDa), GroEL (60 kDa) und GroES (10 kDa). Auch hier ist das 10 kDa-Protein

nicht mehr zu erkennen, jedoch auch für die anderen Chaperone sind entsprechende Banden nur schwer zu erkennen. Da die Zellen aber in Anwesenheit von Chloramphenicol gewachsen sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Chaperon-Plasmide anwesend sind.

Tabelle III.4: Enzymaktivitäten nach der Coexpression der Chaperon-Plasmide pGro7 und pKJE8.

	pGro7		pKJE8	
	Volumen- aktivität [U/ml]	spez. Aktivität [U/mg]	Volumen- aktivität [U/ml]	spez. Aktivität [U/mg]
D-Sorbitol	14,63	2,49	9,35	1,77
L-Sorbitol	0,035	0,006	0,013	0,003

Durch die Coexpression der Chaperon-Plasmide pGro7 und pKJE8 konnte die spezifische Aktivität für L- und D-Sorbitol nur unwesentlich gesteigert werden. Im Vergleich zur Expression bei 28°C ohne Chaperone liegt die spezifische Aktivität bei der Coexpression des Chaperon-Plasmids pGro7 nur 15 % höher (für das Substrat D-Sorbitol).

2. L-Sorbitol-Dehydrogenase (LSDH) aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

Im Jahre 1993 gelang es Mayers-Küntzer, ein Bakterium, das mit L-Sorbitol als alleiniger Kohlenstoffquelle wachsen konnte, aus einer Bodenprobe zu isolieren. Aus diesem Bakterium, welches als *Stenotrophomonas maltophilia* identifiziert wurde, konnte eine Dehydrogenase isoliert werden, die L-Sorbitol als Hauptsubstrat verwendete. Im Zuge der Archivierung in der Stammsammlung der DSMZ verlor dieser Stamm jedoch seine L-Sorbitol-Dehydrogenase-Aktivität. Der N-Terminus der ansequenzierten L-Sorbitol-Dehydrogenase aus *S. maltophilia* wies jedoch eine 85 %ige Übereinstimmung zu einem *open reading frame* im Genom von *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 auf, der als Ribitol-Dehydrogenase ausgewiesen war. Aufgrund des vollständig sequenzierten Genoms von *B. japonicum* USDA110 konnten sehr spezifische Primer abgeleitet werden, mit deren Hilfe das Gen, das mutmaßlich für eine Ribitol-Dehydrogenase kodierte, amplifiziert und kloniert werden konnte. Das heterolog exprimierte Protein konnte schließlich auf L-Sorbitol-Dehydrogenase-Aktivität getestet werden.

2.1 Amplifikation und Klonierung der LSDH aus *B. japonicum* USDA110

2.1.1 Isolation genomischer DNA aus *B. japonicum* und Amplifikation des LSDH-Gens

Zur Isolation der genomischen DNA aus *B. japonicum* wurde zunächst eine Vorkultur beimpft, indem ein gefriergetrocknetes Zellpellet (Bezugsquelle: DSMZ) in 5 ml Bodenextrakt-Medium resuspendiert wurde. Nach zwei Tagen Inkubation bei 28°C auf dem Rundschtüttler hatte sich das Medium deutlich getrübt. Mit dieser Vorkultur wurden nun 25 ml Bodenextrakt-Medium beimpft und erneut zwei Tage bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Parallel dazu wurden Bodenextrakt-Platten und LB-Platten zur Reinheitskontrolle der Kultur mit Hilfe der Dreistrichmethode beimpft und ebenfalls zwei Tage bei 28°C inkubiert. Schließlich konnte mit Hilfe des *High Pure PCR-Template-Preparation-Kits* (Roche; siehe II.5.5.1)) die genomische DNA isoliert werden. Da das Genom von *B. japonicum* vollständig sequenziert wurde (Kaneko et al., 2002), konnten für die Amplifikation des mutmaßlichen Ribitol-Dehydrogenase-Gens sehr spezifische Primer abgeleitet werden. Mit Hilfe der Primer LSDH_*NdeI*_f und LSDH_*BamHI*_r konnte aus der genomischen DNA von *B. japonicum* ein Fragment der richtigen Größe (ca. 730 bp) amplifiziert werden (siehe Abbildung III.13).

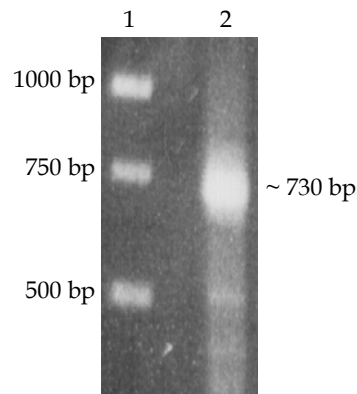


Abbildung III.13: Agarosegel zur Amplifikationskontrolle des LSDH-Gens aus der genomischen DNA von *B. japonicum* USDA110. Spur 1: Marker 1 kb-DNA-Leiter (Fermentas), Spur 2: PCR zur Amplifikation des LSDH-Gens.

Für die Polymerasekettenreaktion wurde die *FideliTaq*TM-DNA-Polymerase (USB Corporation) verwendet (siehe II.7). Die *Annealing*-Temperatur betrug 52,4 °C, die Elongationszeit 60 s. Die Amplifikation wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe II.6.3) überprüft. Das entsprechende Agarosegel ist in Abbildung III.13 dargestellt.

2.1.2 TOPO-TA-Klonierung

Mit Hilfe einer Taq-DNA-Polymerase (Axon) wurden Adenin-Überhänge an das PCR-Produkt angehängt, um es für die TOPO-TA-Klonierung (siehe II.6.5.1) vorzubereiten. Die nach TOPO-TA-Klonierung erhaltenen Kolonien wurden mittels *Colony*-PCR (siehe II.6.5.3) auf das gewünschte LSDH-Insert überprüft. Mit einem ausgewählten Klon wurden schließlich 5 ml Komplexmedium mit Kanamycin beimpft, um die Plasmid-DNA isolieren zu können (siehe II.6.1.1) und zu sequenzieren (siehe II.6.6). Abbildung III.14 zeigt die Basen- und die daraus resultierende Aminosäuresequenz der LSDH aus *B. japonicum* USDA110.

```

...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
   5      15      25      35      45
LSDH B. japonicum atggcgagagaattggaaggcaaggttgccgccgtgaccggagccgcgtc
M A R E L E G K V A A V T G A A S

...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
   55     65     75     85     95
LSDH B. japonicum cggcatcggattggcgagtgccgagggcgatgctggctgcgggcgcgcgcg
G I G L A S A E A M L A A G A R V

...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
  105    115    125    135    145
LSDH B. japonicum tggatgatggatcgatcgcgacgaggctgcgctgaaggcgctctgcaacaag
V M V D R D E A A L K A L C N K

...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
  155    165    175    185    195
LSDH B. japonicum cacggcgacaccgtgatcccgctggctcgctcgacctgctcgatccagaaga
H G D T V I P L V V D L L D P E D

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      205      215      225      235      245
LSDH B. japonicum ctgcgcaacgctgttgccgcgcgctcttggagaaggccggccagctcgaca
      C A T L L P R V L E K A G Q L D I

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      255      265      275      285      295
LSDH B. japonicum tcctgcatgcaaacgcaggcacgtatgtcggcgcgatctggtcgatgcc
      L H A N A G T Y V G G D L V D A

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      305      315      325      335      345
LSDH B. japonicum gacaccatggcgatcgaccggatgctaaacctgaatgtcaacgctcgat
      D T M A I D R M L N L N V N V V M

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      355      365      375      385      395
LSDH B. japonicum gaaaaacgtgcacgacgtgctaccgcacatgatcgaacgccggaccggcg
      K N V H D V L P H M I E R R T G D

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      405      415      425      435      445
LSDH B. japonicum acatcatcgtcacgagttcgtggcgcgcatTTTTccgacgccgtgggag
      I I V T S S L A A H F P T P W E

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      455      465      475      485      495
LSDH B. japonicum ccggtctatgcgctcgccaaatggcgatcaactgcttcgctccagacgggt
      P V Y A S S K W A I N C F V Q T V

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      505      515      525      535      545
LSDH B. japonicum gcggcgccaggcttcaagcatggcattcgcgtgggctcgatctcgcccg
      R R Q V F K H G I R V G S I S P G

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      555      565      575      585      595
LSDH B. japonicum gcccggtcgtcagcgcgctgctcgggactggccgcccagagaagctgaag
      P V V S A L L A D W P P E K L K

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      605      615      625      635      645
LSDH B. japonicum gaagccagggactcgggaagcctgctggaagccagcgacgtggccgagggt
      E A R D S G S L L E A S D V A E V

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      655      665      675      685      695
LSDH B. japonicum cgtgatgttcatgctgacgcggccgcgcgcatgaccattcgagacgtgg
      V M F M L T R P R G M T I R D V V

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      705      715      725
LSDH B. japonicum tgatgttgccgaccaatttcgatcttttag
      M L P T N F D L *

```

Abbildung III.14: Basen- und Aminosäuresequenz der LSDH aus *B. japonicum* USDA 110.

2.1.3 Umklonieren in den Expressionsvektor pET-24a(+) und heterologe Expression der LSDH

Zur heterologen Expression der LSDH aus *B. japonicum* USDA110 musste das Gen in einen geeigneten Expressionsvektor umkloniert werden. Zunächst wurden das TOPO-Plasmid,

das das korrekte LSDH-Insert trägt, und der Expressionvektor pET-24a(+) mit den beiden Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* (Fermentas *FastDigest*), deren Schnittstellen mit Hilfe der verwendeten Primer angefügt wurden, verdaut und gereinigt. Mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase (Fermentas) wurden das Vektor-Fragment und das PCR-Produkt miteinander verbunden (siehe II.6.5.2) und elektrokompente *E. coli* BL21Gold(DE3)-Zellen mit dem rekombinanten Plasmid transformiert (siehe II.6.7). Die erhaltenen Kolonien mittels *Colony-PCR* auf das gewünschte LSDH-Insert überprüft werden (siehe II.6.5.3). Die Anzucht positiver Klone erfolgte wie unter II.8.1 beschrieben. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (siehe II.9.1) und die Aktivität im Rohextrakt bestimmt (siehe II.14.2). Für L-Sorbitol konnte eine spezifische Aktivität von 0,1 U/mg gemessen werden. Zur Expressionskontrolle wurde außerdem eine SDS-PAGE durchgeführt, deren Ergebnis in Abbildung III.15 dargestellt ist.

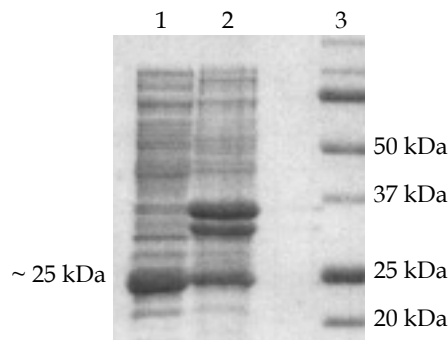


Abbildung III.15: SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der LSDH aus *B. japonicum* in *E. coli*. Spur 1: Rohextrakt, Spur 2: Pellet; Spur 3: Marker *Precision Plus Protein Dual Color Standard*, BioRad.

In Abbildung III.15 ist eine überexprimierte erwarteter Größe bei etwa 25 kDa zu erkennen. Hierbei ist die Expression im Rohextrakt stärker als die Expression in Form unlöslicher *inclusion bodies* im Pellet.

2.2 Amplifikation und Klonierung *his₆*-getaggtter LSDH-Varianten

Zur einfacheren Anreicherung der LSDH aus *B. japonicum* wurden Varianten mit C- oder N-terminalem *His₆*-Tag amplifiziert. Für die PCR-Reaktionen wurden die Primer LSDH_NHis_f und LSDH_NHis_r bzw. LSDH_CHis_f und LSDH_CHis_r verwendet. Mit Hilfe der verwendeten Primer wurden gleichzeitig die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *NdeI* und *BamHI* an die PCR-Produkte angefügt. Die *Annealing*-Temperatur lag bei 66°C, die Elongationszeit betrug 60 s. Als Polymerase wurde die *FideliTaqTM* DNA-Polymerase (USB) verwendet (siehe II.7). Abbildung III.16 zeigt das Agarosegel (siehe II.6.3) zur Amplifikationskontrolle der beiden *His₆*-getaggtten LSDH-Gene.

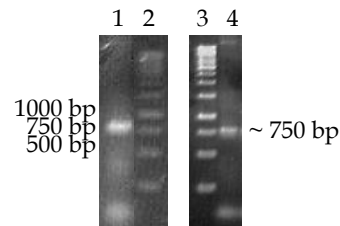


Abbildung III.16: Agarose-Gel zur Amplifikationskontrolle der LSDH mit N-terminalem His₆-Tag (Spur 1) bzw. C-terminalem His₆-Tag (Spur 4); Spuren 2 und 3: Marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder*, Fermentas.

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase in den *E. coli*-Expressionsvektor ligiert (siehe II.6.5.2). Im Anschluss wurden elektrokompente *E. coli* BL21Gold(DE3)-Zellen mit den rekombinanten Plasmiden transformiert (siehe II.6.7).

2.3 Heterologe Expression und Anreicherung der his-getagten LSDH-Varianten

Zur heterologen Expression der LSDH aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA wurde zunächst eine Vorkultur beimpft, indem 5 ml Komplexmedium mit Kanamycin mit 5 µl einer Glycerinkultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes oder mit einer Kolonie von einer Msterplatte beimpft wurden. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C auf dem Rundschtüttler inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag eine 250 ml-Hauptkultur beimpft und erneut für ca. vier Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss konnte die Expression des Fremdgens induziert werden. Nach der Induktion der Expression wurde die Kultur für weitere 18 Stunden bei 28°C auf dem Rundschtüttler inkubiert (vgl. II.8.1). Die Zellernte erfolgte bei 5000 rpm, 4°C für zehn Minuten.

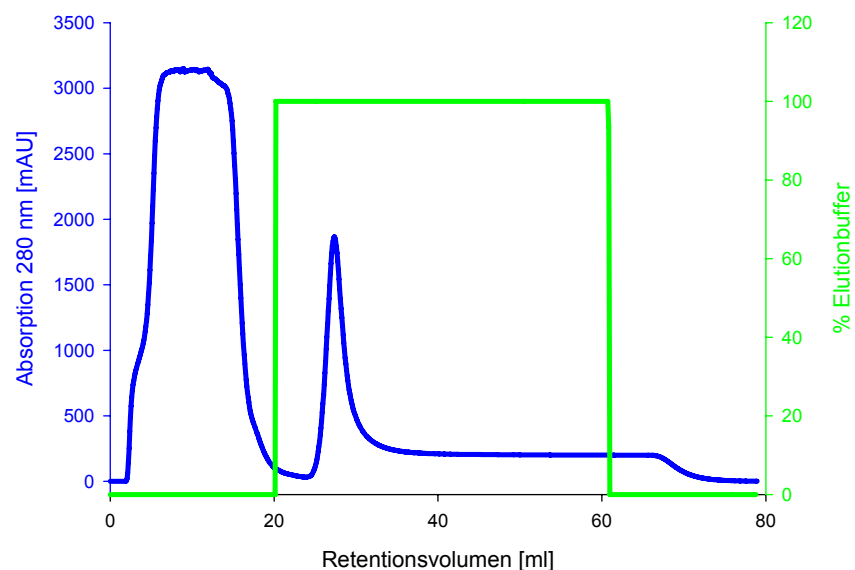


Abbildung III.17: Chromatogramm der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose der LSDH mit N-terminalem His₆-Tag. Blaue Kurve: Absorption bei 280 nm; grüne Kurve: Gradient Elutionspuffer.

Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (siehe II.9.1) und die groben Zelltrümmer anschließend durch Zentrifugation entfernt. Mit dem so erhaltenen Rohextrakt konnte aufgrund der hohen Temperaturstabilität der LSDH (persönliche Mitteilung Harm Otten, *Department fo Chemistry, Group of Leila LoLeggio, Univeristy of Copenhagen*) eine Hitzefällung für eine Stunde bei 55°C durchgeführt werden. Weniger stabile Proteine konnten so ausgefällt und durch Zentrifugation entfernt werden. Die histidin-getaggte LSDH konnte anschließend mittels Affinitätschromatographie an Nickelsepharose angereichert werden (siehe II.10.3). Abbildung III.17 zeigt das Chromatogramm zur Anreicherung der LSDH mit N-terminalem His₆-Tag.

Tabelle III.5: Anreicherungstabelle der N-terminal His₆-getaggtten LSDH. Werte in grün: Substrat D-Sorbitol, Werte in rot: Substrat L-Sorbitol.

	Gesamtaktivität [U]	Gesamtprotein [mg]	spezifische Aktivität [U/mg]	Anreicherung [x-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	4961 4,5	139	35,7 0,03	1	100
Hitzefällung	4852 4,3	85	57,1 0,05	1,6	98
HisTrap	1840 1,6	16	115 0,1	3,2	37

Tabelle III.5 fasst die Enzymaktivitäten der LSDH-Variante mit N-terminalem His₆-Tag nach den einzelnen Anreicherungsschritten zusammen. Eine Enzymvariante mit C-terminalem His₆-Tag zeigte keine Aktivität. Aus einer 250 ml Kultur konnten insgesamt 4961 U für das Substrat D-Sorbitol und 4,5 U für das Substrat L-Sorbitol gewonnen werden. Die Enzymaktivität für das Hauptsubstrat der LSDH D-Sorbitol ist somit mehr als 1000-fach höher als für das Substrat L-Sorbitol. Aufgrund der außergewöhnlichen Hitzestabilität der LSDH konnte durch einen Fällungsschritt bei 55°C für eine Stunde bereits ein Großteil des Gesamtproteins ausgefällt werden, wobei der Verlust an LSDH-Aktivität nur minimal war. Die spezifische Aktivität konnte dabei von 35,7 U/mg auf 57,1 U/mg gesteigert werden. Nach der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (siehe II.10.3) und anschließendem Umpuffern durch Gefiltration (siehe II.11.1) konnten noch insgesamt 1840 U erhalten werden. Die spezifische Aktivität konnte schließlich auf 115 U/mg gesteigert und das Enzym 3,2-fach angereichert werden. Die Ausbeute am Ende der Anreicherung betrug jedoch lediglich 37%.

2.4 Bestimmung des pH-Optimums der LSDH

Zur Bestimmung des pH-Optimums (siehe II.16.5) der LSDH wurden verschiedene Puffer-Systeme verwendet, um einen möglichst großen pH-Bereich abdecken zu können. Es handelt sich dabei um Citrat (pH 3 bis 5), Kaliumphosphat (pH 5,5 bis 7), Tris (pH 7,5 bis 9), Piperazin (pH 9,5 bis 10,5) und Glycin (pH 11 bis 12). Alle Messungen wurden bei 30°C durchgeführt. Um die Ergebnisse statistisch abzusichern, wurden alle Werte doppelt bestimmt.

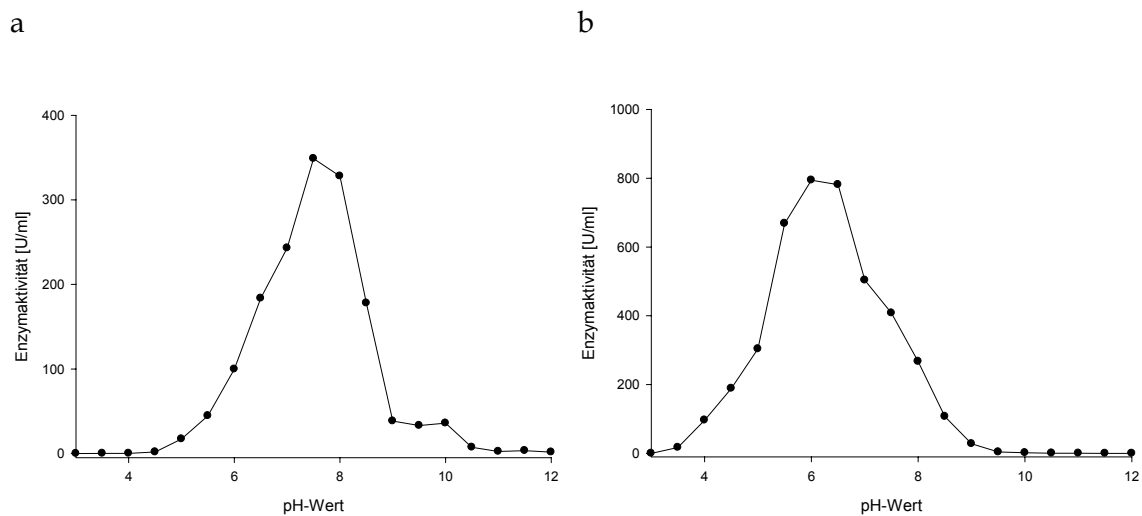


Abbildung III.18: Bestimmung des pH-Optimums der Oxidationsreaktion (a) und der Reduktionsreaktion (b).

Aufgrund der besseren Verwertbarkeit wurde D-Sorbitol für die Oxidationsreaktion und D-Fructose für die Reduktionsreaktion als Substrat verwendet. Abbildung III.18 zeigt die Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom pH-Wert für die Oxidationsreaktion (a) und für die Reduktionsreaktion (b). Die höchste LSDH-Aktivität von 348,8 U/ml für die Oxidationsreaktion konnte bei einem pH-Wert von 7,5 gemessen werden. Die höchste Aktivität während der Reduktionsreaktion (749,2 U/ml) konnte bei einem pH-Wert von 6,0 gemessen werden.

2.5 Bestimmung der maximalen Temperatur der LSDH

Zur Bestimmung der maximalen Temperatur der LSDH (siehe II.16.3) wurde die Enzymlösung 10 Minuten bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und anschließend die Enzymaktivität [U/ml] bestimmt. Der Messpuffer wurde ebenfalls auf die entsprechende Temperatur temperiert. Die Messung erfolgte bei 30°C, als Substrat diente aufgrund der

besseren Verwertbarkeit D-Sorbitol. Abbildung III.19 zeigt die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur.

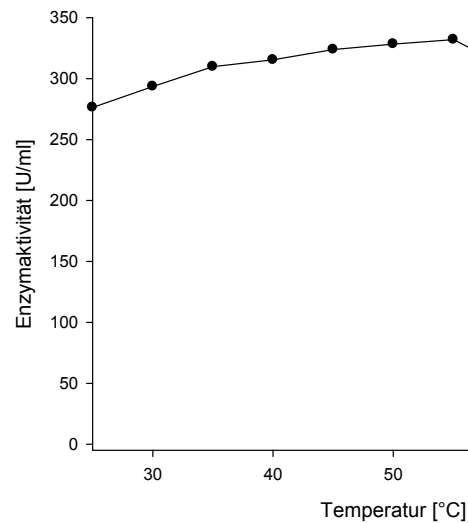


Abbildung III.19: Enzymaktivität der LSDH aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 in Abhängigkeit von der Temperatur.

Aus Abbildung III.19 geht hervor, dass die maximale Temperatur der LSDH bei 55°C liegt. Für die LSDH ergibt sich ein $T_{50/10}$ -Wert von etwa 65°C.

2.6 Bestimmung der Temperaturstabilität der LSDH

Die Aufnahme einer Denaturierungskurve bei 222 nm für das Enzym zeigte einen ungewöhnlich hohen Schmelzpunkt der LSDH, der bei 348 K bzw. 75°C liegt (siehe Abbildung III.20). Aufgetragen werden dabei die Elliptizität, also das Signal des CD-Spektrometers gegen die Temperatur bei einer Wellenlänge von 222 nm (schwarze Kurve). Bei dieser Wellenlänge liegt ein deutliches Signal für ein gefaltetes Protein vor. Die blaue Kurve ist eine zweite Ableitung der schwarzen Kurve. Beim höchsten Peak der blauen Kurve wird der Wendepunkt des Übergangs von gefaltetem zum ungefalteten Zustand festgelegt. Für die LSDH liegt dieser Punkt bei 348 K bzw. bei 75°C. Die Messungen wurden von Harm Otten (*Department of Chemistry, Group of Leila LoLeggio, University of Copenhagen*) durchgeführt.

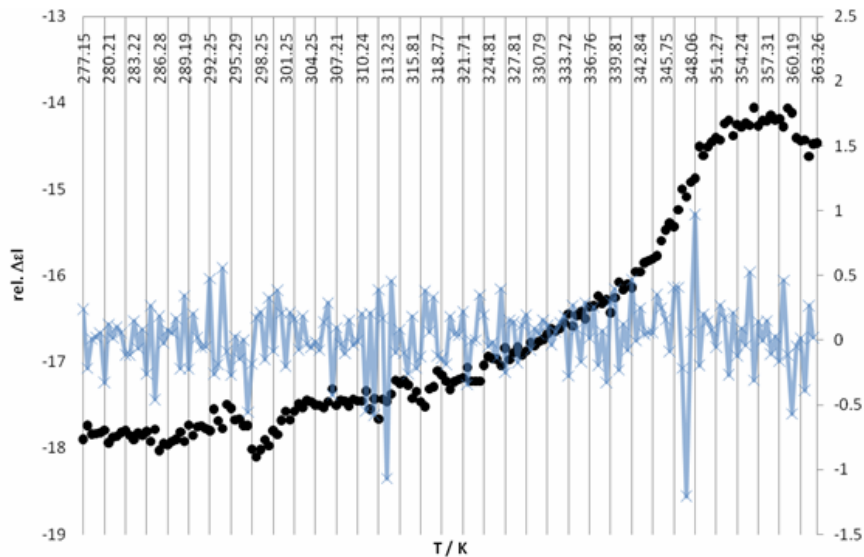


Abbildung III.20: Denaturierungskurve der LSDH bei 222 nm. Gezeigt ist das Signal des CD-Spektrometers bei 222 nm gegen die Temperatur (schwarze Kurve). Die blaue Kurve repräsentiert eine zweite Ableitung der Daten der ersten Kurve. Beim höchsten Peak der blauen Kurve liegt der Übergang zwischen gefaltetem und ungefaltetem Zustand des Proteins. Die Daten wurden von Harm Otten zur Verfügung gestellt.

In Abbildung III.21 ist der Anteil an gefaltetem Protein in Prozent gegen die Temperatur aufgetragen. Zum Vergleich ist in blau die Denaturierungskurve der DSDH aus *Rhodobacter sphaeroides* dargestellt, deren Schmelzpunkt (die Temperatur, bei der 50% des Proteins bereits im ungefalteten Zustand vorliegt) bei etwa 48°C liegt. Für die His₆-getaggte LSDH ergibt sich daraus ein Schmelzpunkt von etwa 65°C, während der Schmelzpunkt der LSDH, bei der der His₆-Tag mit Hilfe der Protease Thrombin abgespalten wurde, bei etwa 70°C liegt.

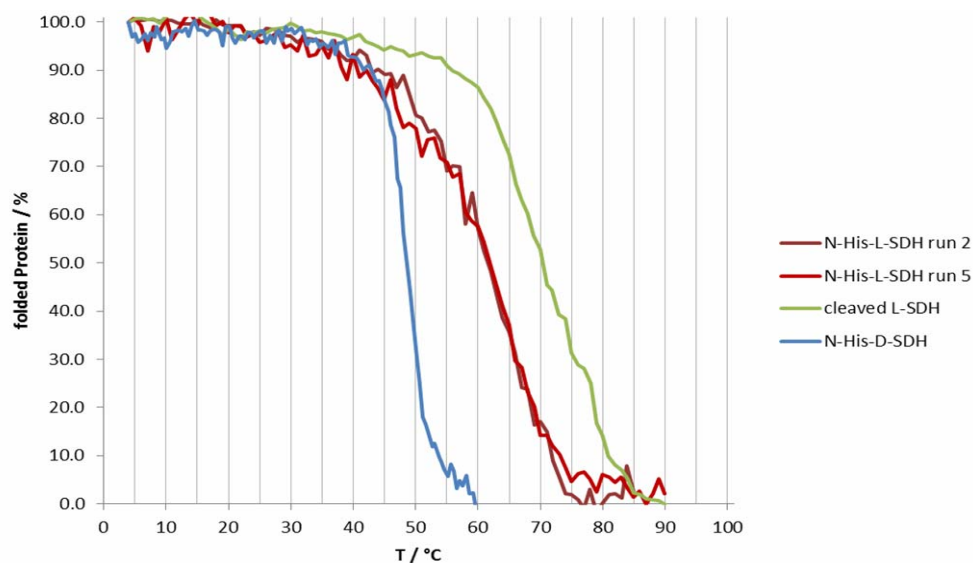


Abbildung III.21: Schmelzkurve der LSDH mit His₆-Tag (rot und dunkelrot), der LSDH mit abgespaltenem His₆-Tag (grün) und der DSDH aus *R. sphaeroides* (blau) zum Vergleich. Das CD-Signal wurde bei 222 nm verfolgt (Jasco J-810 CD-Spektrometer). Der Schmelzpunkt der his-getaggten LSDH liegt bei etwa 65°C. Die Daten wurden von Harm Otten zur Verfügung gestellt.

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität der LSDH (siehe II.16.4) wurde das Enzym über einen Zeitraum von einer Stunde bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Aufgrund der hohen maximalen Temperatur wurden hier nur Temperaturen über 50°C gewählt. Alle zehn Minuten wurden Proben entnommen, denaturiertes Protein wurde abzentrifugiert und die Enzymaktivität im Überstand bestimmt. Abbildung III.22 zeigt den Verlauf der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bei einer bestimmten Temperatur.

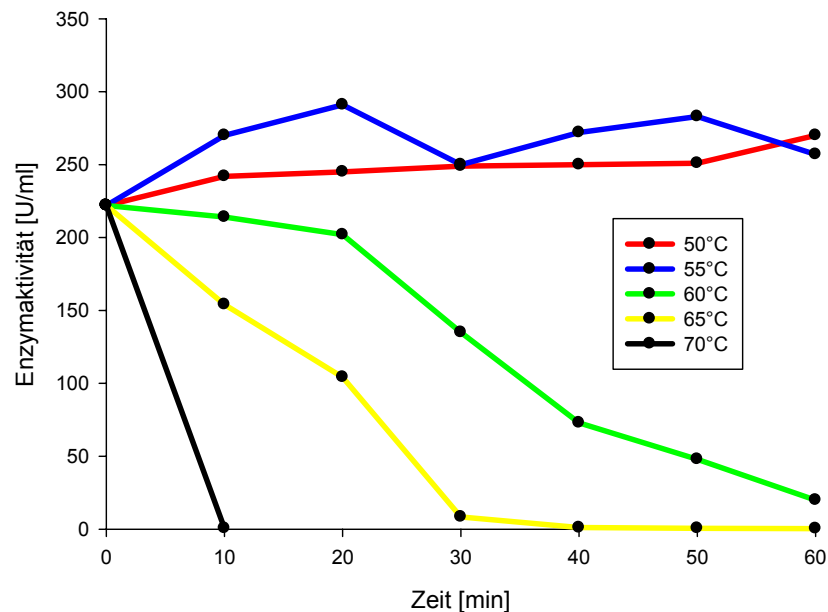


Abbildung III.22: Bestimmung der Temperaturstabilität der LSDH bei 50°C (rot), 55°C (blau), 60°C (grün) und 70°C (gelb). Das Enzym wurde bei den verschiedenen Temperaturen inkubiert, wobei alle zehn Minuten Proben entnommen wurden und die Restaktivität bestimmt wurde.

Bei 50°C und 55°C ist die LSDH über einen Zeitraum von mehr als einer Stunde stabil ohne jeglichen Aktivitätsverlust. Bei 60°C nimmt die Aktivität erst nach 30 Minuten deutlich ab, ist jedoch auch nach 60-minütiger Inkubation noch nicht vollständig verschwunden. Erst bei einer Temperatur von 65°C verliert das Enzym nach 30 Minuten vollständig an Aktivität. Bei 70°C ist das Enzym bereits nach zehn Minuten inaktiviert.

2.7 Sequenz- und Stabilitätsvergleiche mit ähnlichen Dehydrogenasen

Mit den gleichen Primern, die für die Amplifikation der LSDH aus *B. japonicum* verwendet wurden, konnte ein Gen aus der genomischen DNA von *Stenotrophomonas maltophilia* amplifiziert werden. Es hat ebenfalls eine Länge von 729 bp, das resultierende Protein besteht aus 243 Aminosäuren. Auf Basenebene unterscheiden sich die beiden Gene lediglich

an fünf Positionen, die nur an zwei Positionen zu einem Aminosäureaustausch führen (siehe Abb. III.23).

	5 15 25 35 45
LSDH <i>B. japonicum</i>	atggcgagagaattggaaggcaaggttgccgcccgtgaccggagcccgctc
LSDH <i>S. maltophilia</i>	atggcgagagaattggaaggcaaggttgccgcccgtgaccggagcccgctc
	M A R E L E G K V A A V T G A A S

	55 65 75 85 95
LSDH <i>B. japonicum</i>	cgcatcggattggcgagtgccgaggcgatgctggctgccccgccccgctg
LSDH <i>S. maltophilia</i>	cgcatcggattggcgagtgccgaggcgatgctggctgccccgccccgctg
	G I G L A S A E A M L A A G A R V

	105 115 125 135 145
LSDH <i>B. japonicum</i>	tggatggttcgatcgcgacgaggtgctgctgaaggcgctctgcaacaag
LSDH <i>S. maltophilia</i>	tggatggttcgatcgcgacgaggtgctgctgaaggcgctctgcaacaag
	V M V D R D E A A L K A L C N K

	155 165 175 185 195
LSDH <i>B. japonicum</i>	cacggcgacaccgtgatcccgtggtcgctcgacctgctcgatccagaaga
LSDH <i>S. maltophilia</i>	cacggcgacaccgtgatcccgtggtcgctcgacctgctcgatccagaaga
	H G D T V I P L V V D L L D P E D

	205 215 225 235 245
LSDH <i>B. japonicum</i>	ctcgcaacgctgttgccgcccgtcttggagaaggccggccagctcgaca
LSDH <i>S. maltophilia</i>	ctcgcaacgctgttgccgcccgtcttggagaaggccggccagctcgaca
	C A T L L P R V L E K A G Q L D I
	F

	255 265 275 285 295
LSDH <i>B. japonicum</i>	tctgcatgcaaacgcaggcacgtatgtcggcgcgatctggtcgatgcc
LSDH <i>S. maltophilia</i>	tctgcatgcaaacgcaggcacgtatgtcggcgcgatctggtcgatgcc
	L H A N A G T Y V G G D L V D A

	305 315 325 335 345
LSDH <i>B. japonicum</i>	gacaccatggcgatcgaccggatgctaaacctgaatgtcaacgtcgatg
LSDH <i>S. maltophilia</i>	gacaccatggcgatcgaccggatgctaaacctgaatgtcaacgtcgatg
	D T M A I D R M L N L N V N V V M

	355 365 375 385 395
LSDH <i>B. japonicum</i>	gaaaaacgtgcacgacgtgctaccgcacatgatcgaacgccggaccggcg
LSDH <i>S. maltophilia</i>	gaaaaacgtgcacgacgtgctaccgcacatgatcgaacgccggaccggcg
	K N V H D V L P H M I E R R T G D

	405 415 425 435 445
LSDH <i>B. japonicum</i>	acatcatcgtcacgagttcgctggcgccgcatcttccgacgccgtgggag
LSDH <i>S. maltophilia</i>	acatcatcgtcacgagttcgctggcgccgcatcttccgacgccgtgggag
	I I V T S S L A A H F P T P W E

	455 465 475 485 495
LSDH <i>B. japonicum</i>	ccggtctatgcgtcgtccaaatggcgatcaactgcttcgctccagacggt
LSDH <i>S. maltophilia</i>	ccggtctatgcgtcgtccaaatggcgatcaactgcttcgctccagacggt
	P V Y A S S K W A I N C F V Q T V

	505 515 525 535 545
LSDH <i>B. japonicum</i>	gcggcgccaggctcttaagcatggcattcgcgtgggctcgatctcgccc
LSDH <i>S. maltophilia</i>	gcggcgccaggctcttaagcatggcattcgcgtgggctcgatctcgccc
	R R Q V F K H G I R V G S I S P G

	555 565 575 585 595
LSDH <i>B. japonicum</i>	gcccggtcgctcagcgcgctgctcgcggactggccgcccgagaagctgaag
LSDH <i>S. maltophilia</i>	gcccggtcgctcagcgcgctgctcgcggactggccgcccgagaagctgaag
	P V V S A L L A D W P P E K L K

	605 615 625 635 645
LSDH <i>B. japonicum</i>	gaagccagggactcgggaagcctgctggaagccagcgcgctggccgaggt
LSDH <i>S. maltophilia</i>	gaagccagggactcgggaagcctgctggaagccagcgcgctggccgaggt
	E A R D S G S L L E A S D V A E V

	655 665 675 685 695
LSDH <i>B. japonicum</i>	cgtgatgttcacgtgacgcggccgcggcctgaccattcgagacgtgg
LSDH <i>S. maltophilia</i>	cgtgatgttcacgtgacgcggccgcggcctgaccattcgagacgtgg
	V M F M L T R P R G M T I R D V V
	A

	705 715 725
LSDH <i>B. japonicum</i>	tgatggtgcccaccaatttcgatctttag
LSDH <i>S. maltophilia</i>	tgatggtgcccaccaatttcgatctttag
	M L P T N F D L *

Abbildung III.23: Sequenzabgleich der LSDH aus *B. japonicum* und einer LSDH aus *S. maltophilia*. Die beiden Enzyme unterscheiden sich auf Basenebene um 5 Basen, die jedoch lediglich an zwei Positionen zu einem Aminosäureaustausch führen. Grüne Markierung: stille Mutationen; rote Markierung: Basenunterschiede, die zu einem Aminosäureaustausch führen.

Das Enzym aus *S. maltophilia* trägt an Position 68 ein Phenylalanin statt eines Cysteins (C68F) wie bei *B. japonicum* und an Position 228 ein Alanin statt eines Methionins (M228A). Die beiden Enzyme wurden nun hinsichtlich ihrer Temperaturstabilität verglichen, indem der $T_{50/10}$ -Wert bestimmt wurde. Der $T_{50/10}$ -Wert gibt diejenige Temperatur an, bei der nach zehnminütiger Inkubation eine Restaktivität von 50% vorhanden ist. Für die LSDH aus *B. japonicum* ergab sich dabei ein $T_{50/10}$ -Wert von 64,6°C, für die LSDH aus *S. maltophilia* ein Wert von 45,8°C. Da sich die beiden Enzyme nur an zwei Positionen in der Enzym-Primärstruktur unterscheiden, liegt die Vermutung nahe, dass eine der beiden Aminosäuren oder die Kombination beider Mutationen für die Unterschiede in der Enzymstabilität verantwortlich sind. Deshalb wurden zwei Mutanten der LSDH aus *B. japonicum* erzeugt, bei denen jeweils eine der beiden Aminosäuren ausgetauscht sind: C68F und M228A. Diese beiden Mutanten weisen $T_{50/10}$ -Werte auf, die zwischen den Werten der LSDH aus *B. japonicum* und der LSDH aus *S. maltophilia* liegen: 55,3°C (C68F) und 57,4°C (M228A). Eine eindeutige Wertung dieser Ergebnisse ist jedoch erst nach Fertigstellung der Kristallstruktur möglich.

2.8 Bestimmung des Substratspektrums der LSDH

Zur Bestimmung des Substratspektrums der LSDH wurden verschiedene Zuckeralkohole und Alkohole für die Oxidationsreaktion und verschiedene Zucker für die Reduktionsreaktion getestet. Die Aktivitäten können Tabelle III.6 entnommen werden.

Tabelle III.6: Substratspektrum der LSDH in Oxidations- und Reduktionsreaktion.

Oxidation		Reduktion	
Substrat (100 mM)	Aktivität [U/mg]	Substrat (200 mM)	Aktivität [U/mg]
L-Sorbitol	0,1	D-Fructose	49,7
D-Sorbitol	115	L-Sorbose	16,5
Xylitol	1,2	D-Galactose	0,1
<i>meso</i> -Erythritol	-	Raffinose	-
L-Threitol	-	Saccharose	-
D-Arabitol	0,1	Mannose	-
L-Arabitol	1,1	Lactose	-
<i>myo</i> -Inositol	-	Ribose	-
Erythritol	-	Turanose	-
D-Mannitol	5,5	Glucose	-
Ribitol	1,4	Xylose	-
Galactitol	0,1		
Methanol	-		
Ethanol	-		
Isopropanol	-		
Glycerin	-		

D-Sorbitol konnte eindeutig als Hauptsubstrat der Oxidationsreaktion identifiziert werden. Weitere Substrate sind L-Sorbitol, Xylitol, D- und L-Arabitol, D-Mannitol, Ribitol und Galactitol. In der Reduktionsreaktion wurde D-Fructose am besten umgesetzt. Außerdem konnten Aktivitäten für die Substrate L-Sorbose und D-Galactose gemessen werden.

2.9 Native PAGE und Gelfiltration

Zur Bestimmung der nativen Konformation der LSDH wurden zwei verschiedene Methoden gewählt. Zum einen wurde eine native Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt (siehe II.16.6.2), zum anderen diente die Gelfiltration an einer Superdex-200HR-Säule (siehe II.16.6.1) zur Molekulargewichtsbestimmung.

2.9.1 Native PAGE

Bei der nativen PAGE werden die Proteine nicht denaturiert und in ihrem ursprünglichen Zustand gelelektrophoretisch aufgetrennt. Vergleicht man das Molekulargewicht nach der nativen PAGE mit dem Molekulargewicht im denaturierten Zustand, kann gefolgert werden, ob das jeweilige Protein im nativen Zustand als Monomer, Dimer, Trimer oder Tetramer vorliegt. Für die native PAGE wurden 4-20% *Mini-PROTEAN®TGX™ Precast-Gele* der Firma Biorad verwendet. Die Proben wurden mit Solubilisierungspuffer (ohne SDS, ohne β -Mercaptoethanol) versetzt und ohne vorheriges Kochen auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief insgesamt 14 Stunden bei 25 V. Das Ergebnis ist in Abbildung III.24 dargestellt. Bei der nativen PAGE wurden Proteine bekannten Molekulargewichts zusammen mit der LSDH aufgetragen, um mit Hilfe der Rf-Werte eine Eichgerade erstellen zu können.

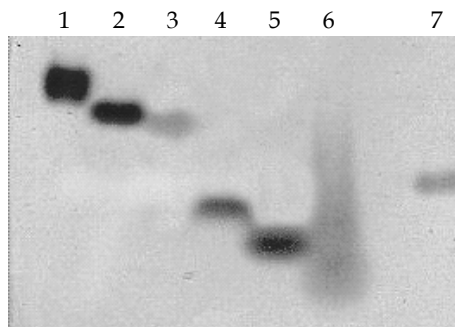


Abbildung III.24: Native PAGE mit Proteinen bekannten Molekulargewichts. Spur 1: Katalase, 240 kDa; Spur 2: Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe, 150 kDa; Spur 3: β -Glucosidase, 135 kDa; Spur 4: Rinderserumalbumin, 67 kDa; Spur 5: Eieralbumin, 45 kDa; Spur 6: β -Lactoglobulin, 36,56 kDa; Spur 7: LSDH.

Die Gesamtlaufstrecke betrug 5,65 cm. Für die einzelnen Proteine und ihren Laufstrecken ergeben sich folgende Rf-Werte:

- Catalase, 240 kDa: 0,124
- Alkohol-Dehydrogenase, 150 kDa: 0,208
- β -Glucosidase, 135 kDa: 0,235
- Rinderserumalbumin, 67 kDa: 0,444
- Eieralbumin, 45 kDa: 0,550
- LSDH: 0,4

Trägt man die Molekulargewichte halblogarithmisch gegen die Rf-Werte der Proteine auf, so erhält man folgende Eichgerade.

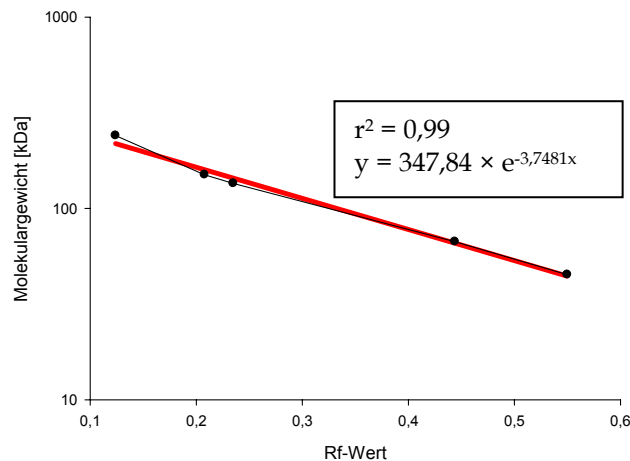


Abbildung III.25: Eichgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts nach nativer PAGE ermittelt aus den Rf-Werten der Eichproteine.

Für das histidin-getaggte Monomer ist ein Molekulargewicht von 27,2 kDa zu erwarten. Folglich hätte ein Dimer ein Molekulargewicht von 52,4 kDa, ein Trimer ein Molekulargewicht von 81,6 kDa und ein Tetramer würde ein Molekulargewicht von etwa 108,8 kDa aufweisen. Für die LSDH ergibt sich aus der nativen PAGE ein Molekulargewicht von 77,7 kDa, was etwa dem dreifachen Molekulargewicht des Monomers entspricht. Die LSDH scheint also als Trimer vorzuliegen.

2.9.2 Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration ist eine annähernde Bestimmung des Molekulargewichts möglich. Tatsächlich wird durch dieses Verfahren jedoch nur der Stoke'sche Radius r_s bestimmt. Um das relativ genaue Molekulargewicht bestimmen zu können, benötigt man außerdem den Sedimentationskoeffizienten $S_{20,W}$ (Siegel und Monty, 1966). Die Eichproteine Katalase (240 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), β -Lactoglobulin (36,56 kDa) und RNaseA (13,7 kDa) wurden in einer Konzentration von 3-5 mg/ml (in Laufpuffer) auf die Säule geladen. Aus den Molekulargewichten der Eichproteine und ihren Retentionsvolumina konnte eine Eichgerade erstellt werden (siehe Abbildung III.26).

Tabelle III.7: Verwendete Eichproteine bekannten Molekulargewichts und deren ermitteltes Retentionsvolumen von der Superdex S200HR-Säule zur Erstellung der Eichgerade.

Eichprotein	Molekulargewicht [kDa]	Retentionsvolumen [ml]
Katalase	240	10,2
Rinderserumalbumin	67	13,2
β -Lactoglobulin	35,56	14,5
RNaseA	13,7	16,5

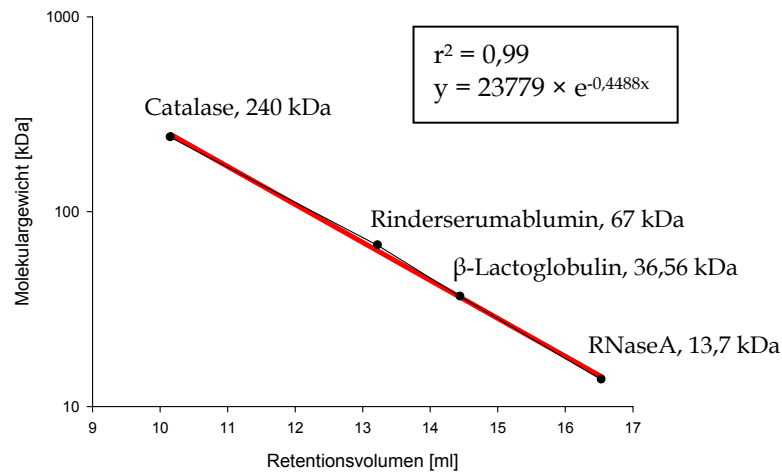


Abbildung III.26: Eichgerade zur Bestimmung des Molekulargewichts mittels Gelfiltration an einer Superdex S200HR-Säule.

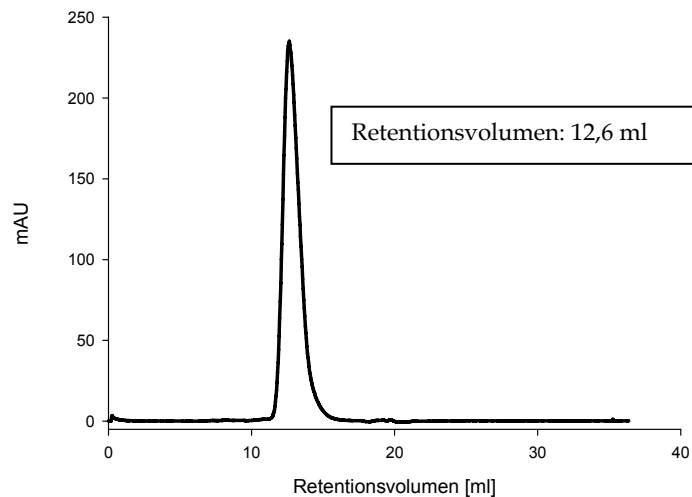


Abbildung III.27: Elutionsdiagramm der LSDH von der Superdex-S200HR-Säule.

Abbildung III.27 zeigt das Chromatogramm der LSDH während der Gelfiltration. Das Retentionsvolumen der LSDH beträgt 12,6 ml. Daraus errechnet sich ein Molekulargewicht von 83,24 kDa, was ebenfalls etwa dem dreifachen Molekulargewicht des Monomers entspricht. Auch mit Hilfe der Gelfiltration zur Größenbestimmung konnte die LSDH als Trimer identifiziert werden.

2.10 Bestimmung der kinetischen Parameter der LSDH

Zur Bestimmung der K_m -Werte verschiedener LSDH-Substrate sowie von NAD^+ und $\text{NADH}+\text{H}^+$, wurde die Enzymaktivität gegenüber verschiedener Substratkonzentrationen ermittelt. Alle Messungen wurden bei 30°C in Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur

Messung wurde das Enzym in zwei verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Die Wechselzahl (*turnover number*) des Enzyms errechnet sich aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (= spezifische Aktivität) v_{\max} [$\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{g}^{-1}$] multipliziert mit dem Molekulargewicht des oligomeren Proteins [g/mol]. Er beschreibt, wie viele Substratmoleküle ein Enzym maximal pro Sekunde umsetzen kann. Der Quotient aus k_{cat} und K_m wird als katalytische Effizienz des Enzyms bezeichnet und dient als Maß für die Substratspezifität. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm *SigmaPlot*.

2.10.1 L-Sorbitol und D-Sorbitol

Zur Bestimmung der K_m -Werte für die beiden Substrate L- und D-Sorbitol wurde das Enzym in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Lineweaver-Burk-Plots zur Bestimmung der K_m -Werte sind in Abbildung III.28 dargestellt.

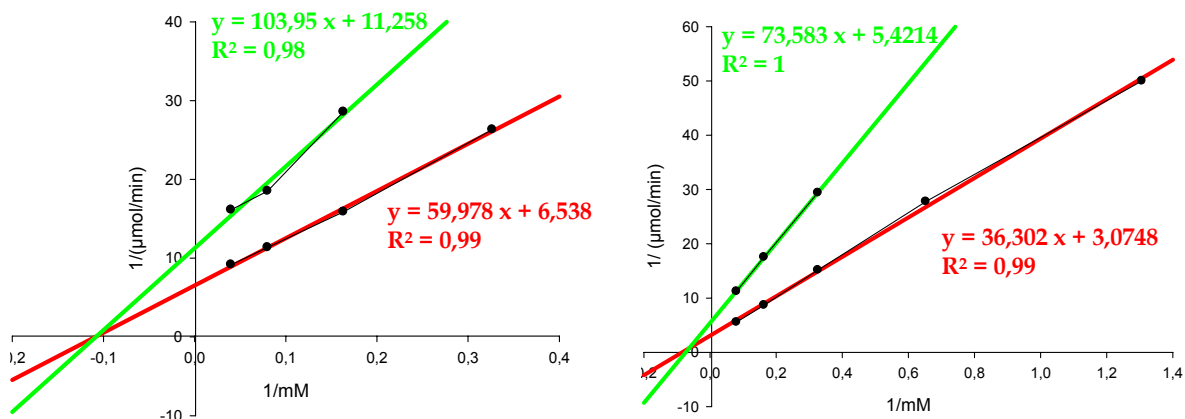


Abbildung III.28: Lineweaver-Burk-Plots zur Bestimmung der K_m -Werte für die Substrate L-Sorbitol (a) und D-Sorbitol (b).

Für die K_m -Wert-Bestimmung von D-Sorbitol wurden 90 mU und 45 mU eingesetzt, für die K_m -Wert-Bestimmung von L-Sorbitol 12 mU und 6 mU eingesetzt. Aus obigen Abbildungen geht für das Substrat L-Sorbitol ein K_m -Wert von 9,2 mM ($\pm 0,03$ mM), für das Substrat D-Sorbitol ein K_m -Wert von 12,7 mM ($\pm 0,88$ mM). Geht man von einem Molekulargewicht der LSDH von 82200 g/mol und einer spezifischen Aktivität der LSDH von 0,027 mol / ($\text{s} \times \text{g}$) für L-Sorbitol und 1,92 mol / ($\text{s} \times \text{g}$) für D-Sorbitol aus, so ergibt sich für die Wechselzahl k_{cat} für das Substrat L-Sorbitol ein Wert von 2219,4 und für das Substrat D-Sorbitol 157824. Für die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m erhält man somit folgende Werte: 241,2 (L-Sorbitol) und 12427 (D-Sorbitol). In Tabelle III.8 sind alle kinetischen Parameter für die Substrate D- und L-Sorbitol zusammengefasst.

2.10.2 D-Fructose

Die Lineweaver-Burk-Plots zur Berechnung des K_m -Werts des Substrats D-Fructose sind in Abbildung III.29 dargestellt. Für die Bestimmung der K_m -Werte wurden 125 mU bzw. 63 mU eingesetzt.

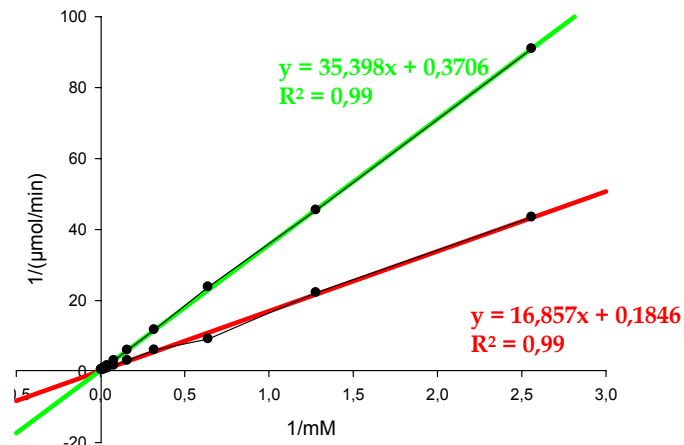


Abbildung III.29: Lineweaver-Burk-Plot zur Bestimmung des K_m -Wertes für das LSDH-Substrat D-Fructose.

Aus Abbildung III.29 ergibt sich für das LSDH-Substrat D-Fructose ein K_m -Wert von 93,4 mM ($\pm 2,1$ mM). Bei einem Molekulargewicht der LSDH von 82200 g/mol und einer spezifischen Aktivität von 5,19 mol / (g \times s) ergibt sich für die Wechselzahl k_{cat} für das Substrat D-Fructose ein Wert von 426618. Für die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m ergibt sich somit ein Wert von 4568. Tabelle III.8 fasst die kinetischen Parameter der LSDH mit zusammen.

2.10.3 NAD⁺ und NADH+H⁺

Die Lineweaver-Burk-Plots zur Bestimmung des K_m -Wertes der LSDH für NAD⁺ und NADH + H⁺ sind in Abbildung III.30 dargestellt.

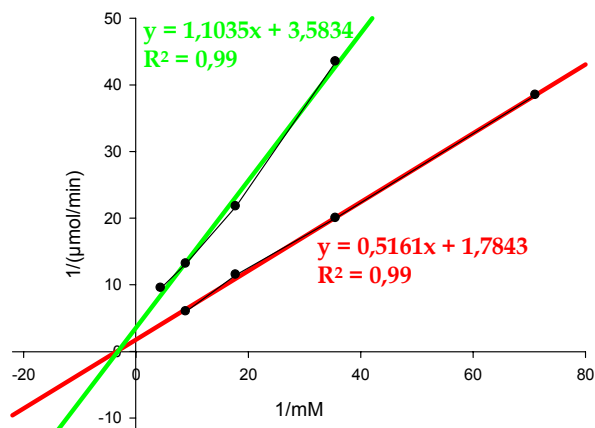
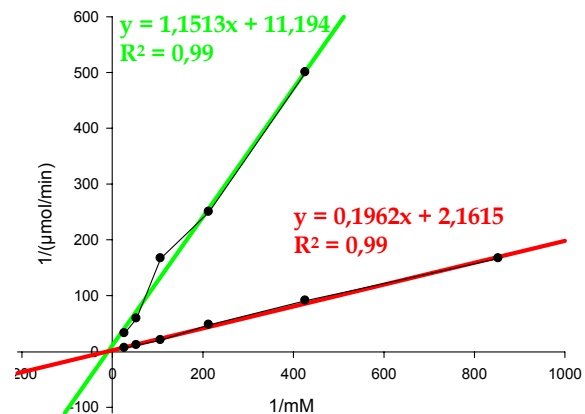
a) NAD⁺b) NADH + H⁺

Abbildung III.30: Lineweaver-Burk-Plot zur Bestimmung des K_m -Wertes der LSDH für NAD⁺ (a) und NADH + H⁺ (b).

Aus den obigen Abbildungen ergibt sich für NAD⁺ ein K_m -Wert von 0,3 mM ($\pm 1 \mu\text{M}$) und für NADH+H⁺ ein K_m -Wert von 0,1 mM ($\pm 6 \mu\text{M}$). Tabelle III.8 fasst alle kinetischen Parameter der LSDH zusammen.

Tabelle III.8: Kinetische Parameter der LSDH.

	K_m [mM]	k_{cat}	k_{cat}/K_m
D-Sorbitol	12,7	157824	12427
L-Sorbitol	9,2	2219	241
D-Fructose	93,4	426618	4568
NAD ⁺	0,3		
NADH+H ⁺	0,1		

2.11 Isoelektrische Fokussierung

Proteine sind amphotere Moleküle. Ihre Nettoladung ist abhängig vom pH-Wert der Umgebung. Der pH-Wert, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist, ist der isoelektrische Punkt (pI). Unterhalb ihres pI sind Proteine positiv geladen, oberhalb ihres pI negativ. Für die isoelektrische Fokussierung (siehe II.16.1) wurden fertige *Servalyt*[®] *Precotes*[®]-Gele (Serva) verwendet. Die Schichtdicke dieser Gele beträgt 150 μm , die Gele sind 125 x 125 mm groß. Der pH-Gradient im Gel reicht von pH 3 bis pH 10. Mit Hilfe des „EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service“ konnte der theoretische pI der LSDH berechnet werden. Er liegt bei einem pH-Wert von 5,23. Abbildung III.31 zeigt nun das Ergebnis der IEF.

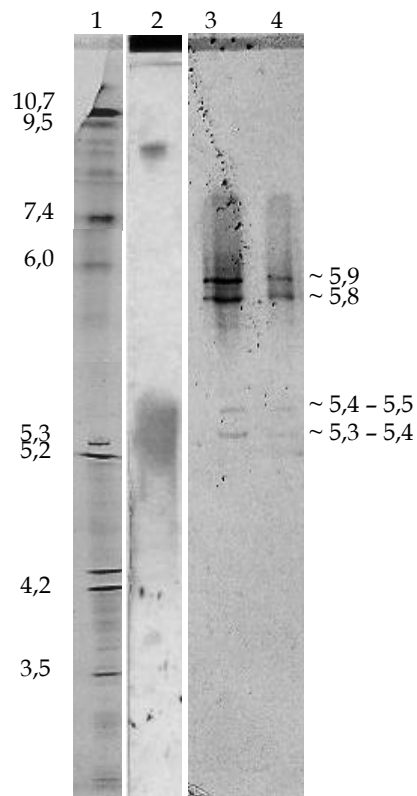


Abbildung III.31: Isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung des pI der LSDH. Spur 1: Marker *IEF Markers 3-10, SERVA Liquid Mix* (Serva); Spur 2: LSDH nach Aktivitätsfärbung; Spuren 3 und 4: LSDH nach Coomassie-Färbung.

In obiger Abbildung sind in den Spuren 2 und 3 verschiedene Banden zu erkennen. Der anhand der Aminosäuresequenz berechnete pI des Enzyms liegt bei einem pH von 5,23. Oberhalb der Markerbanden 5,2 und 5,3 sind zwei schwache Banden zu erkennen, die diesem pI am nächsten kommen. Allerdings sind bei einem pH von 5,8 bzw. 5,9 zwei weitere Banden im Gel zu erkennen, die deutlich stärker sind als die beiden Banden oberhalb von einem pH-Wert von 5,3. Da die IEF unter nativen Bedingungen durchgeführt wird, kann nach der Elektrophorese eine Aktivitätsfärbung durchgeführt werden. Dabei wird das Gel in einer Mischung aus Puffer, Substrat, NAD^+ , PMS und NBT inkubiert. In Anwesenheit von $\text{NADH} + \text{H}^+$, welches im Verlauf der Reaktion entsteht, reagieren PMS und NBT unter Bildung eines bläulich-lila gefärbten Formazan, das im Gel sichtbar wird. Die Formazan-Bande liegt bei den beiden Banden, die oberhalb eines pH-Werts von 5,3 lokalisiert sind.

2.12 Biokonversionen

Bei der Oxidation von L-Sorbitol mit Hilfe einer Dehydrogenase sind zwei Produkte denkbar: D-Fructose oder D-Sorbose. Die Biokonversionen mit enzymatischer Cofaktor-Regenerierung mit Hilfe der Lactat-Dehydrogenase, die Pyruvat zu Lactat reduziert und

gleichzeitig $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert, wurden mit den Substraten D- und L-Sorbitol durchgeführt.

2.12.1 Bestimmung der Retentionszeiten der Standardsubstanzen mittels HPLC

Die Biokonversionen mit der LSDH (siehe II.15.2) enthielten Pyruvat im Überschuss als Substrat der Lactat-Dehydrogenase, L-Sorbitol bzw. D-Sorbitol als Substrat der LSDH für den Umsatz, NAD^+ als Cofaktor und die Enzyme Lactat-Dehydrogenase und LSDH. Als Produkte sind $\text{NADH} + \text{H}^+$, Lactat, D-Sorbose bzw. D-Fructose zu erwarten. Mit Hilfe der HPLC (siehe II.15.2) an einer Ca^{2+} -Säule wurden die Retentionszeiten der verschiedenen Substanzen ermittelt. Sie sind in Tabelle III.9 zusammengefasst. Mit Hilfe der verwendeten Säule ist es nicht möglich Enantiomere zu trennen, weshalb D- und L-Sorbitol die gleiche Retentionszeit besitzen.

Tabelle III.9: Die in den Umsätzen verwendeten Substanzen und ihre Retentionszeiten.

Substanz	Retentionszeit [min]
Pyruvat	10,9
Lactat	13,6
NAD^+	9,3
$\text{NADH} + \text{H}^+$	11,7
Sorbitol	29,9
Sorbose	18,5
Fructose	16,0

2.12.2 Biokonversion mit L-Sorbitol und Produktbestimmung durch HPLC

Für einen Umsatz mit L-Sorbitol wurden alle Komponenten gemischt und bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren inkubiert (siehe II.15.1). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels HPLC untersucht (siehe II.15.2). Abbildung III.32 zeigt das Chromatogramm beim Start der Reaktion und nach Beendigung des Umsatzes.

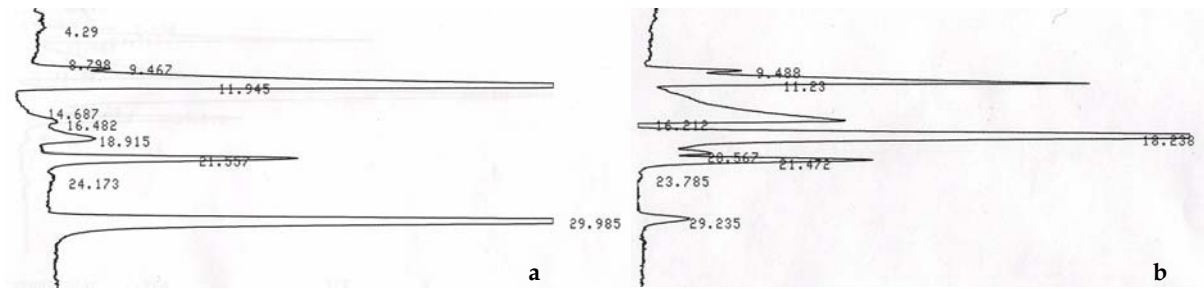


Abbildung III.32: Chromatogramm der HPLC zur Produktbestimmung nach einem Umsatz der LSDH mit dem Substrat L-Sorbitol. a) Start der Reaktion; b) nach 25 Stunden.

Zu Beginn der Reaktion ist deutlich ein Peak bei 29,9 Minuten zu sehen, der im Verlauf der Reaktion abnimmt. Anhand der Retentionszeit kann dieser Peak dem Substrat L-Sorbitol zugeordnet werden. Bei einem Umsatz der LSDH mit L-Sorbitol kann nur eine Substanz nach 16 Minuten detektiert werden. Mit fortschreitender Reaktion nimmt dieser Peak zu. Dieser Peak kann dem Reaktionsprodukt D-Sorbose zugeordnet werden. Bei einer Retentionszeit von 16 Minuten, wo D-Fructose eluiert wird, ist kein Peak zu erkennen. Abbildung III.33 zeigt die Konzentrationsabnahme des Substrats L-Sorbitol bzw. die Konzentrationszunahme des Produkts D-Sorbose in Abhängigkeit von der Zeit.

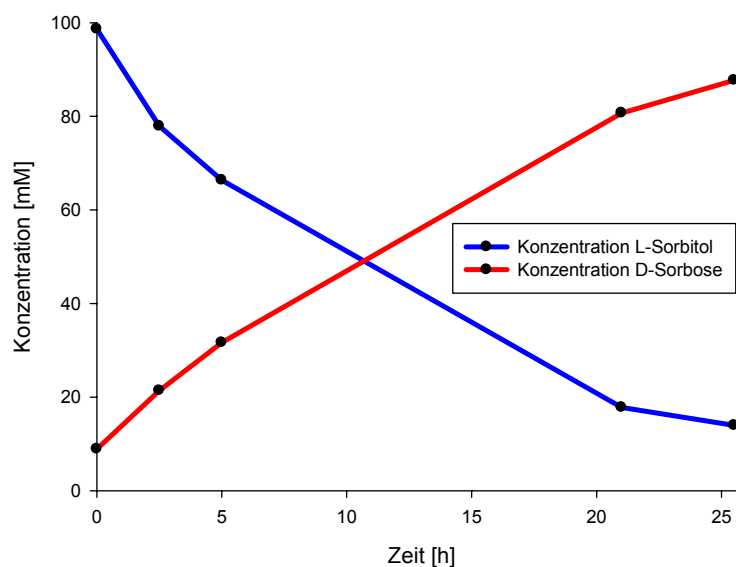


Abbildung III.33: Konzentrationsabnahme des Substrates (blaue Kurve) bzw. Konzentrationszunahme des Produkts (rote Kurve) bei einem Umsatz der LSDH mit L-Sorbitol und enzymatischer Cofaktor-Regenerierung mit Hilfe der Lactat-Dehydrogenase.

Ein Umsatz mit L-Sorbitol zur Herstellung von D-Sorbose benötigt mit der verwendeten Enzymmenge (180 U) etwa 26 Stunden.

2.12.3 Biokonversion mit D-Sorbitol und Produktbestimmung mit HPLC

Auch der Umsatz mit D-Sorbitol wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Stündlich wurden Proben entnommen und mittels HPLC untersucht. Abbildung III.34 zeigt das Chromatogramm beim Start der Reaktion und nach Beendigung des Umsatzes.

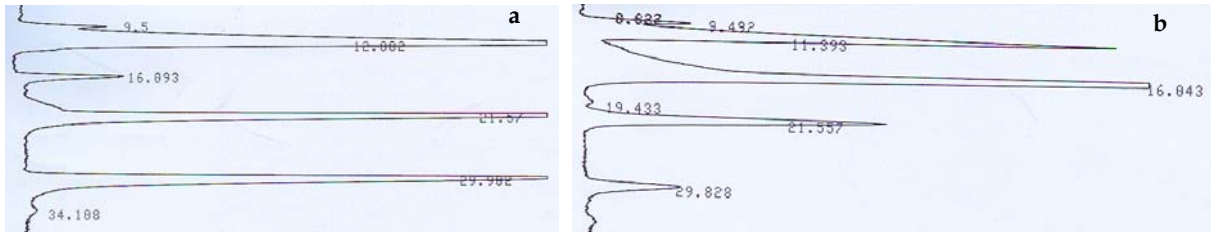


Abbildung III.34: Chromatogramm der HPLC zur Produktbestimmung nach einem Umsatz der LSDH mit dem Substrat D-Sorbitol. a) Start der Reaktion; b) nach 6 Stunden.

Auch hier ist der Sorbitol-Peak bei 29,9 Minuten deutlich zu erkennen, der mit fortschreitender Reaktion abnimmt. Bei dieser Reaktion ist kein Peak bei 16 Minuten zu erkennen. Bei einem Umsatz mit dem Substrat D-Sorbitol entsteht also keine Sorbose. Im Chromatogramm ist ein Peak bei 18,9 bzw. 18,2 Minuten zu erkennen. Dieser Peak kann dem Produkt Fructose zugeordnet werden. Abbildung III.35 zeigt die Konzentrationsabnahme des Substrats D-Sorbitol bzw. die Konzentrationszunahme des Produkts D-Fructose in Abhängigkeit von der Zeit.

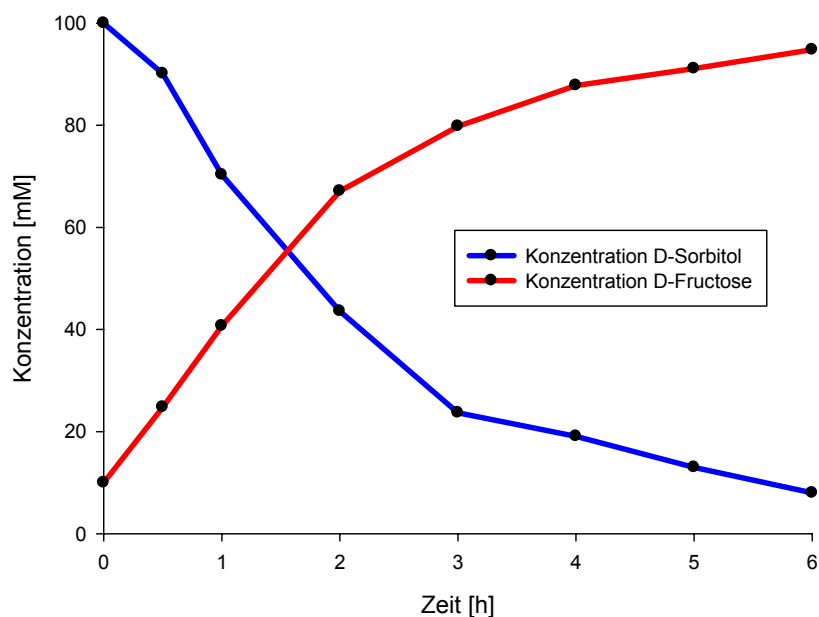


Abbildung III.35: Konzentrationsabnahme des Substrates (blaue Kurve) bzw. Konzentrationszunahme des Produkts (rote Kurve) bei einem Umsatz der LSDH mit D-Sorbitol und enzymatischer Cofaktor-Regenerierung mit Hilfe der Lactat-Dehydrogenase.

Nach 6 Stunden ist der Umsatz nahezu beendet. Somit läuft ein Umsatz mit dem Substrat D-Sorbitol viermal schneller als ein Umsatz mit dem Substrat L-Sorbitol.

2.13 Konstruktion von Cystein-getaggtten Varianten für elektrochemische Anwendungen

Zur Anwendung der LSDH in einem enzymatischen Bioreaktor mit elektrochemischer Cofaktor-Regenerierung bzw. zur Immobilisierung auf Goldelektroden wurden Cystein-getaggte Varianten der LSDH nach dem Prinzip der *QuikChange*TM-Methode (siehe II.7.1.1) erzeugt. Die Biofunktionalisierung von Metalloberflächen kommt häufig im Bereich der analytischen und klinischen Diagnostik (Portaccio et al., 2007) und bei der Herstellung biologischer Brennstoffzellen (Heller, 2006) zur Anwendung. Außerdem sind elektroenzymatische Reaktionen für die pharmazeutische Industrie und die Synthese enantiomerenreiner Feinchemikalien interessant (Tienhaara und Meany, 1973). Die Reinigungsschritte des Reaktionsproduktes können reduziert werden, wenn alle für die Reaktion benötigten Komponenten auf der Elektrodenoberfläche immobilisiert sind und folglich nur das Substrat und das Produkt in Lösung sind. Zur Immobilisierung der Biokatalysatoren an der Elektrode, wird die Metalloberfläche üblicherweise zuvor mit einem sogenannten *self-assembled-monolayer* (SAM) modifiziert (Stoica et al., 2006). Es besteht außerdem die Möglichkeit, den Cofaktor und den Biokatalysator über ein Netz aus Glutardialdehyd und damit quervernetztem Rinderserumalbumin an einer Elektrode zu fixieren. Die beiden Aldehydgruppen des Glutardialdehyds werden durch Ausbildung einer Iminbindung mit den Aminogruppen des Enzyms kovalent verknüpft (Miao et al., 2001). BSA wird dabei im Überschuss zugegeben, um eine Strukturveränderung und damit einhergehende Inaktivierung des Enzyms zu verhindern. Dieses System wurde bereits erfolgreich für die D-Sorbitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* angewandt (Gajdzik et al., 2007); die Galaktitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* jedoch wurde bereits bei geringen Glutardialdehyd-Konzentrationen inaktiviert (Kornberger, 2009).

Um auf solche Vernetzungssysteme oder Linkermoleküle verzichten zu können, können die Biokatalysatoren direkt an die Goldelektrode immobilisiert werden. 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). In der Literatur wurden Cystein-modifizierte Goldelektroden als SAM beschrieben (Meng et al., 2001; Wu et al., 1999), die eine stabile Bindung zwischen der Thiolgruppe der Cysteine und der Goldoberfläche zeigten. Um die Enzymaktivität nicht zu

beeinträchtigen, wurden die Cystein-Tags vor dem N-terminalen His-Tag plziert (siehe Abbildung III.36).



Abbildung III.36: Platzierung des Cystein-Tags vor dem His₆-Tag im LSDH-Plasmid.

Abbildung III.37 zeigt beispielhaft das Chromatogramm der Anreicherung der LSDH-Cys-Variante. Die Anreicherung erfolgte hier ebenfalls durch Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (siehe II.10.3).

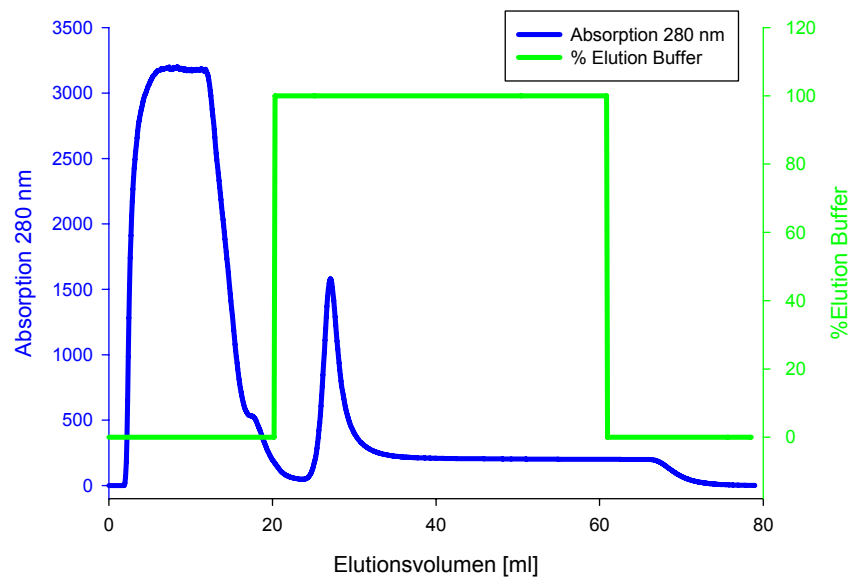


Abbildung III.37: Chromatogramm der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose zur Anreicherung der LSDH-Variante mit einfachem Cystein-Tag.

Die Tabellen III.10 und III.11 fassen die Enzymaktivitäten nach den verschiedenen Anreicherungsschritten zusammen. Die Aktivitäten sind hier aufgrund der besseren Substrateigenschaften für D-Sorbitol angegeben.

Tabelle III.10: Anreicherungstabelle der LSDH mit einfachem Cystein-Tag (LSDH-Cys).

	Gesamt-aktivität [U]	Gesamt-protein [mg]	spezifische Aktivität [U/mg]	Anreicherung [x-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	6914	85	81,3	1	100
Hitzefällung	6777	61	111,1	1,4	98
HisTrap	3889				56
Umpufferung	3229	16	201,8	2,5	47

Tabelle III.11: Anreicherungstabelle der LSDH mit zweifachem Cystein-Tag (LSDH-2Cys).

	Gesamt-aktivität [U]	Gesamt-protein [mg]	spezifische Aktivität [U/mg]	Anreicherung [x-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	5918	60	98,6	1	100
Hitzefällung	5707	47	121,4	1,2	96
HisTrap	2934				50
Umpufferung	1510	11	137,3	1,4	26

Im Falle der LSDH-Cys konnten aus insgesamt 250 ml Kulturvolumen 6914 Units gewonnen werden. Die spezifische Aktivität betrug 81,3 U/mg. Durch eine Hitzefällung für eine Stunde bei 50°C konnte die spezifische Aktivität auf 111,1 U/mg bei nur minimalem Aktivitätsverlust gesteigert werden. Nach HisTrap und Umpufferung konnten 3224 Units erhalten werden, was einer Ausbeute von 47% entspricht. Die spezifische Aktivität betrug 201,8 U/mg und ist damit etwas höher als bei der N-terminal His₆-getaggten Variante der LSDH. Das Enzym wurde 2,5-fach angereichert.

Für die LSDH-2Cys betrug die Gesamtaktivität, die aus 250 ml Kultur gewonnen wurden 5918 Units. Die spezifische Aktivität lag bei 98,6 U/mg. Auch hier konnte die spezifische Aktivität durch die Hitzefällung bei sehr geringem Aktivitätsverlust auf 121,4 U/mg gesteigert werden. Nach zwei weiteren Anreicherungsschritten betrug die Ausbeute hier jedoch lediglich 26%. Die spezifische Aktivität liegt mit 137,3 U/mg etwas niedriger als bei der LSDH-Variante mit einfachem Cystein-Tag.

2.14 Konstruktion einer Variante mit Proteaseschnittstelle und Abspaltung des His₆-Tags

Um den His₆-Tag für eine einfachere Kristallisation der LSDH bei gleichzeitiger effizienter und einfacher Anreicherung abspalten zu können, musste eine Protease-Schnittstelle zwischen das LSDH-Gen und den N-terminalen His₆-Tag eingefügt werden (siehe II.13.1). Als Protease wurden Thrombin ausgewählt, da hierfür keine weiteren Schnittstellen im LSDH-Protein vorkommen. Thrombin ist eine Serinprotease. Die Erkennungssequenz lautet: Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser. Die Spaltung erfolgt dann hinter Arginin bzw. Lysin. Die Enzymaktivitäten der LSDH-Variante mit Protease-Schnittstelle sind mit der Variante LSDH-NHis vergleichbar, weshalb hier auf die Anführung einer Anreicherungstabelle verzichtet wurde.

Die Abspaltung des His₆-Tags erfolgte mit Hilfe des *Thrombin CleanCleave*TM-Kits von Sigma-Aldrich (siehe II.13.2). Das zu spaltende Protein wurde zusammen mit der Protease über einen Zeitraum von 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach verschiedenen

Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Die Spaltung konnte im SDS-Gel überprüft werden (siehe Abbildung III.38).

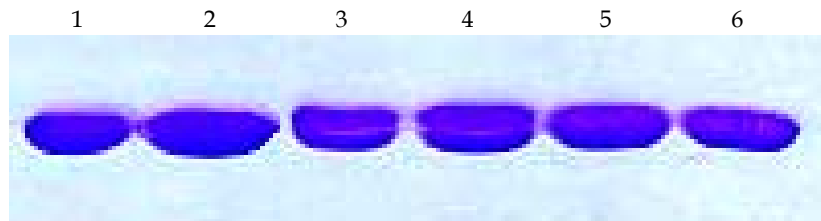


Abbildung III.38: SDS-PAGE zur Kontrolle der His-Tag-Absplattung der LSDH. Spur 1: vor Zugabe der Protease; Spur 2: nach zwei Stunden; Spur 3: nach vier Stunden; Spur 4: nach sechs Stunden; Spur 5: nach 24 Stunden; Spur 6: nach 48 Stunden.

In obiger Abbildung sind in den Spuren 3 und 4 zwei verschiedene Banden, die direkt übereinander liegen, zu erkennen. Da sich die Proteine (LSDH mit und ohne His-Tag) nur um etwa 2 kDa voneinander unterscheiden, liegen die Banden sehr nahe beieinander. Nach 48 Stunden (Spur 6) ist die Spaltung deutlich vorangeschritten und nahezu abgeschlossen. Um eine Kreuzaktivität zu verhindern, wurde die Spaltung hier abgebrochen. Die Protease, die an Agarose-Kügelchen immobilisiert ist, kann durch Zentrifugation entfernt werden. Ein weiterer Anreicherungsschritt ist nicht notwendig. Das Protein ohne His-Tag kann direkt für weitere Versuche verwendet werden. Die Experimente zur Kristallisation der LSDH wurden von Harm Otten (*Department of Chemistry, Group of Leila LoLeggio, University of Copenhagen*) durchgeführt. Abbildung III.39 zeigt die erhaltenen Kristalle.

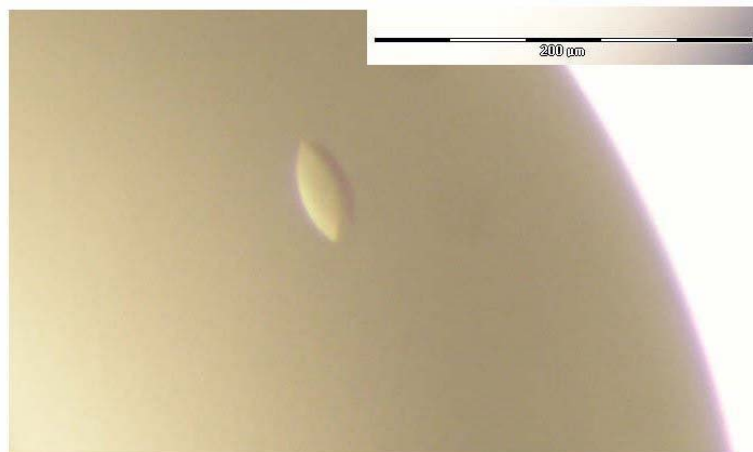


Abbildung III.39: Proteinkristall LSDH. Das Bild wurden von Harm Otten zur Verfügung gestellt.

Anhand der Kristalle konnte die Quartärstruktur der LSDH ermittelt werden. Die Daten sprechen jedoch im Gegensatz zu den biochemischen Daten für ein Tetramer.

2.15 LSDH-Aktivitätsnachweis durch Cyclovoltammetrie

Mit Hilfe der Cyclovoltammetrie (CV) ist es möglich, thermodynamische und kinetische Parameter von heterogenen Elektronentransfer-Reaktionen zu messen (Schröder, 2003). Auch katalytische Reaktionen von enzymatischen Umsätzen können so durch CV beobachtet werden (Antiochia et al., 2001). An einer sogenannten Drei-Elektrodenanordnung, die aus einer Arbeitselektrode (AE) mit einer definierten Oberfläche (z.B. Gold), einer Gegenelektrode (G) und einer Bezugselektrode (R) besteht, wird die CV-Messung durchgeführt. Ausgehend von einem Anfangspotential E_i wird an die Arbeitselektrode ein sich zeitlich linear änderndes Potential $E(t)$ angelegt, das nach Erreichen des Umkehrpotentials $E(\lambda)$ mit gleicher Vorschubgeschwindigkeit (ca. 1 mV/s bis zu mehreren 10 kV/s) zum Ausgangspotential zurückgeführt wird (Schröder, 2003). Neben einer elektrochemischen Zelle umfasst der Aufbau einer solchen Messung einen Potentiostat und einen Funktionsgenerator, der die Dreiecksspannung der zeitlichen Potentialänderung der Arbeitselektrode vorgibt (Kornberger, 2009).

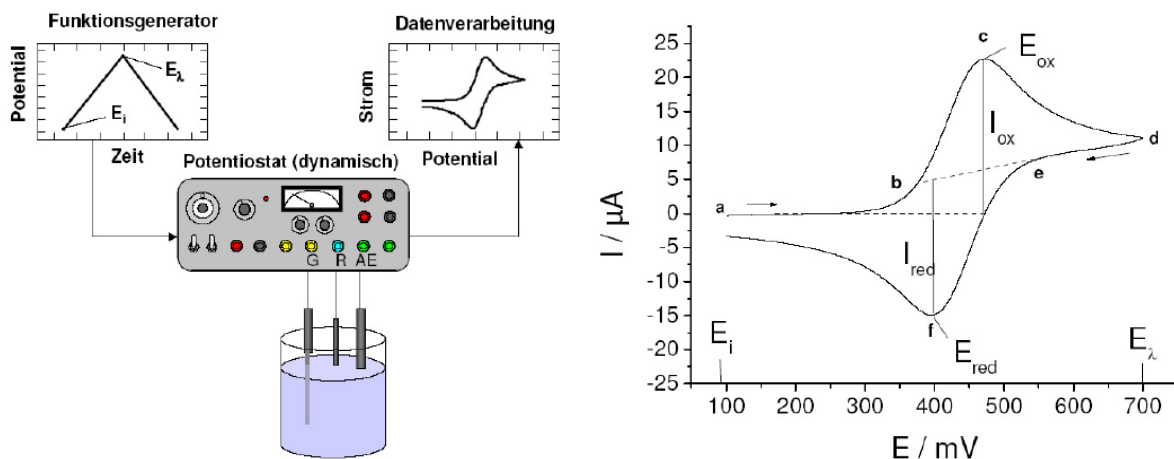


Abbildung III.40: a) Apparativer Aufbau für cyclovoltammetrische Messungen (Schröder, 2003); b) Allgemeiner Aufbau eines Cyclovoltammogramms (Schröder, 2003) für ein reversibles Redoxpaar, bei dem nur ein Elektron übertragen wird. Dabei wird die Stromstärke in Abhängigkeit vom angelegten Potential untersucht (Gajdzik, 2007). Sobald das Potential zur Oxidation eines Substrates ausreicht, steigt der Strom an, bis nach dem Erreichen eines anodischen Peakmaximums (E_{ox}) des oxidierten Substrates an der Elektrodenoberfläche wieder abnimmt. Mit sinkender Konzentration fällt der Strom wieder ab und die Polarisierung der Arbeitselektrode kehrt sich um. Nun folgt die Reduktion des Substrates, was sich in einer abnehmenden Stromstärke bis zu einem negativen kathodischen Peak bei 400 nm (E_{red}) zeigt.

Die Herstellung makroporöser Goldelektroden erfolgte durch Elektrodeposition von Gold in den Zwischenräumen eines Pseudokristalls aus Silica-Kügelchen gefolgt vom Auflösen des Silica-Templates. Um sukzessiv Schichten monodisperser Kügelchen auf gold-beschichtete Glas-Trägermaterialien zu transferieren wurde die Langmuir-Blodgett-Technik verwendet. Zur Herstellung einer hydrophilen Oberfläche, wurden die Glas-Trägermaterialien vorher

mit Cysteamin behandelt. Die Gold-Deposition wurde bei $-0,66$ V gegen gesättigte Ag/AgCl nach Eintauchen für zehn Minuten in ein Gold-Beschichtungs-Bad durchgeführt, um die Lösung ins Template einfließen zu lassen. Nach der Deposition werden die Proben mit destilliertem Wasser gespült und für zehn Minuten in 5% Flusssäure inkubiert, um das kolloidale Silica-Quarz zu entfernen (persönliche Mitteilung, Yémima Bon-Saint-Côme (*Institut des Sciences Moléculaires, Groupe NanoSystèmes Analytiques de Alexander Kuhn, Université de Bordeaux*), Veröffentlichung eingereicht). Abbildung III.41 zeigt die fertige makroporöse Gold-Elektrode.

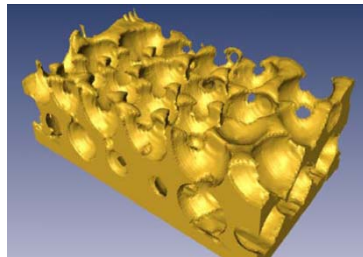


Abbildung III.41: Makroporöse Goldelektrode.

Für die Herstellung des Sol-Gel-Films wurde zunächst ein Starter-Silica-Sol hergestellt, indem 2,125 g TEOS, 2 ml Wasser und 2,5 ml HCl (0,01 M) für zwölf Stunden auf einem Magnetrührer vermischt wurden. Die so erhaltene Lösung wurde dreimal mit Wasser verdünnt (Sol I). Die NAD-GPS-Lösung wurde durch Mischen von 25 mg NAD⁺ und 37,5 mg GPS (Glycidoxypropyltrimethoxysilan) in 400 μ l Tris/HCl (pH 7,5) unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur für 14 Stunden. Sol II, welcher für die Elektrodeposition verwendet wurde, besteht aus 100 μ l Sol I, 70 μ l PEI-Lösung (Polyethylenimin, 20%, pH 9), 80 μ l der Enzymlösung (10 mg/ml). Zur Immobilisation des Cofaktors in der Sol-Gel-Matrix wurden außerdem 50 μ l NAD-GPS-Lösung zugegeben. Bei diesen Messungen wurde außerdem 40 μ l der Diaphorase-Lösung (5 mg/ml) eingesetzt. Die Elektrolyse wurde für 60 s bei $-1,3$ V gegen Ag/AgCl (3 M KCl) durchgeführt. Danach wurden die Elektroden schnell mit Wasser gespült und zum Trocknen bei 4°C inkubiert. Die so präparierten Elektroden wurden dann wieder mit Wasser gespült und 15 Minuten vor der elektrochemischen Messung in Tris/HCl-Puffer gelegt. Die Messungen wurden von Zhijie Wang und Mathieu Etienne (*Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), CNRS, Université Henri Poincaré, Nancy*) durchgeführt. Abbildung III.42 zeigt die mit dem Sol-Gel-Film, in den das Enzym eingebettet ist, beschichtete Gold-Elektrode.

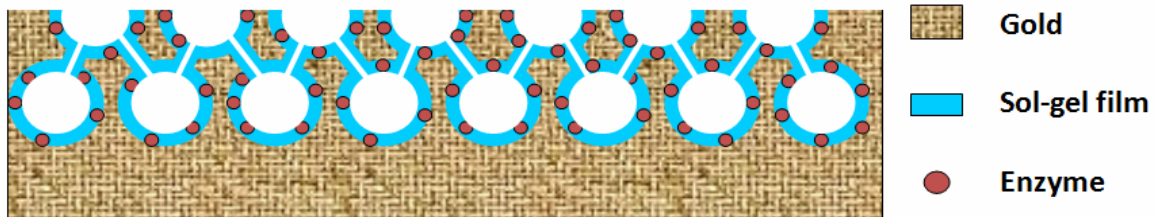


Abbildung III.42: Mit dem Sol-Gel-Film beschichtete Gold-Elektrode. In den Sol-Gel-Film sind die Enzyme eingebettet.

Die CV-Messung wurde mit D- und L-Sorbitol durchgeführt. Die resultierenden Cyclovoltammogramme sind in Abbildung III.43 dargestellt.

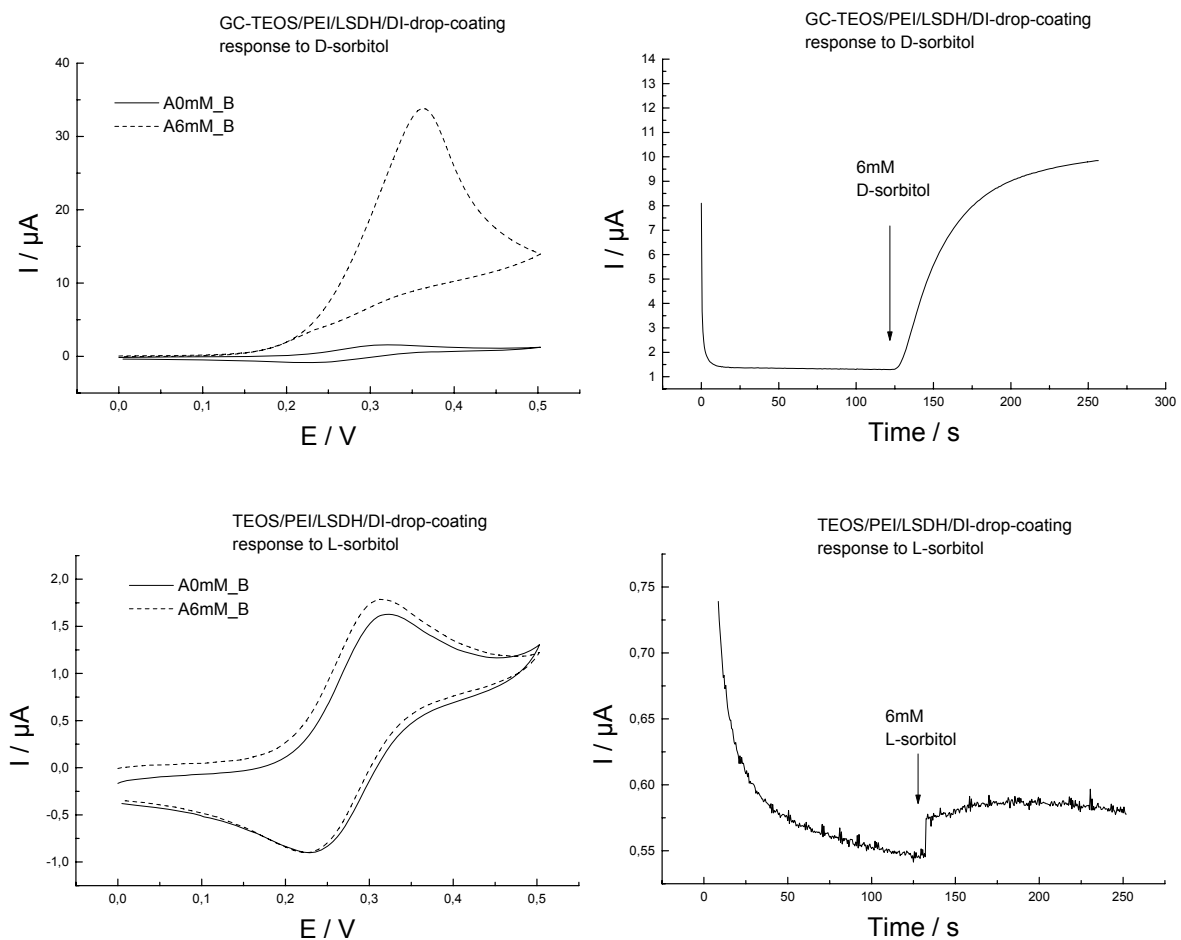


Abbildung III.43: a) Cyclovoltammetrie der LSDH für das Substrat D-Sorbitol; b) nicht-zyklische Voltammetrie der LSDH für das Substrat D-Sorbitol; c) Cyclovoltammetrie der LSDH für das Substrat L-Sorbitol; d) nicht-zyklische Voltammetrie der LSDH für das Substrat L-Sorbitol.

Den Substrateigenschaften von D- und L-Sorbitol entsprechend ist die Reaktion mit D-Sorbitol als Substrat deutlich stärker als mit L-Sorbitol, jedoch kann für L-Sorbitol ein eindeutiges Signal festgestellt werden. Für das Substrat D-Sorbitol liegt die maximale

Stromstärke bei etwa $35 \mu\text{A}$ (Abbildung III.43 a), während sie für das Substrat L-Sorbitol nur gering ansteigt (um etwa $0,2 \mu\text{A}$; Abbildung III.43 c). Bei der nicht-zyklischen Voltammetrie in den beiden rechten Abbildungen (Abbildungen III.43 b und d) ist die Antwort für das Substrat D-Sorbitol den Substrateigenschaften entsprechend deutlich höher, jedoch kann für das Substrat L-Sorbitol eine deutliche Antwort registriert werden. Zum Vergleich wurde dieselbe Messung mit der DSDH aus *Rhodobacter sphaeroides* durchgeführt. Das Enzym zeigt ebenfalls hohe Aktivitäten für ihr Hauptsubstrat D-Sorbitol, jedoch keine Aktivität für die Oxidation von L-Sorbitol (Klein, 2009).

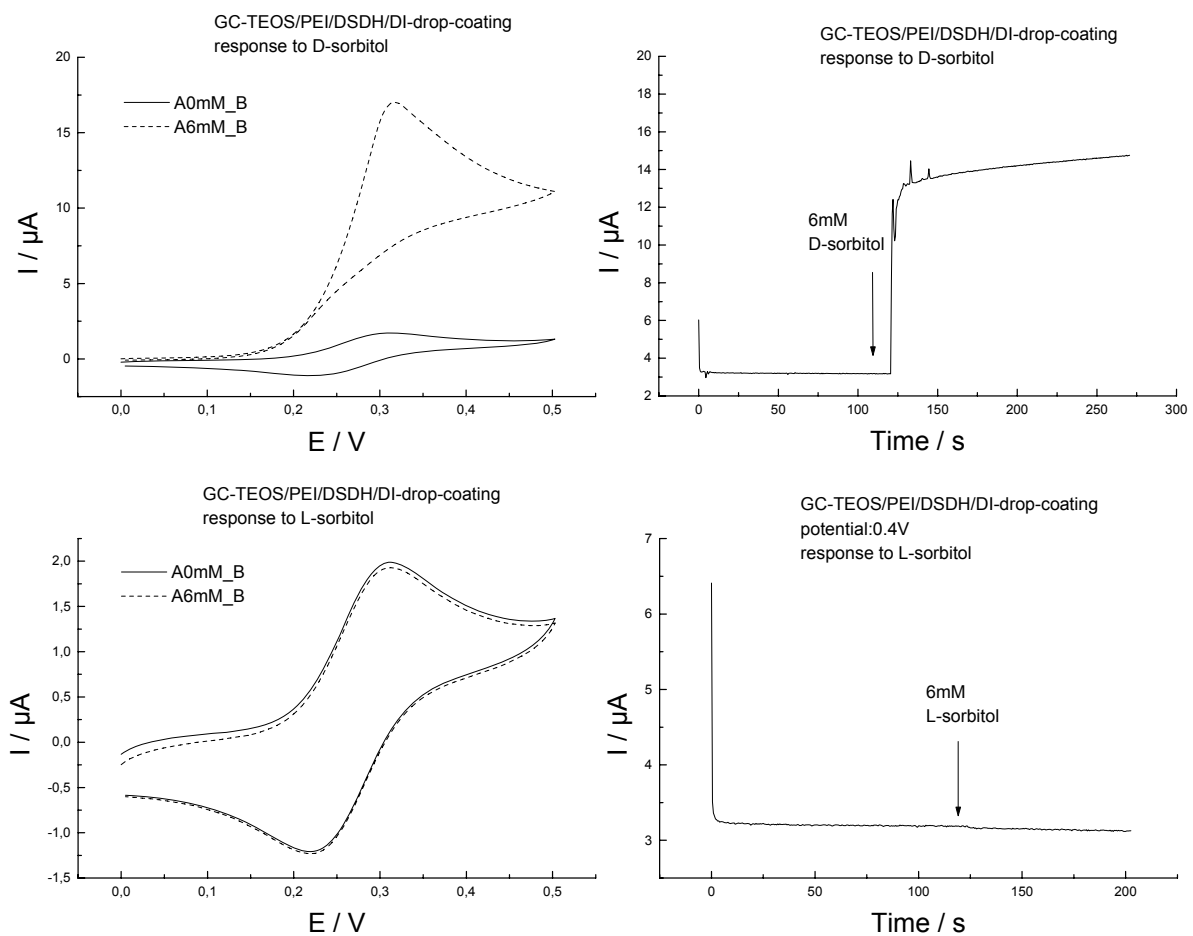


Abbildung III.44: a) Cyclovoltammetrie der DSDH für das Substrat D-Sorbitol; b) nicht-zyklische Voltammetrie der DSDH für das Substrat D-Sorbitol; c) Cyclovoltammetrie der DSDH für das Substrat L-Sorbitol; d) nicht-zyklische Voltammetrie der DSDH für das Substrat L-Sorbitol.

In den Abbildung III.44 a und b ist eine deutliche Antwort für das Substrat D-Sorbitol zu erkennen. Bei gleicher Substratkonzentration ist für die DSDH die Antwort sogar noch etwas höher als bei der LSDH für das Substrat D-Sorbitol. In den Abbildungen III.44 c und d jedoch konnte für das Substrat L-Sorbitol keine Antwort registriert werden. Dies spiegelt die Aktivitäten der beiden Enzyme gegenüber den beiden Substraten D- und L-Sorbitol wider.

3. Galaktitol-Dehydrogenase (GatDH) aus *Rhodobacter sphaeroides*

Im Rahmen des Projektes ERUDESP sollte eine Art Reaktor konstruiert werden, in dem alle notwendigen Komponenten für eine enzymatische Dehydrogenase-Reaktion außer dem Substrat immobilisiert sind. Verschiedene Gruppen beschäftigen sich dabei mit dem Elektrodenmaterial zur elektrochemischen Cofaktorregenerierung, mit der Konstruktion eines geeigneten Mediators und mit der Beschaffenheit einer geeigneten Oberflächenbeschichtung. Zur Anwendung in diesem Reaktor müssen die verwendeten Enzyme besonders stabil sein. Hinsichtlich ihrer Stabilität sollte daher die Galaktitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* mit verschiedenen Methoden verbessert werden. Neben der *error-prone*-PCR, die auf dem Zufallsprinzip beruht, sollten auch die Iterative Sättigungsmutagenese (ISM), rationales Design und die Stabilisierung durch den gezielten Einbau neuer Disulfidbrücken im Enzym ausprobiert werden.

3.1 Heterologe Expression der his₆-getaggtten GatDH und ihrer Varianten und Bestimmung der Enzymaktivität

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme, die die Galaktitol-Dehydrogenase bzw. ihre Varianten exprimieren, erfolgte bei 28°C und 220 rpm auf dem Rotationsschüttler (siehe II.8.1). Mit einer frischen Übernachtskultur wurde eine Hauptkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Nach Erreichen der OD wurde die Expression der GatDH bzw. der GatDH-Varianten durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 18 Stunden konnten die Zellen geerntet und die Zellen aufgeschlossen werden. Zur Messung der Enzymaktivität (siehe II.14.2) wurden Kunststoffküvetten der Schichtdicke 1 cm verwendet. Der Assay zur Aktivitätsmessung enthielt 500 µl Messpuffer, 250 µl H₂O_{deion.}, 50 µl NAD⁺ (36 mM) und 100 µl verdünnte Enzymlösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl des Substrates 1,2-Hexandiol (1M) gestartet. Während der Messdauer von 30 Sekunden kann die Zunahme von NADH+H⁺ verfolgt werden. Für die N-terminal his₆-getaggte GatDH-Variante ergaben sich dabei eine Volumenaktivität von 48,4 U/ml und eine spezifische Aktivität von 4,3 U/mg für das Substrat 1,2-Hexandiol im Rohextrakt.

3.2 Anreicherung der N-terminal His₆-getaggtten GatDH-Variante

Aus einer 250 ml-Hauptkultur wurden 2,6 g feuchte Zellen erhalten, die in 7 ml Waschpuffer mit Imidazol pro Gramm Pellet resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen

wurden (siehe II.9.1). Die Anreicherung der N-terminal His₆-getaggten GatDH-Varianten erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (siehe II.10.3). Vom Rohextrakt wurden 15 ml auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss an die Affinitätschromatographie wurde das Enzym mittels Gelfiltration in einen geeigneten Puffer umpufferert. Tabelle III.12 fasst die Enzymaktivitäten nach den einzelnen Anreicherungsschritten zusammen.

Tabelle III.12: Anreicherungstabelle der N-terminal his₆-getaggten GatDH-Variante.

	Gesamtaktivität [U]	Gesamtprotein [mg]	spezifische Aktivität [U/mg]	Anreicherung [x-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	871	203,8	4,3	1	100
HisTrap	727	-	-	-	84
Umpufferung	547	74,9	7,3	1,7	63

Aus 250 ml Kulturvolumen konnten 2,6 g feuchte Zellen gewonnen werden. Nach dem Zellaufschluss betrug die Gesamtaktivität 871 U, die spezifische Aktivität lag bei 4,3 U/mg. Nach der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose waren von ursprünglich 871 U noch 727 U übrig, was einer Aubeute von 84% entspricht. In Abbildung III.45 ist das Chromatogramm der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose dargestellt.

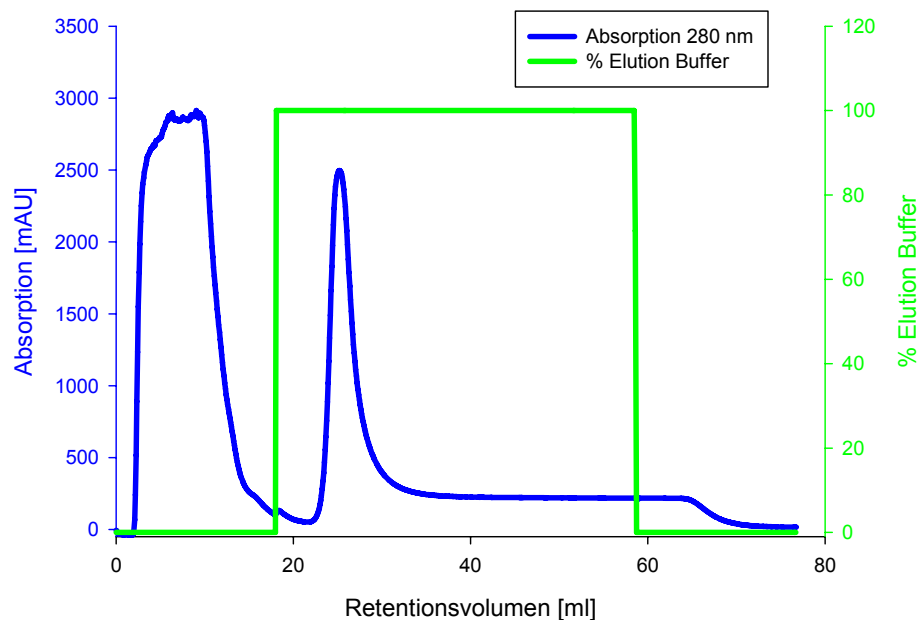


Abbildung III.45: Chromatogramm der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose der Galaktitol-Dehydrogenase mit N-terminalem His₆-Tag.

Die größten Verluste sind jedoch auch hier nach der Umpufferung festzustellen. Die Ausbeute betrug lediglich 63%. Die spezifische Aktivität konnte auf 7,3 U/mg gesteigert

werden, das Enzym wurde 1,7-fach angereichert. Abbildung III.46 zeigt eine SDS-PAGE zur Reinheitskontrolle nach der Anreicherung.

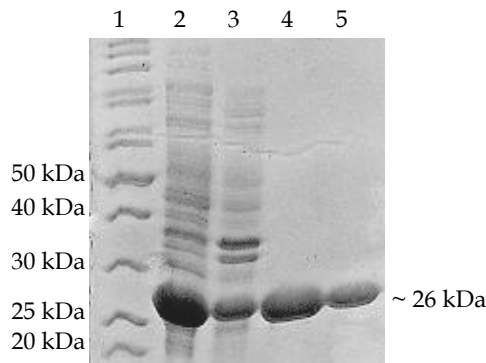


Abbildung III.46: SDS-PAGE zur Reinheitskontrolle nach den verschiedenen Anreicherungsschritten der GatDH. Spur 1: Marker *Page Ruler Unstained Protein Ladder* (Fermentas); Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Pelletfraktion; Spur 4: HisTrap; Spur 5: Umpufferung.

In Abbildung III.46 ist im Rohextrakt ein deutlich überexprimiertes Protein eine Größe von etwa 27 kDa zu erkennen. Hierbei ist die Expression im Rohextrakt deutlich stärker als im Pellet. Nach der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose und nach der Umpufferung sind keine Fremdproteine mehr zu erkennen.

3.3 Optimierung der Temperaturstabilität der GatDH

Um Enzyme in industriellen Prozessen anwenden zu können, ist die Thermostabilität von entscheidender Bedeutung. Die Durchführung von Prozessen bei Temperaturen über 60°C führt zur Verbesserung der Transportparameter (Abnahme der Viskosität und Zunahme der Diffusionsgeschwindigkeit) und minimiert die Kontaminationsgefahr.

Zur Verbesserung der Thermostabilität der GatDH wurden verschiedene Ansätze gewählt. Da die Kristallstruktur der GatDH bekannt ist, wurde neben der Zufallsmutagenese durch *error-prone*-PCR das rationale Proteindesign gewählt, um die Thermostabilität des Enzyms zu erhöhen. Dazu wurden Aminosäuren gezielt ausgetauscht, um durch eine Veränderung der intramolekularen Wechselwirkungen eine Verbesserung der Thermostabilität zu erreichen. Als Grundlage dienten hierbei die bioinformatischen Arbeiten von Chresten Søndergaard (*Department of Chemistry, Group of Professor Jan Jensen, University of Copenhagen*).

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Thermostabilität eines Enzyms ist die Iterative Sättigungsmutagenese (ISM). Dabei werden solche Bereiche im Enzym identifiziert, die die höchsten B-Faktoren haben und somit für die Stabilität eines Enzyms am kritischsten sind. An diesen Bereichen können nun Aminosäuren gezielt gegen alle 20 proteinogenen

Aminosäuren ausgetauscht werden. Diese Methode stellt somit eine Kombination aus rationalem Design und Zufallsmutagenese dar.

Zuletzt wurde eine Art rationales Design gewählt, bei der gezielt Disulfidbrücken im Enzym generiert werden sollten. Mit Hilfe des Programms *What-If* konnten solche Positionen identifiziert werden, an denen eine Disulfidbrücke durch den Austausch von einer oder mehrerer Aminosäuren möglich wäre. Auch hierbei wurde auf die bioinformatischen Arbeiten von Chresten Søndergaard zurückgegriffen.

3.2.1 Rationales Design

Um die Thermostabilität der GatDH zu erhöhen, wurde mit Hilfe der Suchmaschinen BLAST (für Sequenzhomologien) und Dali (für strukturelle Homologien) bekannte, stabile Proteinstrukturen gesucht, die hohe Homologien mit der GatDH aufweisen. Insgesamt wurden 191 Proteine ausgewählt, die als Matrizen verwendet werden konnten. Die stabilisierenden Interaktionen der Matrizenproteine wurden mit dem Programm „PropKa 2“ identifiziert. Dieses Programm sagt die pKa-Werte der Proteine voraus, die die Basis für die Berechnung der elektrostatischen Kräfte sind, die zwischen den geladenen Gruppen innerhalb von Proteinen wirken. Stabilisierende Interaktionen, die sich aus den Vergleichsproteinen ableiten, werden auf das Zielprotein übertragen. Diejenigen, die die Stabilität am positivsten beeinflussen werden ausgewählt, wobei solche Mutationen, die sich in der Nähe des aktiven Zentrums befinden oder die an der Interaktion der Monomere beteiligt sind, nicht beachtet wurden. Das anschließende Modelling mit Hilfe der „*alignment method*“ gibt Aufschluss über den Einfluss der Interaktionen auf die Stabilität ausgewählt:

- A12R/P235D
- A57E/A58R/A32H
- V64R/A72D
- A77H/A126E
- S87D

Diese Mutationen wurden mit Hilfe der *QuikChange*TM-Methode generiert.

Tabelle III.13: Volumen- und spezifische Aktivitäten der verschiedenen GatDH-Varianten, sowie ihre Restaktivität nach zehnmütiger Inkubation bei 45°C. Im Falle der Variante A77H/A126E wurden die Chaperone GroEL und GroES coexprimiert (*).

GatDH-Variante	Volumen-aktivität [U/ml]	Volumen-aktivität [%]	spezifische Aktivität [U/mg]	Restaktivität nach 10 min bei 45°C [%]
Wildtyp	22,3	100	2,8	5,3
A12R	1,5	6,6	0,2	16,9
P235D	1,4	6,4	0,2	13,4
A12R/P235D	-	-	-	-
V64R	6,6	26,7	0,8	14,4
A72D	0,5	2,4	0,1	3,7
V64R/A72D	15,5	69,6	1,9	6,8
S87D	26,6	119,2	3,0	8,7
A77H	1,4	6,1	0,2	-
A126E	11,6	51,9	1,7	16,0
A77H/A126E*	2,7	12,2	0,4	-
A32H	9,1	41,0	1,8	13,1
A57E	29,1	130,4	3,3	29,5
A58R	27,5	123,1	2,8	17,8
A32H/ A57E	13,7	61,3	2,5	9,7
A32H/ A58R	17,8	79,8	2,7	13,6
A57E/ A58R	6,0	27,1	1,2	22,5
A32H/A57E/A58R	4,4	19,9	0,8	8,8

Aus obiger Tabelle wird deutlich, dass zahlreiche Varianten nach zehnmütiger Inkubation bei 45°C höhere Restaktivitäten als der Wildtyp zeigen. Jedoch sind bei den meisten Varianten die Ausgangsaktivitäten deutlich geringer als bei der N-terminal His₆-getaggtten Variante. Deshalb spielen diese Varianten nur eine untergeordnete Rolle. Die Varianten A57E und A58R zeigen allerdings höhere Ausgangsaktivitäten als der Wildtyp (130,4 und 123,1 %). Diese beiden Varianten zeigen leicht erhöhte Thermostabilität im Vergleich zum Wildtyp. Gegenüber 5,3 % Restaktivität beim Wildtyp ist bei diesen Varianten nach zehnmütiger Inkubation bei 45°C noch 29,5 bzw. 17,8 % Restaktivität vorhanden. Eine Kombination der beiden Punktmutationen führt jedoch wieder zu einer deutlich verringerten Ausgangsaktivität (27,1 % gegenüber dem Wildtyp). Auch eine Coexpression von Chaperonen konnte hier keine Verbesserung der Aktivität herbeiführen. Die Variante S87D zeigt ebenfalls eine recht hohe Ausgangsaktivität (119,2%) im Vergleich zum Wildtyp. Ihre Restaktivität nach einer zehnmütigen Inkubation bei 45°C beträgt 8,7% gegenüber 5,3% bei der Wildtyp-Variante. Hier ist die Stabilität nur wenig verbessert.

Die Variante A77H/A126E wurde fast ausschließlich als unlösliche *inclusion bodies* exprimiert. Durch die Coexpression der Chaperone GroEL und GroES konnte die Ausbeute

an löslichem Protein gesteigert werden. Abbildung III.47 zeigt eine SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der Variante A77H/A126E.

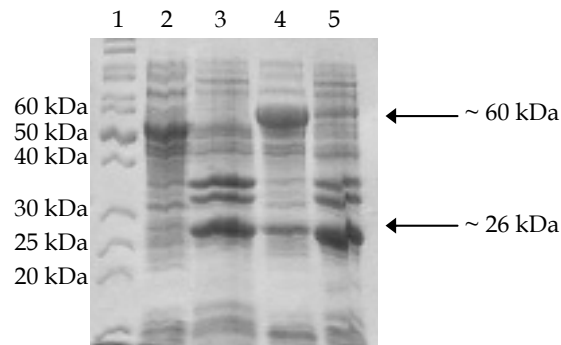


Abbildung III.47: SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der GatDH-Variante A77H/A126E. Spur 1: Proteinmarker *Page Ruler Unstained Protein Ladder*, Fermentas; Spur 2: Rohextrakt, ohne Chaperone; Spur 3: Pellet, ohne Chaperone; Spur 4: Rohextrakt, Coexpression der Chaperone GroEL und GroES; Spur 5: Pellet, Coexpression der Chaperone GroEL und GroES.

In obiger Abbildung ist in Spur 2 kein überexprimiertes Protein entsprechender Größe zu erkennen. Ohne die Coexpression der Chaperone GroEL und GroES wurde das gesamte rekombinante Protein als unlösliche *inclusion bodies* in der Zelle abgelegt (Spur 3). In Spur 4 ist allerdings eine überexprimierte Bande bei etwa 26 kDa zu erkennen, wobei auch hier ein recht großer Anteil des rekombinanten Proteins noch in Form unlöslicher *inclusion bodies* exprimiert wird (Spur 5). Auch das Chaperon GroEL, welches eine Größe von etwa 60 kDa aufweist ist in Spur 4 deutlich zu erkennen. GroES hat lediglich eine Größe von etwa 10 kDa und ist daher hier nicht nachweisbar. Die Aktivität betrug jedoch lediglich 12,2 % im Vergleich zum Wildtyp. Außerdem verlor diese Mutante ihre gesamte Aktivität bereits nach zehnminütiger Inkubation bei 40°C.

3.2.2 Iterative Sättigungsmutagenese (ISM)

Mit Hilfe der Iterativen Sättigungsmutagenese (ISM) ist es möglich, eine Aminosäure an einer bestimmten Position statistisch gegen alle anderen proteinogenen Aminosäuren auszutauschen. Diese Methode kombiniert somit die Zufallsmutagenese mit der ortsgerichteten Mutagenese. Entscheidend ist dabei der iterative Vorgang (Reetz et al., 2004). Die Aminosäuren wurden hierbei nach dem Prinzip der *QuikChange*TM-Methode (siehe II.7.1.1) ausgetauscht. Im Falle der GatDH wurden zur Verbesserung der Temperaturstabilität solche Aminosäuren ausgetauscht, die die höchsten B-Faktoren aufweisen und die somit am kritischsten für die Stabilität des Enzyms sind. Es sind dies die Aminosäuren an den Positionen 49/50 und an den Positionen 201/202. Die Aminosäuren an Position 201 und 202 liegen dabei im aktiven Zentrum des Enzyms, weshalb hier die

Wahrscheinlichkeit der Erzeugung inaktiver Enzymvarianten recht hoch ist. Für die PCR wurden die Primer GatDH_ISM_49/50_f und GatDH_ISM_49/50_r bzw. GatDH_ISM_201/202_f und GatDH_ISM_201/202_r verwendet. Die *Annealing*-Temperatur während der PCR wurden dabei an die in Tabelle II.3 angegebenen Primer-Schmelztemperaturen angepasst. Durch ISM wurden für beide Positionen zusammen rund 2000 Klone auf eine verbesserte Thermostabilität getestet, davon 591 Klone für die Position 201/202 und 1356 Klone für die Position 49/50. Im Mikrotiterplattenmaßstab konnten dabei zahlreiche Klone gefunden werden, die eine verbesserte Thermostabilität vermuten ließen. Das Screening erfolgte mit dem NBT/PMS-Assay basierend auf der Formazan-Bildung bzw. einem Assay basierend auf der NADH-Bildung. Nach einer Anzucht im größeren Maßstab (25 ml) konnten verschiedene Varianten gefunden werden, die eine prozentual erhöhte Thermostabilität zeigten, deren Enzymaktivität unter Standardbedingungen im Vergleich zur Aktivität des Wildtyp-Enzyms jedoch relativ gering war. Diese Varianten sind deshalb für eine weitere Anwendung wenig interessant. Die ISM ist also grundsätzlich gut geeignet, um thermostabile Varianten zu erzeugen, jedoch geht die Thermostabilität oft mit einem Verlust an Ausgangsaktivität einher. Im Mikrotitermaßstab finden sich auch viele zunächst vielversprechende Klone, die jedoch nach einer Anzucht im größeren Maßstab sehr geringe bis gar keine Aktivität zeigen. Mögliche Gründe für die falsch positiven Klone sind Luftblasen im Mikrotitermaßstab, die die Absorption erhöhen.

3.2.3 Generierung neuer Disulfidbrücken am Dimer-Dimer-Interface durch ortsgerichtete Mutagenese (Björk et al., 2003)

Die Verbesserung der Thermostabilität mesophiler Enzyme spielt eine große Rolle in einer Vielzahl von Projekten, die sich mit Protein-Engineering befassen. Dabei sind vor allem Proteine aus hyperthermophilen Organismen von großem Interesse, um die Strukturen zu identifizieren, die zur erhöhten Thermostabilität führen (Russel et al., 1994; Yip et al., 1995; Yip et al., 1998; Arnott et al., 2000; Szilagyi und Zavodszky, 2000; Vieille und Zeikus, 2001). Jedoch ist es schwierig generelle Regeln für die Erhöhung der Thermostabilität mesophiler Proteine abzuleiten (Van den Burg und Eijsink, 2002). Bei einigen multimeren Enzymfamilien kann eine Korrelation zwischen der Thermostabilität und dem Oligomerisationsstatus beobachtet werden (Vieille und Zeikus, 2001; Jaenicke und Bohm, 1998; Walden et al., 2001). Folglich kann geschlossen werden, dass Interaktionen zwischen den Untereinheiten zu einem stabileren Enzym führen, was durch zahlreiche Studien belegt

werden konnte (Arnott et al., 2000; Thoma et al., 2000; Kabashima et al., 2001; Trejo et al., 2001; Clantin et al., 2001; Flores und Ellington, 2002; Maeda et al., 2002; Bogin et al., 2002).

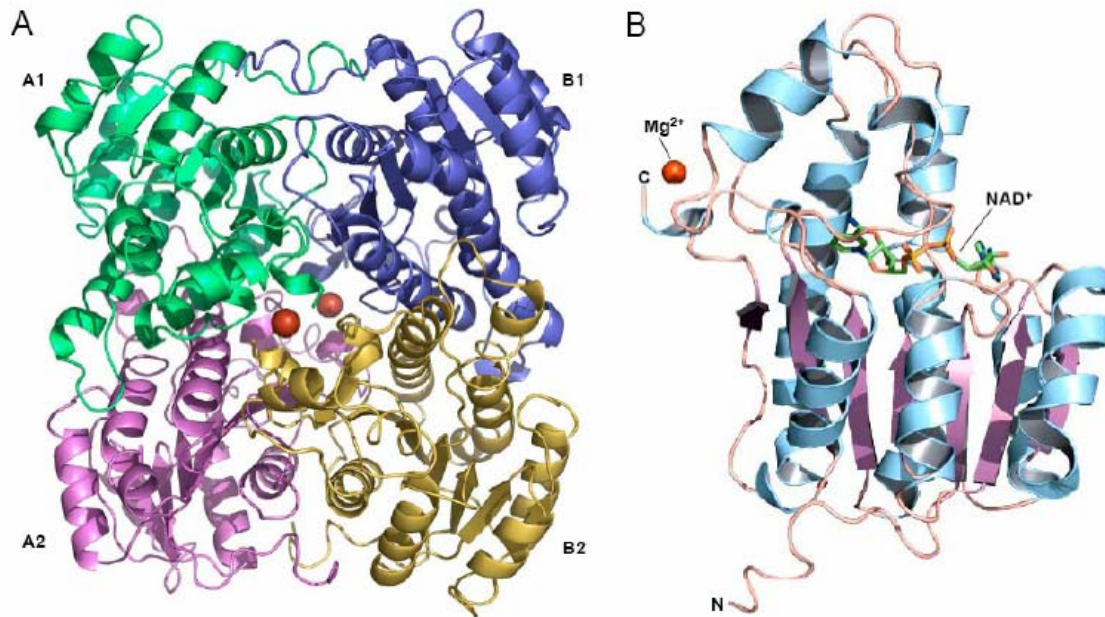


Abbildung III.48: Kristallstruktur der GatDH. A: Tetramer mit zwei Magnesium-Ionen im Zentrum (rote Kugeln); B: Monomer mit dem Cofaktor NAD⁺ und komplexiertem Magnesium am C-Terminus.

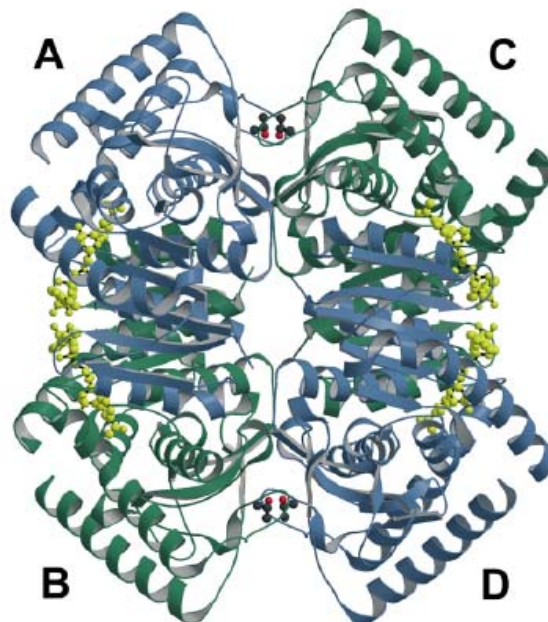


Abbildung III.49: Kristallstruktur der homotetrameren Malat-Dehydrogenase aus *Chloroflexus aurantiacus*. Das Tetramer besteht aus zwei Dimeren (AB und CD). Als Kugel-Stab-Modell ist hier Thr187 dargestellt. Diese Aminosäure liegt am Dimer-Dimer-Interface und wurde gegen Cystein ausgetauscht, wodurch die Thermostabilität 200-fach erhöht wurde. Der Cofaktor NAD⁺ ist in gelb dargestellt (Björk et al., 2003).

Die Malat-Dehydrogenase aus *Chloroflexus aurantiacus* (CaMDH), deren Thermostabilität durch die Einführung neuer Disulfid-Brücken am Dimer-Dimer-Interface 200-fach gesteigert

werden konnte (Bjørk et al., 2003), ist ähnlich aufgebaut wie die Galaktitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides*. Beide Enzyme sind Tetramere, die aus zwei Dimeren zusammengesetzt sind. Die Abbildungen III.48 und III.49 zeigen die Kristallstrukturen der beiden Enzyme. Nur wenige Studien zur Einführung von Disulfid-Brücken zwischen den beiden Untereinheiten sind bekannt, wobei auch die Erfolge im Hinblick auf eine Verbesserung der Thermostabilität variieren (Kabashima et al., 2001; Bunting et al., 2002). Bei einigen dimeren Proteinen führte diese Strategie allerdings zu Erfolgen (Sauer et al., 1986; Shirakawa et al., 1991; Gokhale et al., 1994; Tamura et al., 1994). Im Falle der GatDH wurden mögliche Positionen für die Einführung neuer Disulfid-Brücken mit der Funktion *SUGCYS* des Programms *WHAT IF* identifiziert (Vriend, 1990). Die bioinformatischen Arbeiten wurden von Chresten Søndergaard (*Department of Chemistry, Group of Prof. Jan Jensen, University of Copenhagen*) durchgeführt. Folgende Positionen wurden nach Ausschluss solcher Mutationen, die im aktiven Zentrum oder die nicht am Dimer-Dimer-Interface lagen, ausgewählt:

- F231C
- M160C/Q168C
- E224C/Y239C
- F155C/E176C
- Y239C/V247C
- E224C/S238C
- R152C/W254C

Die meisten Varianten zeigten trotz guter Expression als lösliches Protein keine Aktivität. Die Variante M160C/Q168C zeigte eine Aktivität, die mit der des Wildtyps vergleichbar ist, jedoch keine verbesserte Thermostabilität. Da an Position 160 bereits ein Methionin vorhanden ist, wurden folgende Mutationen getestet: Q168C und Q168M. Die Variante GatDH-Q168C zeigte zwar Aktivität, diese war jedoch sehr gering im Vergleich zum Wildtyp. Die Thermostabilität war nicht verbessert. Die Variante Q168M zeigte etwa 60% der Wildtyp-Aktivität. Abbildung III.50 zeigt die Enzymaktivität der Variante GatDH-Q168M in Abhängigkeit von der Temperatur.

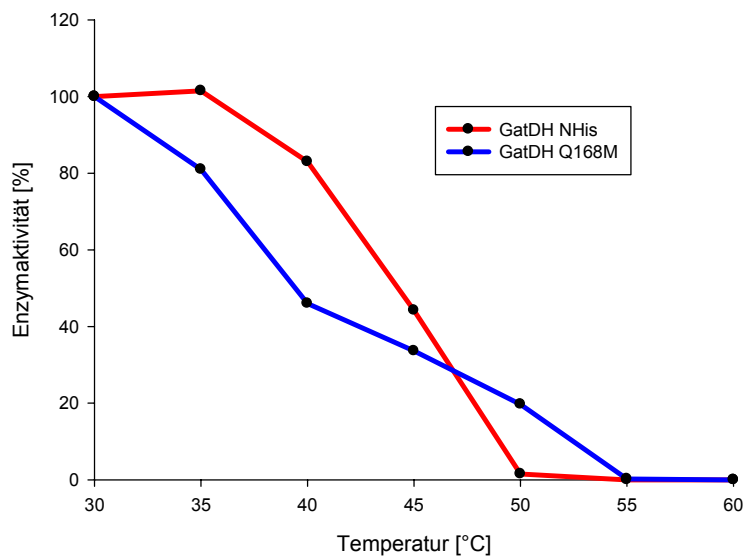


Abbildung III.50: Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Temperatur der Wildtyp-Variante GatDH-NHis und der Variante GatDH-Q168M.

Wie in Abbildung III.50 deutlich zu erkennen ist, verliert die Variante GatDH-Q168M zunächst schneller an Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch ist bei höheren Temperaturen (50°C) noch 20% der Ausgangsaktivität vorhanden, während die Wildtyp-Variante bereits keine Aktivität mehr zeigt. Die Anreicherung der Variante erfolgte mit Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (siehe II.10.3), wonach das Enzym in einen geeigneten Puffer umgepuffert wurde. Aus einer 250 ml-Kultur konnten insgesamt 510 Units gewonnen werden. Die spezifische Aktivität betrug 2,7 U/mg. Tabelle III.14 fasst die Enzymaktivitäten nach den beiden Anreicherungsschritten zusammen.

Tabelle III.14: Anreicherungstabelle der GatDH-Variante Q168M.

Q168M	Gesamtaktivität [U]	Gesamtprotein [mg]	spezifische Aktivität [U/mg]	Anreicherung [x-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	510	186	2,7	1	100
HisTrap	369	-	-		72
Umpufferung	176	57	3,1	1,2	35

Nach der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose betrug die Gesamtaktivität 369 Units, was einer Ausbeute von 72% entspricht. Nach der anschließenden Gelfiltration zur Umpufferung waren lediglich 176 Units übrig, was einer Ausbeute von 35% entspricht. Abbildung III.51 zeigt eine SDS-PAGE zur Expressions- und Reinheitskontrolle des Enzyms nach den einzelnen Anreicherungsschritten.

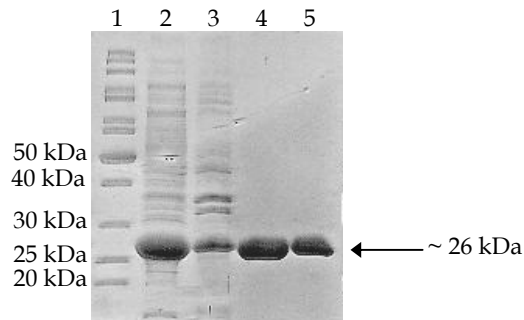


Abbildung III.51: SDS-PAGE zur Expressions- und Reinheitskontrolle der GatDH-Variante Q168M. Spur 1: Proteinmarker *Page Ruler Unstained Protein Ladder*, Fermentas; Spur 2: Rohextrakt; Spur 3: Pellet; Spur 4: HisTrap; Spur 5: Umpufferung.

Die Expression der Variante GatDH-Q168M erfolgte hauptsächlich als lösliches Protein im Rohextrakt (Spur 2). Im Pellet (Spur 3) ist eine deutlich schwächere Bande zu erkennen. Bereits nach dem ersten Anreicherungs-schritt (HisTrap, Spur 4) ist die Enzym-lösung frei von Fremdproteinen.

4. Mandelat-Dehydrogenasen aus *Pseudomonas putida* (LMDH) und *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (DMDH)

Neben dem Projekt ERUDESP sollen D-Mandelat-Dehydrogenase (DMDH) und L-Mandelat-Dehydrogenase (LMDH) in einem weiteren Projekt Anwendung finden. DMDH und LMDH sind für die Herstellung enantiomerenreiner α -Hydroxysäuren interessant und haben deshalb Anwendungspotential für die Produktion semi-synthetischer Antibiotika (Hummel et al., 1988; Kim und Yun, 2004). Die beiden Enzyme eröffnen außerdem die Möglichkeit, ein lösliches, NAD^+ -abhängiges Protein (DMDH) und ein membrangebundenes, FMN-abhängiges Protein (LMDH) in elektrochemischen Anwendungen vergleichen zu können. Durch gezielte Modifikationen sollen die beiden Enzyme auch in diesem Projekt an Gold-Nanopartikeln direkt immobilisiert werden. Diese Gold-Nanopartikel dienen als Additive in den Sol-Gel-Schichten. Für die lösliche DMDH sollen hier dieselben Sol-Gel-Systeme verwendet werden wie sie bereits erfolgreich für die D-Sorbitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* angewandt wurden (Wang et al., 2010; Gajdzik et al., 2007). Für die membrangebundene LMDH soll diese Methode mit Vesikeln, die in der Sol-Gel-Matrix eingeschlossen sind, angewandt werden.

4.1 Amplifikation des LMDH-Gens aus der genomischen DNA von *P. putida* bzw. des DMDH-Gens aus der genomischen DNA von *L. lactis*

Zur Isolation der genomischen DNA aus *P. putida* und *L. lactis* wurden zunächst Vorkulturen beimpft. Die Anzucht von *P. putida* erfolgte in NB-Medium, *L. lactis* wurde in Trypticase-Hefeextrakt-Medium angezogen. Die Isolation der genomischen DNA aus den frischen Übernachtskulturen erfolgte mit dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche; siehe II.5.5.1). Zur Amplifikation des L-Mandelat-Dehydrogenase-Gens aus der genomischen DNA von *P. putida* wurden die Primer LMDH_f und LMDH_r verwendet. Das D-Mandelat-Dehydrogenase-Gen aus *L. lactis* wurde mit Hilfe der Primer DMDH_f und DMDH_r amplifiziert. Die Polymerasekettenreaktion wurde mit Hilfe der *Crimson-LongAmp-Taq-DNA-Polymerase* (New England Biolabs) durchgeführt (PCR-Programm und -Ansatz siehe II.7.1.2). Diese Polymerase vereint Schnelligkeit mit hoher Genauigkeit. Die *Annealing*-Temperatur lag bei 57°C, die *Elongationszeit* betrug 1 min und 20 s. Denaturierung, *Primer-Annealing* und *Elongation* wurden in 35 Zyklen wiederholt. Zur Überprüfung der Amplifikation wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe II.6.3). Das Ergebnis ist in Abbildung III.52 dargestellt.

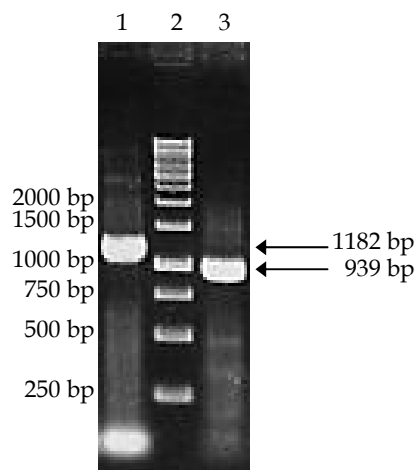


Abbildung III.52: Agarosegel zur Amplifikationskontrolle des Mandelat-Dehydrogenase-Gens aus *Pseudomonas putida* (Spur 1) bzw. aus *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Spur 3); Spur 2: Marker 1 kb-DNA-Leiter (Fermentas).

Die PCR-Produkte entsprechen in ihrer Länge den erwarteten Mandelat-Dehydrogenase-Genen aus *P. putida*. (1182 bp) bzw. aus *L. lactis* (939 bp).

4.2 Klonierung der MDH-Gene aus *P. putida* und aus *L. lactis*

4.2.1 TOPO-TA-Klonierung

Mit dem frischen PCR-Produkt wurde eine TOPO-TA-Klonierung durchgeführt (siehe II.6.5.1). Verschiedene weiße Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und mittels *Colony-PCR* (siehe II.6.5.3) auf die Anwesenheit des Mandelat-Dehydrogenase-Inserts überprüft. Ein Klon, dessen Insert die richtige Größe aufwies wurde in 5 ml Komplexmedium mit Kanamycin angezogen, um die Plasmid-DNA isolieren zu können (siehe II.6.1.1).

4.2.2 Umklonieren in den Expressionsvektor pET-24a(+)

Um die Mandelat-Dehydrogenase aus *P. putida* bzw. aus *L. lactis* in *E. coli* exprimieren zu können, muss das Fremdgen zunächst in den Expressionsvektor pET-24a(+) umkloniert werden (siehe II.6.5.2). Die erhaltenen Kolonien wurden mittels *Colony-PCR* (siehe II.6.5.3) auf das gewünschte Mandelat-Dehydrogenase überprüft. Ein Klon, der laut *Colony-PCR* das korrekte Insert trägt wurde in 5 ml Komplexmedium mit Kanamycin angezogen, um die Plasmid-DNA isolieren zu können (siehe II.6.1.1) und zu sequenzieren (siehe II.6.6). Abbildung III.53 zeigt die Sequenz der D-Mandelat-Dehydrogenase aus *L. lactis*; die Sequenz der L-Mandelat-Dehydrogenase aus *P. putida* ist in Abbildung III.54 dargestellt.

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      5          15          25          35          45          55
DMDH L. lactis atgagaatcacaattgccggtgcaggagcgcgatgggaagccggttttggccttatgcttcat
      M R I T I A G A G A M G S R F G L M L H

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      65          75          85          95          105         115
DMDH L. lactis agagggggcaacgaagtgacccttgtagatggttggttgaacatgtgactgcaattaa
      R G G N E V T L V D G W L E H V T A I K

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      125         135         145         155         165         175
DMDH L. lactis gaacacggcctacaagcaaattttaatggtgaagaaatcactgctcatctatcagtagaa
      E H G L Q A N F N G E E I T A H L S V E

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      185         195         205         215         225         235
DMDH L. lactis ttacaatctaataattttcatcagaagaaaaaacagatttaattatattttatcagaaagca
      L Q S N I S S E E K T D L I I L F T K A

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      245         255         265         275         285         295
DMDH L. lactis atgcagttagataaaaatgcttcaggacattaaacctttaattgctgagcatacaaaagtt
      M Q L D K M L Q D I K P L I A E H T K V

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  305      315      325      335      345      355
DMDH L. lactis ctttgcttacttaatgggattgggtcatgaagatattattgaaaaatgtttctaaaaat
L C L L N G I G H E D I I E K Y V S K N

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  365      375      385      395      405      415
DMDH L. lactis aatatttttattgggaataccatgtggactgcaggtttagaaggaccaggaaaagcaaaa
N I F I G N T M W T A G L E G P G K A K

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  425      435      445      455      465      475
DMDH L. lactis ctatttggaaatggttctgttgaacttcaaaatttcattcctggcgaagaagaacggct
L F G N G S V E L Q N F I P G E E E T A

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  485      495      505      515      525      535
DMDH L. lactis aaaaaattagctgacattttatctgcttcaggattaaatgctaactattctgataacatc
K K L A D I L S A S G L N A N Y S D N I

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  545      555      565      575      585      595
DMDH L. lactis cattattcaatttaccgaaaagcgtgctgtaaatgggacaatgaatggactctgcactatt
H Y S I Y R K A C V N G T M N G L C T I

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  605      615      625      635      645      655
DMDH L. lactis ttggatactaatatggctggattgggagcaacaaaacctgctcacgatatggttgttaca
L D T N M A G L G A T K P A H D M V V T

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  665      675      685      695      705      715
DMDH L. lactis attgtcaaagaatttgcggcagttgcaaaacatgaggatgtgaatccttgatatagatgag
I V K E F A A V A K H E D V N L D I D E

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  725      735      745      755      765      775
DMDH L. lactis gtcgtagaacatgttgagacatgttttgaccctgaaactattggcttacattatccttca
V V E H V E T C F D P E T I G L H Y P S

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  785      795      805      815      825      835
DMDH L. lactis atgtatcaagatttgataaataataatcgcttgacagagatagattatattaatggtgca
M Y Q D L I N N N R L T E I D Y I N G A

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  845      855      865      875      885      895
DMDH L. lactis gtttcacgtaaagggaaaaaatcagatagctactccttactgtgactttttgactcaa
V S R K G K K Y Q I A T P Y C D F L T Q

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
  905      915      925      935
DMDH L. lactis ttagttcatagtaagaagagttattaaaggcgaaataa
L V H S K E E L L K A K *

```

Abbildung III.53: Basen- und daraus resultierende Aminosäuresequenz der D-Mandelat-Dehydrogenase aus *L. lactis*. Die Abbildung wurde mit dem Programm *BioEdit* erstellt.


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      5          15          25          35          45          55
LMDH P. putida atgagccagaatctctttaacggtgaggactatcgcaagcttgcgcaaaagcgcttgccg
M S Q N L F N V E D Y R K L R Q K R L P

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      65          75          85          95          105         115
LMDH P. putida aagatgggtctacgactatctggaaggtggggctgaagacgaatacggggtgaaacacaac
K M V Y D Y L E G G A E D E Y G V K H N

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     125         135         145         155         165         175
LMDH P. putida cgcgacgtcttccagcaatggcgattcaaaccgaagcggtagtagacgtcagccgccg
R D V F Q Q W R F K P K R L V D V S R R

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     185         195         205         215         225         235
LMDH P. putida agcctccaagcggaagtacttgaaagaggcagtcgatgcctctctgattgggectact
S L Q A E V L G K R Q S M P L L I G P T

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     245         255         265         275         285         295
LMDH P. putida gggctgaacgggtgcgctgtggcctaaggggatctcgcttttagctcgagcagcaaccaag
G L N G A L W P K G D L A L A R A A T K

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     305         315         325         335         345         355
LMDH P. putida gccggaatcccgttcgtgctgtcgaccgcctccaacatgtccattgaagacctcgcacgt
A G I P F V L S T A S N M S I E D L A R

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     365         375         385         395         405         415
LMDH P. putida cagtgtgatggcgatctgtgggtccagctctatgtgatccaccgagagattgvcgagggg
Q C D G D L W F Q L Y V I H R E I A Q G

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     425         435         445         455         465         475
LMDH P. putida atggtgctcaaagccctgcacactggttacacgacactgggtgcttactacggatgtggcg
M V L K A L H T G Y T T L V L T T D V A

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     485         495         505         515         525         535
LMDH P. putida gttaacggctatcgcgagcgcgacctgcataaccgattcaagataccaatgagctactcc
V N G Y R E R D L H N R F K I P M S Y S

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     545         555         565         575         585         595
LMDH P. putida gcaaagggtggtgctggacggatgctgcacccgcgtggctcgctcacttcgtgvcgacac
A K V V L D G C L H P R W S L D F V R H

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     605         615         625         635         645         655
LMDH P. putida ggcattgccgcaactggccaatttcgtcagcagtcacaacgtctagcttagaaatgcaggca
G M P Q L A N F V S S Q T S S L E M Q A

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     665         675         685         695         705         715
LMDH P. putida gcattgatgagccgcaaatggatgccagtttcaactgggaggcattgagatggctgcgt
A L M S R Q M D A S F N W E A L R W L R

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     725         735         745         755         765         775
LMDH P. putida gacctctggccgcacaaactccccgtaaaggggttgctcagtgctgaggacgccgatcgg
D L W P H K L P V K G L L S A E D A D R

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     785         795         805         815         825         835
LMDH P. putida tgcacgctgaagggtgcagacggcgtaatcctatcaaaccacggcggtcgccaactcgat
C I A E G A D G V I L S N H G G R Q L D

```

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      845      855      865      875      885      895
LMDH P. putida  tgcgcgatatcgccaatggaagtgttggctcaatcggtagcgaaaactggaaaaccagtg
      C A I S P M E V L A Q S V A K T G K P V

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      905      915      925      935      945      955
LMDH P. putida  cttatcgatagcggccttccgacggggttcggacatcgttaaagcacttgcgctaggtgct
      L I D S G F R R G S D I V K A L A L G A

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      965      975      985      995      1005     1015
LMDH P. putida  gaggtgtactcctgggtcgtgcaactttgtatggccttgacgacgaggtgaaacgggt
      E A V L L G R A T L Y G L A A R G E T G

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1025     1035     1045     1055     1065     1075
LMDH P. putida  gttgacgaggtgctaaccctcctaaaagcggatatcgaccgcacccttgcccagattgga
      V D E V L T L L K A D I D R T L A Q I G

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      1085     1095     1105     1115     1125     1135
LMDH P. putida  tgcctgacatcacctccctttctcctgattacctccaaaacgaggagtgactaacacc
      C P D I T S L S P D Y L Q N E G V T N T

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|...
      1145     1155     1165     1175
LMDH P. putida  gtcctcagtcgatcacctcattggtaaaggaacacacgcatga
      A P V D H L I G K G T H A *

```

Abbildung III.54: Basen- und daraus resultierende Aminosäuresequenz der L-Mandelat-Dehydrogenase aus *P. putida*. Die Abbildung wurde mit dem Programm *BioEdit* erstellt.

Die Sequenzierung ergab die korrekte Sequenz und Orientierung der beiden Mandelat-Dehydrogenase-Gene im Expressionsvektor pET-24a(+).

4.3 Heterologe Expression der MDH aus *P. putida* bzw. aus *L. lactis*

Im Expressionsvektor pET-24a(+) steht das Fremdgen unter der Kontrolle der sehr starken Transkriptions- und Translationssignale des Bakteriophagen T7. Die Expression wird induziert, wenn die T7-RNA-Polymerase von der Wirtszelle zur Verfügung gestellt wird. Der verwendete Expressionsstamm *E. coli* BL21Gold(DE3) enthält im Chromosom integriert eine Kopie des Gens für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors. Die Bildung der T7-RNA-Polymerase kann somit durch IPTG induziert werden.

Zur Anzucht des entsprechenden Klons wurde zunächst eine Vorkultur erstellt, indem 5 ml Komplexmedium mit Kanamycin mit 5 µl einer Glycerinkultur des Klons beimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Rundschtüttler inkubiert wurden. Mit dieser Übernachtskultur wurde am nächsten Tag eine 250 ml-Hauptkultur (Komplexmedium mit Kanamycin) beimpft und erneut bei 37°C auf dem Rundschtüttler inkubiert. Hatten die Zellen eine OD₆₀₀ von 1 erreicht, wurde die Expression des Fremdgens durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert.

Weitere 18 Stunden nach der Induktion erfolgte die Zellernte (siehe II.8.1). Die Zellen wurden in Waschpuffer (Tris/HCl, 20 mM, pH 7) gewaschen und mittels Ultraschall (siehe II.9.1) unter ständiger Kühlung aufgeschlossen. Nach der Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (14000 rpm, 30 min, 4°C) wurden die Rohextrakt- und Pelletproben für die SDS-PAGE vorbereitet (siehe II.12). Das Ergebnis der SDS-PAGE zur Expressionskontrolle ist in Abbildung III.55 dargestellt.

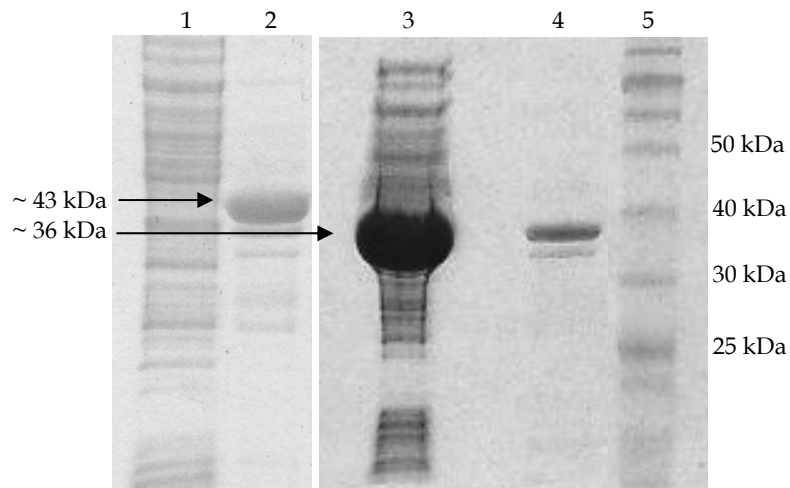


Abbildung III.55: SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der beiden Mandelatdehydrogenasen. Spur 1: LMDH aus *P. putida*, Rohextrakt; Spur 2: LMDH aus *P. putida*, Pellet; Spur 3: DMDH aus *L. lactis*, Rohextrakt; Spur 4: DMDH aus *L. lactis*, Pellet. Spur 5: Protein Marker ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa), New England Biolabs

In Spur 2 ist deutlich ein überexprimiertes Protein erwarteter Größe zu erkennen. Allerdings erfolgt die Expression ausschließlich im Pellet. Im Rohextrakt (Spur 1) ist kein überexprimiertes Protein zu erkennen. Die LMDH aus *P. putida* wird also ausschließlich als unlösliche *inclusion bodies* exprimiert. Die DMDH aus *L. lactis* (Spuren 4 und 5) hingegen wird fast ausschließlich als lösliches Protein im Rohextrakt exprimiert (Spur 4). Die Pelletprobe ist hier etwas zu stark verdünnt, trotzdem ist zu erkennen, dass nur ein geringer Anteil der DMDH als unlösliche *inclusion bodies* exprimiert wird.

5. Anreicherung und Charakterisierung der DMDH aus *L. lactis* subsp. *cremoris*

5.1 Klonierung und heterologe Expression einer N-terminal His₆-getaggten Variante der DMDH aus *L. lactis*

Zur Vereinfachung der Enzymanreicherung wurde auf eine einfache und gut etablierte Methode zurückgegriffen. Die Affinitätschromatographie an Nickelsepharose eignet sich gut für große Proteinmengen (Schmitt et al., 1993; Hochuli et al., 1987). Grundsätzlich bieten sich

zwei Möglichkeiten, den Histidin-Tag anzuhängen, und zwar am C-Terminus der Proteinsequenz oder am N-Terminus. Für die D-Mandelat-Dehydrogenase aus *L. lactis* wurde der N-Terminus ausgewählt (Chambellon et al., 2009).

Die Fusion der nativen MDH mit dem N-terminalen His₆-Tag erfolgte mit Hilfe der Primer DMDH_NHis_f und DMDH_NHis_r. Die PCR wurde mit der *Phusion*TM *High Fidelity*-DNA-Polymerase durchgeführt (siehe II.7.1.2). Das PCR-Produkt wurde in den Expressionsvektor pET-24a(+) kloniert (siehe II.6.5.2) und nach Bestätigung des angefügten His₆-Tags in *E. coli* BL21Gold(DE3) exprimiert (siehe II.8.1). Die histidin-getaggte Variante der MDH zeigte keinerlei Aktivitätsverluste gegenüber dem nativen Enzym.

5.2 Anreicherung der DMDH aus *L. lactis*

Die Anreicherung der histidin-getagkten Variante der DMDH aus *L. lactis* erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (siehe II.10.3). Abbildung III.56 zeigt das Elutionsdiagramm. Die Elution erfolgte durch direkte Steigerung des Imidazol-Gradienten auf 100 %, wonach ein deutlicher Peak bei 280 nm zu erkennen ist.

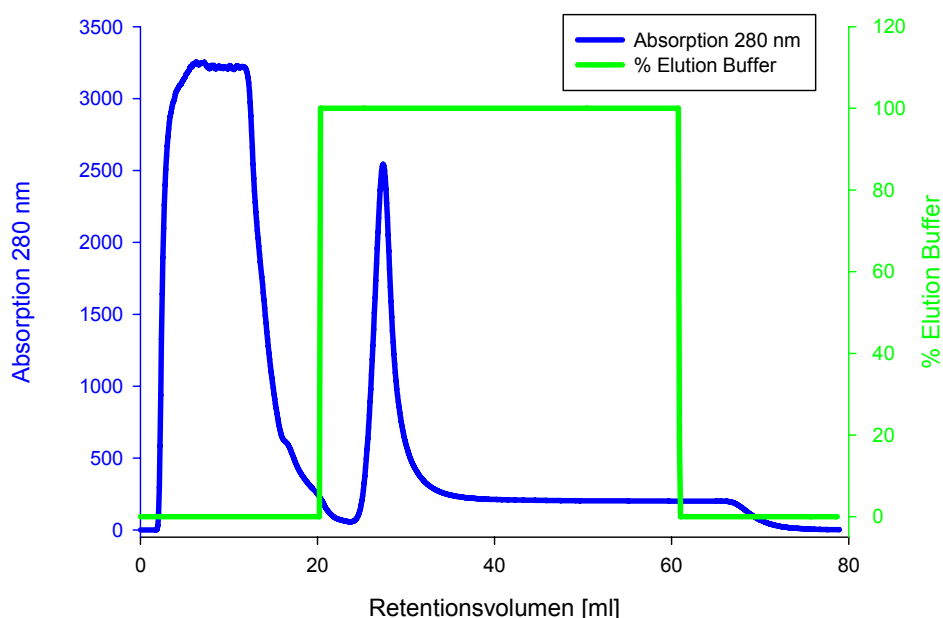


Abbildung III.56: Elutionsdiagramm der Anreicherung der Mandelat-DH aus *L. lactis* mit Imidazol-Zusatz in Wasch- und Binding-Puffer (20 mM). Die blaue Kurve zeigt die Absorption der 280 nm. Die grüne Kurve repräsentiert den Imidazol-Gradienten, der zur Elution des his-getagkten Enzyms direkt nach dem Probenauftrag auf 100 % erhöht wurde.

Tabelle III.15 fasst die Enzymaktivitäten nach den einzelnen Anreicherungsschritten zusammen.

Tabelle III.15: Anreicherungstabelle der Mandelat-DH aus *L. lactis* ohne Imidazol-Zusatz in Wasch- und Binding-Puffer.

	Gesamtaktivität [U]	Gesamtprotein [mg]	spezifische Aktivität [U/mg]	Anreicherung [x-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	4496	567	7,9	1	100
HisTrap	3889				86,5
Umpufferung	3125	141	22,2	2,8	69,5

Aus einer 250 ml-Kultur konnten 4500 Units D-Mandelat-Dehydrogenase gewonnen werden. Die spezifische Aktivität der DMDH liegt im Rohextrakt bei 7,9 U/mg. Nach der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (HisTrap) konnten 3890 Units erhalten werden, was einer Ausbeute von 86,5 % entspricht. Da die Proteinprobe nun Imidazol enthält, konnte hier keine Bestimmung des Proteingehalts durchgeführt werden, da Imidazol das Ergebnis verfälscht. Durch chromatographisches Umpuffern nach dem Prinzip der Gelfiltration konnte der Gesamtproteingehalt der Probe auf 141 mg reduziert werden. Die Gesamtaktivität lag nach der Umpufferung bei 3125 Units, was einer Ausbeute von etwa 70 % entspricht. Die spezifische Aktivität konnte dabei auf 22,2 U/mg gesteigert werden; das Enzym wurde 2,8-fach angereichert.

5.3 Charakterisierung der DMDH aus *L. lactis*

5.3.1 Bestimmung der Enzymaktivität

Die Messungen zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden in Kunststoffküvetten der Schichtdicke 1 cm bei 30°C in einem Photometer durchgeführt (siehe II.14.2). Die Reaktionsansätze werden zunächst gut durchmischt, temperiert und der Nullabgleich eingestellt. Durch Zugabe von 100 µl des Substrates (D-Mandelat, 100 mM) wurde die Reaktion gestartet. Während der Messdauer von einer Minute wurde die Zunahme der NADH+H⁺-Konzentration bei 340 nm verfolgt. Die Menge an entstandenem NADH ist der Menge an umgesetztem Substrat äquivalent. Der Assay zur Bestimmung der Mandelat-DH-Aktivität enthielt 500 µl Tris/HCl-Puffer (200 mM, pH 9), 30 µl NAD⁺ (36 mM), 270 µl H₂O_{deion.} und 100 µl des mit Messpuffer verdünnten Enzyms. Für die Mandelat-DH konnte hierbei für das Substrat D-Mandelat eine Volumenaktivität von 249,8 U/ml bestimmt werden. Die spezifische Aktivität betrug 7,9 U/mg. Für L-Mandelat konnte keine Aktivität gemessen werden.

5.3.2 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums (siehe II.16.5) der DMDH aus *L. lactis* wurde die Enzymaktivität in Anwesenheit verschiedener Puffer gemessen. Die Puffer deckten dabei einen pH-Bereich zwischen 3 und 12 ab. Abbildung III.57 zeigt die Enzymaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert.

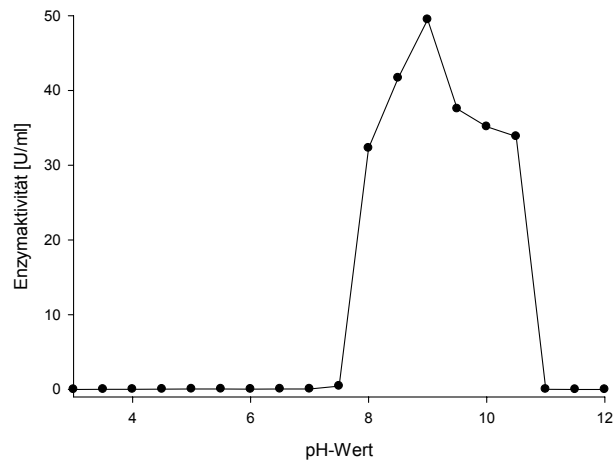


Abbildung III.57: Enzymaktivität der DMDH bei der Oxidation des Substrates D-Mandelat in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Aus obiger Abbildung geht deutlich hervor, dass das pH-Optimum der DMDH aus *L. lactis* für die Oxidation des Substrates D-Mandelat bei pH 9 liegt.

5.3.3 Bestimmung der maximalen Temperatur

Zur Bestimmung der maximalen Temperatur (siehe II.16.4) der DMDH aus *L. lactis* wurde das Enzym sowie der für Verdünnungen verwendete Puffer zehn Minuten bei verschiedenen Temperaturen (20-50°C) inkubiert. Nach der Entfernung denaturierter Proteine durch Zentrifugation wurde die Enzymaktivität bestimmt. Aus Abbildung III.58 geht hervor, dass das Temperatur-Optimum der DMDH aus *L. lactis* bei 30°C liegt. Das Enzym ist jedoch bis 40°C recht stabil, verliert allerdings ab einer Temperatur von 45°C schnell seine Aktivität. Bereits bei 50°C ist nur noch eine minimale Enzymaktivität messbar.

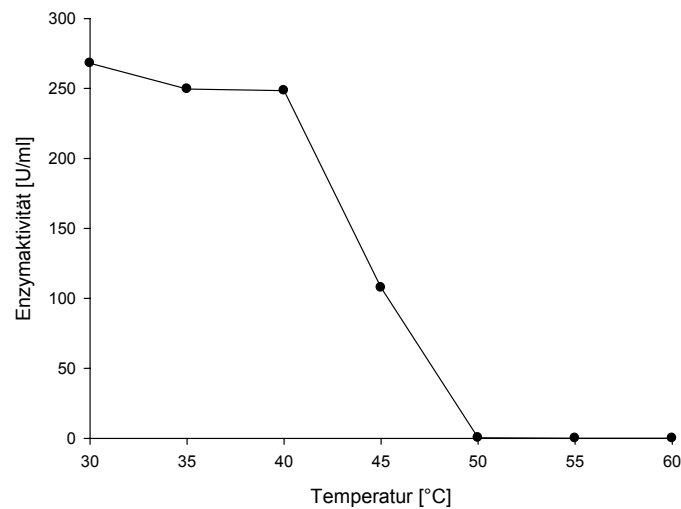


Abbildung III.58: Enzymaktivität der DMDH aus *L. lactis* in Abhängigkeit von der Temperatur.

5.3.4 Native PAGE und Gelfiltration zur Größenbestimmung

5.3.4.1 Native PAGE

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Mandelat-DH aus *L. lactis* wurde zunächst eine native PAGE durchgeführt (siehe II.16.6.2). Bei dieser Methode werden die Proteine nicht denaturiert und ihre Untereinheiten-Komposition kann so evaluiert werden. Abbildung III.59 zeigt das Ergebnis der nativen PAGE.

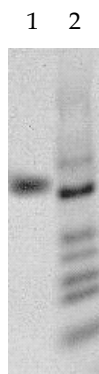


Abbildung III.59: Native PAGE zur Bestimmung des Molekulargewichts der Mandelat-DH aus *L. lactis*. Spur 1: Mandelat-DH aus *L. lactis*; Spur 2: Protein-Marker Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas).

Mit Hilfe der Eichgeraden aus III.2.10.1 konnten für die D-Mandelat-DH aus *L. lactis* ein Molekulargewicht von etwa 72 kDa errechnet werden. Nach der nativen PAGE zu urteilen, liegt die D-Mandelat-DH aus *L. lactis*, deren Monomer ein Molekulargewicht von 36 kDa hat, als Dimer vor.

5.3.4.2 Gelfiltration

Ebenso wie eine native PAGE kann eine Gelfiltration zur Bestimmung des Molekulargewichts eines Proteins herangezogen werden (siehe II.16.6.1). Zur Gelpermeations-chromatographie wurde eine Superdex-S200 HR-Säule verwendet. Die Probe wurde in einer Konzentration von 4 mg/ml auf die Säule aufgetragen. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min. Das Ergebnis der Gelfiltration ist in Abbildung III.60 dargestellt.

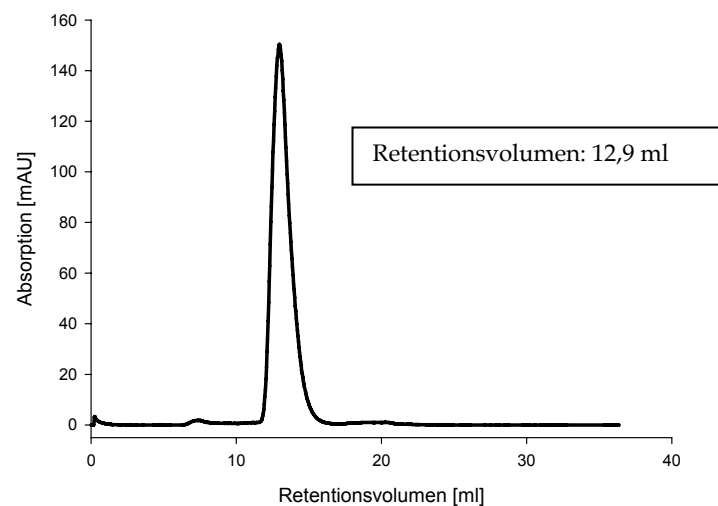


Abbildung III.60: Elutionsdiagramm der Mandelat-DH von der Superdex-S200HR-Säule. Die Abbildung wurde mit dem Programm SigmaPlot erstellt.

Das Retentionsvolumen der D-Mandelat-DH betrug 12,9 ml. Mit Hilfe der Eichgeraden aus III.2.10.2 konnte für die D-Mandelat-DH ein Molekulargewicht von etwa 72,8 kDa ermittelt werden. Auch das Ergebnis der Gelfiltration zeigt, dass die Mandelat-DH aus *L. lactis* als Dimer vorliegt.

5.3.5 Isoelektrische Fokussierung

Anhand der Aminosäuresequenz konnte für die D-Mandelat-Dehydrogenase aus *L. lactis* ein pI von 5,29 ermittelt werden⁶. Abbildung III.61 zeigt die isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung des pI der DMDH.

⁶ <http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>

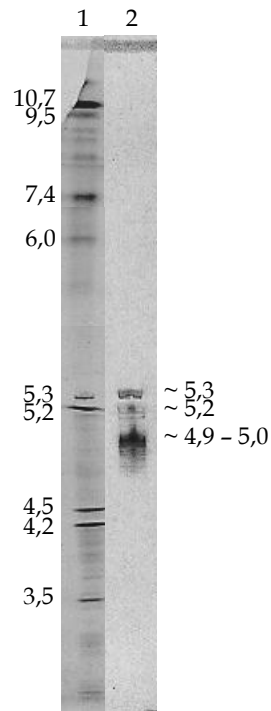


Abbildung III.61: Isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung des pI der DMDH aus *L. lactis*. Spur 1: Marker IEF Markers 3-10, lyophilized (Serva).

Bei der isoelektrischen Fokussierung der DMDH aus *L. lactis* sind verschiedene Banden zu erkennen, jedoch liegen alle in einem pH-Bereich von 4,9 bis etwa 5,3. Im Falle der DMDH konnte der pI also nicht eindeutig bestimmt werden, allerdings kann man sagen, dass er im pH-Bereich zwischen 4,9 und 5,3 liegt, was dem theoretisch ermittelten pI von 5,29 entspricht.

5.3.6 Bestimmung der kinetischen Parameter der MDH aus *L. lactis*

5.3.6.1 K_m -Wert für D-Mandelat, Wechselzahl k_{cat} und katalytische Effizienz K_m/k_{cat}

Die Lineweaver-Burk-Plots zur Bestimmung des K_m -Wertes der MDH aus *L. lactis* für D-Mandelat sind in Abbildung III.62 dargestellt.

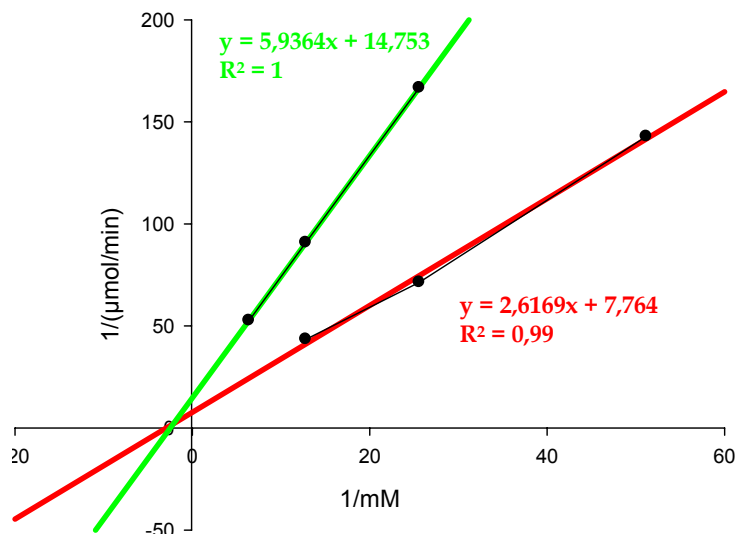


Abbildung III.62: Lineweaver-Burk-Plots zur Bestimmung des K_m -Werts der DMDH aus *L. lactis* für D-Mandelat.

Für das Substrat D-Mandelat konnte für die DMDH aus *L. lactis* ein K_m -Wert von 0,37 mM (\pm 0,03 mM) ermittelt werden. Mit einem Molekulargewicht von etwa 72000 g/mol und einer spezifischen Aktivität von 0,37 mol/(s x g) ergibt sich für die Wechselzahl k_{cat} ein Wert von 26640. Für die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m ergibt sich somit ein Wert von 72000.

5.3.6.2 K_m -Wert für NAD⁺

Die Lineweaver-Burk-Plots zur Bestimmung des K_m -Werts der MDH für NAD⁺ sind in Abbildung III.63 dargestellt.

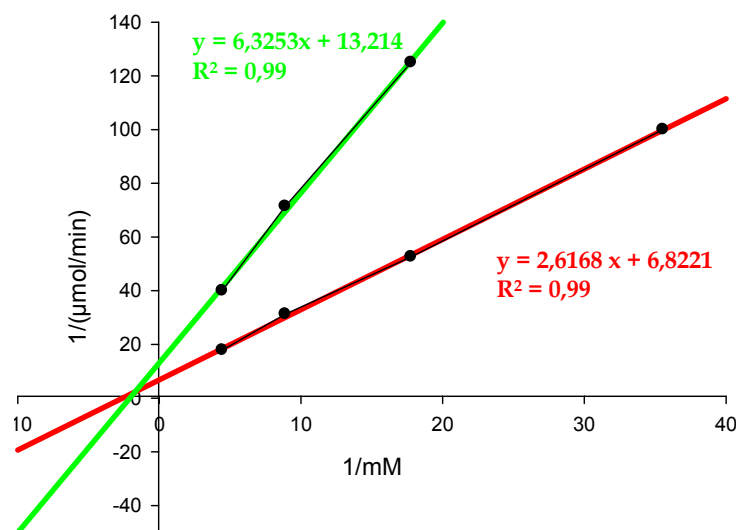


Abbildung III.63: Lineweaver-Burk-Plot zur Bestimmung des K_m -Werts der DMDH für NAD⁺.

Aus obiger Abbildung ergibt sich für die DMDH ein K_m -Wert für NAD^+ von 0,43 mM ($\pm 0,04$ mM). Tabelle III.16 fasst die kinetischen Parameter der MDH aus *L. lactis* zusammen.

Tabelle III.16: Kinetische Parameter der DMDH aus *L. lactis*.

	K_m [mM]	k_{cat}	k_{cat}/K_m
D-Mandelat	0,37	26640	72000
NAD^+	0,43		

6. Verbesserung der Löslichkeit der MDH aus *P. putida*

6.1 Nachweis der LMDH-Aktivität in der Vesikelfraktion von *P. putida* und von rekombinantem *E. coli*

Zur Bestimmung der Enzymaktivität des Membranproteins LMDH aus *P. putida* in der Vesikelfraktion von *P. putida* und *E. coli* (siehe II.9.2) wurde zunächst eine Vorkultur beimpft, indem 5 ml Nährlösung mit 100 μl einer Glycerinkultur versetzt und über Nacht bei 28°C auf dem Rundschtüttler inkubiert wurden. Mit dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur beimpft, die für weitere zwölf Stunden bei 28°C auf dem Rundschtüttler inkubiert wurde. Danach wurden die Zellen bei 6000 \times g und 4°C abzentrifugiert und in Kaliumphosphatpuffer gewaschen. Die Zellen wurden schließlich mittels Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. Durch Ultrazentrifugation konnte die Vesikelfraktion pelletiert werden. Die Bestimmung der Enzymaktivität basiert auf der Reduktion von DCPIP, die photometrisch bei 600 nm verfolgt werden kann (siehe II.14.2). Für die LMDH in der Vesikelfraktion von *P. putida* konnte eine Volumenaktivität von 7,5 U/ml gemessen werden. Bei einem Proteingehalt von 3,7 mg/ml ergibt sich eine spezifische Aktivität von etwa 2 U/mg. In der Vesikelfraktion von *E. coli* konnte hingegen keine Enzymaktivität gemessen werden.

6.2 Deletion der Aminosäuren 177-215 bzw. 177-229 der LMDH aus *P. putida*

Die LMDH aus *P. putida* ist ein Membranprotein und wird in *E. coli* ausschließlich als unlösliches Protein in der Pelletfraktion exprimiert, in der Vesikelfraktion ist keine Aktivität nachweisbar. Durch Sequenzvergleiche mit Enzymen aus der gleichen Familie konnte ein Bereich der LMDH identifiziert werden, der vermutlich für die Membranbindung des Enzyms verantwortlich ist (Mitra et al., 1993). Nach diesen Ergebnissen wurden durch SOE-

PCR (siehe II.7.1.2) zwei Deletionsmutanten erzeugt. Bei einer Mutante wurden die Aminosäuren 177-215 deletiert (177-215 Δ), bei der anderen die Aminosäuren 177-229 (177-229 Δ). Für die ersten SOE-Reaktionen wurden die Primer LMDH_CHis_f und LMDH_177-215 Δ _P2 bzw. LMDH_177-215 Δ _P3 und LMDH_CHis_r verwendet. Die Fragmente aus der ersten SOE-PCR wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe II.6.3) und aus dem Gel reisoliert (siehe II.6.4). Die PCR-Produkte aus der ersten PCR wurden als Template für die *Assembly*-PCR mit den Primer LMDH_CHis_f und LMDH_CHis_r verwendet, deren PCR-Produkt zur heterologen Expression in den Expressionsvektor pET-24a(+) einkloniert wurde (siehe II.6.5.2). Mit Hilfe der verwendeten Primer wurde neben den Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI ein C-terminaler His₆-Tag an das PCR angefügt. In Tabelle III.17 sind die erwarteten und erhaltenen Fragmentgrößen zusammengefasst.

Tabelle III.17: Erwartete Fragmentgrößen der SOE-PCR zur Konstruktion der beiden LMDH-Deletionsmutanten 177-215 Δ und 177-229 Δ sowie das errechnete Molekulargewicht der resultierenden Proteine.

Variante	SOE I	SOE II	Molekulargewicht des Proteins
LMDH 177-215 Δ	548 bp und 561 bp	1114 bp	40,033 kDa
LMDH 177-229 Δ	561 bp und 535 bp	1072 bp	38,456 kDa

Zuletzt wurden elektrokompente *E. coli* BL21Gold(DE3)-Zellen mit dem rekombinanten Plasmid transformiert. Die Sequenzierung der Plasmide ergab die korrekte Sequenz der beiden Deletionsmutanten, welche in der Abbildung III.66 dargestellt ist. Die Anzucht der Zellen erfolgte wie unter II.8.1 beschrieben. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (siehe II.9.2), die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. Zur Expressionskontrolle wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (siehe II.12), deren Ergebnis in Abbildung III.64 dargestellt ist.

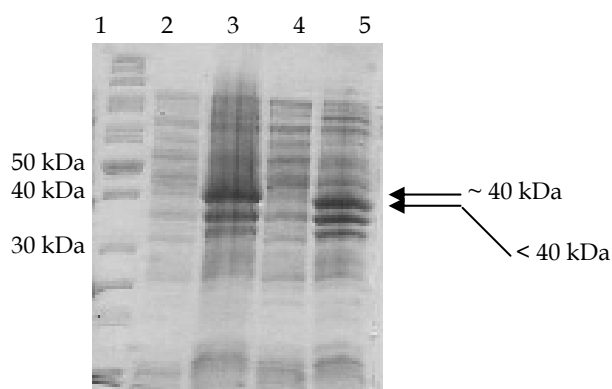


Abbildung III.64: SDS-Page zur Expressionskontrolle der beiden LMDH-Deletionsmutanten 177-215 Δ und 177-229 Δ . Spur 1: Protein-Marker Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas; Spur 2: LMDH 177-215 Δ , Rohextrakt; Spur 3: LMDH 177-215 Δ , Pellet; Spur 4: LMDH 177-229 Δ , Rohextrakt; Spur 5: 177-229 Δ , Pellet.

Mit Hilfe des Programms *VectorNTI* (Invitrogen) konnten die Molekulargewichte der beiden Deletionsmutanten berechnet werden. Für die Deletionsmutante 177-215 Δ beträgt das Molekulargewicht 40,033 kDa, die Deletionsmutante 177-229 Δ hat ein Molekulargewicht von 38,456 kDa. In obiger Abbildung ist in Spur 3 eine überexprimierte Bande bei etwa 40 kDa zu erkennen, die der ersten Deletionsmutante 177-215 Δ (361 AS) entspricht. Allerdings ist diese Bande nur in der Pelletfraktion zu sehen, nicht im Rohextrakt. Auch in Spur 5 ist eine überexprimierte Bande bei etwa 40 kDa zu erkennen. Dieses Protein scheint etwas kleiner zu sein als die Bande in Spur 3. Jedoch wird auch die zweite Deletionsmutante 177-229 Δ (347 AS) ausschließlich als unlösliche *inclusion bodies* in der Pelletfraktion exprimiert. Durch die Deletion der mutmaßlichen Membranbindedomäne konnte die Löslichkeit der LMDH nicht verbessert werden. Eine Enzymaktivität für das Substrat L-Mandelat ist ebenfalls nicht messbar.

6.3 Konstruktion der chimären Proteine MDH/GOX_1 und MDH/GOX_2

Ein zweiter Ansatz zur Verbesserung der Löslichkeit der LMDH aus *P. putida* ist der Ersatz der Membranbindedomäne der LMDH durch den korrespondierenden Teil der Glykolat-Oxidase aus *Spinacia oleracea* (GOX). Ein Sequenz-Alignment der Mitglieder der FMN-abhängigen α -Hydroxysäure-Dehydrogenasen/Reduktasen ist in Abbildung III.65 dargestellt. Zur Verbesserung der Löslichkeit der LMDH wurden zwei verschiedene chimäre Varianten konstruiert. Die erste basiert auf der Deletionsmutante LMDH_177-215 Δ , bei der die Aminosäuren 177-215 deletiert sind. In diesem Fall wurden die Aminosäuren 177-215 der LMDH gegen die Aminosäuren 176-195 der Glykolat-Oxidase aus Spinat ersetzt. Eine zweite Chimäre basiert auf der Deletionsmutante LMDH_177-229 Δ . Hier wurden die Aminosäuren 177-299 der LMDH gegen die Aminosäuren 176-209 der Glykolat-Oxidase aus Spinat ersetzt. Erstere wird im Folgenden als MDH/GOX_1 bezeichnet, letztere als MDH/GOX_2. Beide Varianten wurden mit Hilfe der SOE-PCR erzeugt (siehe II.7.1.2). Für die Variante MDH/GOX_1 wurden die beiden SOE I-Produkte mit den Primern MDH/GOX_f und MDH/GOX_1_P2_r bzw. MDH/GOX_1_P3_LMDH und LMDH_CHis_r erzeugt. Die *Assembly*-PCR wurde schließlich mit den beiden Primern MDH/GOX_f und LMDH_CHis_r durchgeführt. Die zweite Chimäre MDH/GOX_2 wurde mit den Primern MDH/GOX_f und MDH/GOX_2_P2_r bzw. MDH/GOX_2_P3_r und LMDH_CHis_r erzeugt. Entsprechend wurde die *Assembly*-PCR mit den Primern MDH/GOX_f und LMDH_CHis_r erzeugt. Mit Hilfe dieser Primer wurden die Schnittstellen der beiden Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI an die PCR-Produkte eingefügt. Gleichzeitig wurde am C-Terminus ein His₆-Tag zur

vereinfachten Anreicherung angefügt. Aufgrund der Verwendung der *Phusion™ Taq DNA-Polymerase* (Finnzymes) und der Schmelztemperaturen, die alle über 72°C lagen, wurden Primer-Annealing und Elongation bei 72°C durchgeführt.

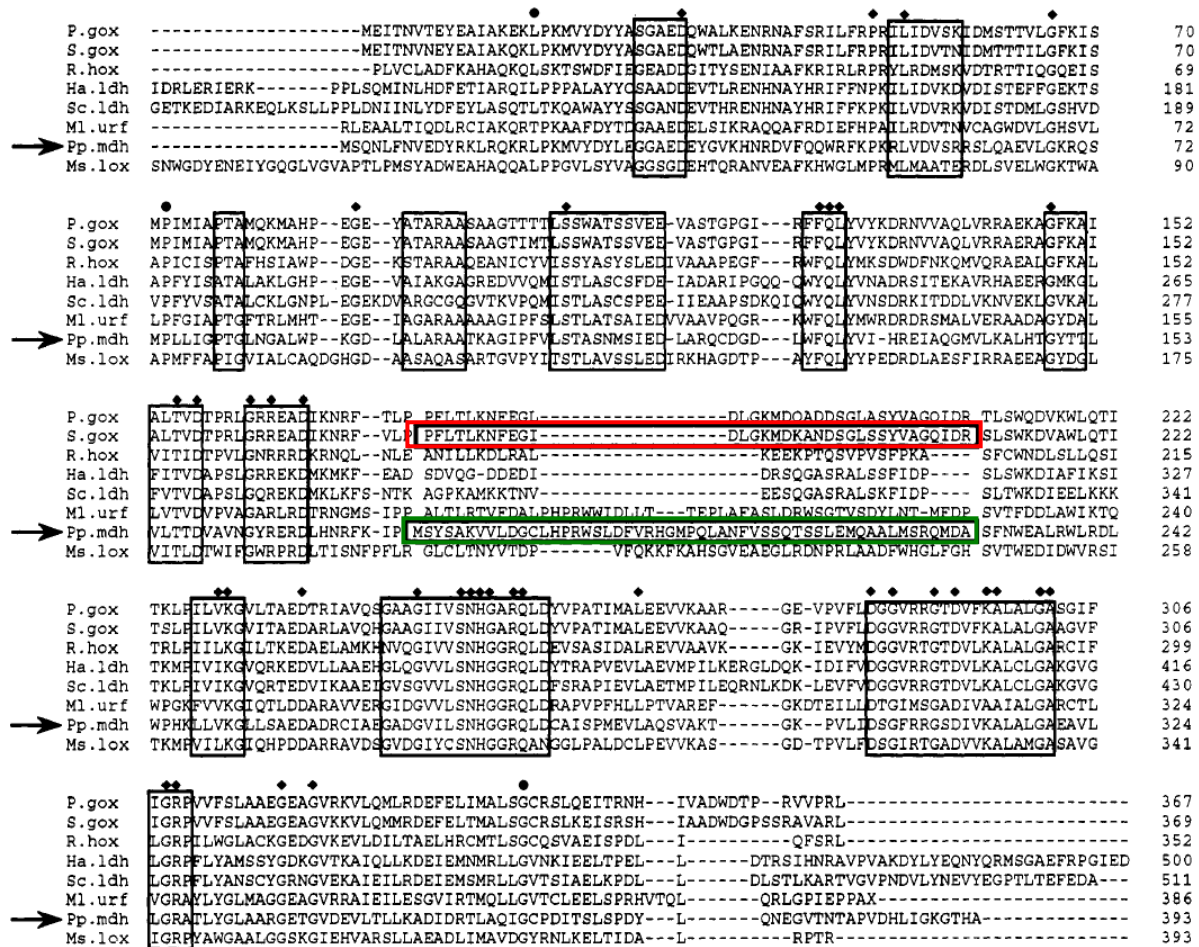


Abbildung III.65: Sequenz-Alignment der Mitglieder der FMN-abhängigen α -Hydroxysäure-Dehydrogenasen/Reduktasen. P.gox: Glykolat-Oxidase aus Kürbis (Tsugeki et al., 1993); S.gox: Glykolat-Oxidase aus Spinat (Volokita und Somerville, 1987); R.hox: (s)-2-Hydroxysäure-Oxidase aus Ratte (Diep Le und Lederer, 1991); Ha.ldh: L-Lactat-Dehydrogenase aus *Hansenula anomala* (Risler et al., 1989); Sc.ldh: L-Lactat-Dehydrogenase aus *Saccharomyces cerevisiae* (Guiard, 1985); Ml.urf: unbekannter *open reading frame* von *Mycobacterium leprae* (D.R. Smith, *GenBank Database Accession No.* LO1095, 1992); Pp.mdh: MDH aus *P. putida* (Tsou et al., 1990); Ms.lox: Lactat-2-Monooxygenase aus *Mycobacterium smegmatis* (Giegel et al., 1990). Die Rauten markieren solche Stellen, die in allen acht Proteinen identisch sind. Die Sequenzen, die durch die Boxen markiert sind, sind Regionen hoher Identität/Ähnlichkeit. Die grün umrandete Stelle markiert diejenige Sequenz, die für die Membranbindung verantwortlich ist. Die rot umrandete Sequenz stellt den entsprechenden Teil der löslichen Glykolat-Oxidase aus Spinat dar, gegen die die Membranbindedomäne im chimären Protein ersetzt wurde. Quelle: Mitra und Gerlt, 1993.

Tabelle III.18: Erwartete Fragmentgrößen der SOE-PCR zur Konstruktion der beiden LMDH-GOX-Chimären MDH/GOX_1 und MDH/GOX_2 sowie das Molekulargewicht der resultierenden Proteine.

Variante	SOE I	SOE II	Molekulargewicht des Proteins
MDH/GOX_1	583 bp und 601 bp	1172 bp	42,266 kDa
MDH/GOX_2	637 bp und 550 bp	1172 bp	42,139 kDa

Die erwarteten und erhaltenen Fragmentgrößen während der SOE-PCR sowie die errechneten Molekulargewichte der Proteine sind in Tabelle III.18 zusammengefasst.

6.4 Klonierung und Expression der beiden chimären Proteine in *E. coli* und Bestimmung der Enzymaktivität

Die beiden SOE-Produkte der *Assembly*-PCR wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI verdaut, aufgereinigt und mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Fermentas) mit dem mit den gleichen Restriktionsenzymen verdauten Expressionsvektor pET-24a(+) verbunden (siehe II.6.5.2). Elektrokompente *E. coli* BL21Gold(DE3)-Zellen wurden mit den rekombinanten Plasmiden transformiert und zur Selektion auf LB_{Kan}-Platten ausplattiert (siehe II.6.7). Die so erhaltenen Kolonien wurden mittels *Colony*-PCR auf ein Insert korrekter Größe überprüft (siehe II.6.5.3). Aus den Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe II.6.1.1) und sequenziert (siehe II.6.6). Abbildung III.66 zeigt ein Aligment der verschiedenen Varianten auf Aminosäureebene.

	5 15 25 35 45
LMDH	MSQNLFNVEDYRKLRLQKRLPKMVYDYLEGGAEDEYGVKHNDRDVFQQWRFK
LMDH 177-215Δ	MSQNLFNVEDYRKLRLQKRLPKMVYDYLEGGAEDEYGVKHNDRDVFQQWRFK
LMDH 177-229Δ	MSQNLFNVEDYRKLRLQKRLPKMVYDYLEGGAEDEYGVKHNDRDVFQQWRFK
MDH/GOX_1	MSQNLFNVEDYRKLRLQKRLPKMVYDYLEGGAEDEYGVKHNDRDVFQQWRFK
MDH/GOX_2	MSQNLFNVEDYRKLRLQKRLPKMVYDYLEGGAEDEYGVKHNDRDVFQQWRFK

	55 65 75 85 95
LMDH	PKRLVDVSRRLQAEVLGKRQSMPLLIIGPTGLNGALWPKGDLALARAATK
LMDH 177-215Δ	PKRLVDVSRRLQAEVLGKRQSMPLLIIGPTGLNGALWPKGDLALARAATK
LMDH 177-229Δ	PKRLVDVSRRLQAEVLGKRQSMPLLIIGPTGLNGALWPKGDLALARAATK
MDH/GOX_1	PKRLVDVSRRLQAEVLGKRQSMPLLIIGPTGLNGALWPKGDLALARAATK
MDH/GOX_2	PKRLVDVSRRLQAEVLGKRQSMPLLIIGPTGLNGALWPKGDLALARAATK

	105 115 125 135 145
LMDH	AGIPFVLSTASNMSIEDLARQCDGDLWFQLYVIHREIAQGMVLKALHTGY
LMDH 177-215Δ	AGIPFVLSTASNMSIEDLARQCDGDLWFQLYVIHREIAQGMVLKALHTGY
LMDH 177-229Δ	AGIPFVLSTASNMSIEDLARQCDGDLWFQLYVIHREIAQGMVLKALHTGY
MDH/GOX_1	AGIPFVLSTASNMSIEDLARQCDGDLWFQLYVIHREIAQGMVLKALHTGY
MDH/GOX_2	AGIPFVLSTASNMSIEDLARQCDGDLWFQLYVIHREIAQGMVLKALHTGY

	155 165 175 185 195
LMDH	TTLVLTDDVAVNGYRERDLHNRFKIPMSYSAKVVLDGCLHPRWSLDFVRH
LMDH 177-215Δ	TTLVLTDDVAVNGYRERDLHNRFKIP.....
LMDH 177-229Δ	TTLVLTDDVAVNGYRERDLHNRFKIP.....
MDH/GOX_1	TTLVLTDDVAVNGYRERDLHNRFKIP.....PFLTL
MDH/GOX_2	TTLVLTDDVAVNGYRERDLHNRFKIP.....PFLTL



Abbildung III.66: Alignment der beiden Deletionsmutanten LMDH 177-196 Δ und LMDH177-210 Δ sowie der beiden chimären Protein MDH/GOX_1 und MDH/GOX_2 auf Aminosäureebene. Gelb markiert sind die Anteile der LMDH, grün markiert sind die Anteile der Glykolat-Oxidase aus Spinat (GOX).

Die Anzucht der Zellen und die Herstellung zellfreier Rohextrakte erfolgten wie unter II.8.1 beschrieben. Abbildung III.67 zeigt ein SDS-Gel zur Expressionskontrolle der beiden Chimären.

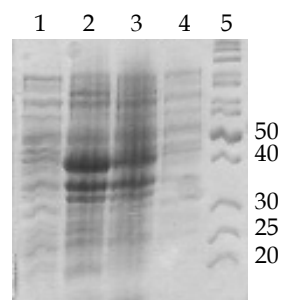


Abbildung III.67: SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der beiden MDH/GOX-Chimären. Spur 1: MDH/GOX_1, Rohextrakt, Spur 2: MDH/GOX_1, Pellet; Spur 3: MDH/GOX_2, Pellet; Spur 4: MDH/GOX_2, Rohextrakt; Spur 5: Marker *PageRuler Unstained Protein Ladder*, Fermentas.

Auch im Falle der beiden Chimären ist im Rohextrakt (Spuren 1 und 4) keine Bande entsprechender Größe (etwa 42 kDa) zu erkennen. Das rekombinante chimäre Protein ist nur

in den Spuren 2 und 3, also im Pellet als unlösliches Protein zu erkennen. Für MDH/GOX_1 und MDH/GOX_2 konnte keine Aktivität gemessen werden

7. Diaphorase aus *Clostridium kluyveri*

Im Rahmen des Projekts ERUDES P kann die Diaphorase den Elektronentransfer zwischen dem Cofaktor und dem Mediator verbessern, weshalb das Gen der Diaphorase aus *C. kluyveri* amplifiziert und heterolog exprimiert werden sollte, um das Enzym kostengünstig selbst produzieren zu können.

Der Begriff „Diaphorase“ bezieht sich auf eine allgegenwärtige Klasse von Enzymen mit kovalent gebundenem Flavinmolekül, die NADH-Dehydrogenase-Aktivität zeigen, wobei der Elektronenakzeptor generell ein synthetischer Farbstoff wie Methylblau oder 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) ist (Argyrou et al., 2003). Die Diaphorase aus *C. kluyveri* besteht aus 229 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 24,981 kDa pro Enzymuntereinheit. Das native Enzym ist ein Trimer mit einem Molekulargewicht von etwa 75 kDa. Das Protein besteht aus einer Flavin-Reduktase-ähnlichen Domäne und einer Rubredoxin-ähnlichen Domäne. Das Temperaturoptimum der Diaphorase liegt bei 40°C, das pH-Optimum bei 8 (Chakraborty et al., 2008). Eine Analyse des UV-Spektrums und eine Dünnschichtchromatographie zeigten, dass pro Diaphorase-Molekül ein FMN-Molekül als prosthetische Gruppe gebunden ist. Auch ein Eisenmolekül konnte detektiert werden (Chakraborty et al., 2008). Der K_m -Wert für NADH liegt laut Literatur bei 0,09 mM (natives Enzym, Kaplan et al., 1969) bzw. bei 0,15 mM (rekombinantes, His₆-getaggetes Enzym, Chakraborty et al., 2008).

7.1 Amplifikation des Diaphorase-Gens aus der genomischen DNA von *C. kluyveri*

Zur Amplifikation des Diaphorase-Gens aus der genomischen DNA von *Clostridium kluyveri* wurde die *Phusion*TM *High Fidelity* DNA Polymerase (Finnzymes) verwendet (siehe II.7.1.2). Diese Polymerase vereint Schnelligkeit und höchste Genauigkeit. Mit Hilfe der verwendeten Primer Diaphorase_f und Diaphorase_r konnten gleichzeitig die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Sal*I an das 690 bp lange Diaphorase-Gen angefügt werden. Die Amplifikation wurde im Agarose-Gel überprüft (siehe II.6.3), welches in Abbildung III.68 dargestellt ist.

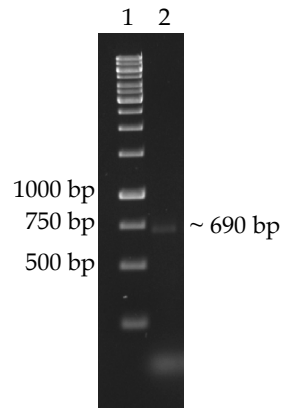


Abbildung III.68: Agarose-Gel zur Amplifikationskontrolle des Diaphorase-Gens aus der genomischen DNA von *C. kluyveri*. Spur 1: Marker *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder*, Fermentas; Spur 2: PCR-Produkt.

7.2 Klonierung des Diaphorase-Gens aus *C. kluyveri*

7.2.1 TOPO-TA-Klonierung des Diaphorase-Gens

Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit Hilfe des *NucleoSpin® Extract II*-Kits zur Reinigung von PCR-Produkten und zur Gelextraktion (Machery-Nagel) konzentriert und von Proteinen befreit (siehe II.6.4). Zur Vorbereitung auf die TOPO-TA-Klonierung müssen an das frische PCR-Produkt Adenin-Überhänge angehängt werden. Dies geschieht mit Hilfe der *Taq*-Polymerase (Axon), die nach Zugabe von dATP in einem zehnmütigen Elongationsschritt bei 72°C Adenin-Überhänge an das PCR-Produkt anhängt. Die TOPO-TA-Klonierung wurde wie unter II.6.5.1 beschrieben durchgeführt. Die Selektion der Zellen, die den rekombinanten TOPO-Vektor tragen, erfolgt über die Kanamycin-Resistenz und ein *Blue-White-Screening*. Verschiedene weiße Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von den Platten gepickt und mittels *Colony-PCR* (siehe II.6.5.3) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese (siehe II.6.3) auf die Anwesenheit des korrekten Inserts überprüft. Für die *Colony-PCR* wurden vektorspezifische Primer verwendet, weshalb zur Insert-Größe von 690 bp noch etwa 250 bp addiert werden müssen, um die zu erwartende Fragmentgröße zu bestimmen. Mit einem ausgewählten Klon, der nach dem Agarose-Gel zu urteilen das richtige Insert trug, wurde eine Vorkultur beimpft, um die Plasmid-DNA isolieren zu können (siehe II.6.1.1).

7.2.2 Klonierung des Diaphorase-Gens in den Expressionsvektor pET-24a(+)

Um die Diaphorase aus *C. kluyveri* in *E. coli* exprimieren zu können, muss das Diaphorase-Gen zunächst in den Expressionsvektor pET-24a(+) umkloniert werden (siehe II.6.5.2). Die so

erhaltenen Kolonien wurden mittels *Colony*-PCR auf das gesuchte Diaphorase-Insert überprüft (siehe II.6.5.3). Ein positiver Klon wurde ausgewählt, die Plasmid-DNA isoliert (siehe II.6.1.1) und sequenziert (siehe II.6.6).

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      5      15      25      35      45      55
Diaphorase ATGATTGATAATAAAGCATTATATAAACTAAGTTACGGCTTATATGTTATAAGCTCTATC
           M I D N K A F Y K L S Y G L Y V I S S I

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      65      75      85      95      105     115
Diaphorase TCTGAAGGTAAGAAAAATGGACAGATTGCCAATACAGTTTTTCAATAACATCAGATCCA
           S E G K K N G Q I A N T V F Q I T S D P

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     125     135     145     155     165     175
Diaphorase GCTAGAATTGCTGTAAGTATTAATAAACAAAATCTACTCATGAATATATACAAAAAGC
           A R I A V S I N K Q N L T H E Y I Q K S

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     185     195     205     215     225     235
Diaphorase AAGTTAATAGGGGTATCTGCCCTTCCACGAACTCCTTTAGAAATTTGTAGGTAAGTTT
           K L I G V S A L S T E T P L E F V G K F

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     245     255     265     275     285     295
Diaphorase GGGTTTAAATCCGGAAGAACTACTGATAAATTTCTGGAGTATCCTTCAAGGCAGGTGCA
           G F K S G R T T D K F S G V S F K A G A

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     305     315     325     335     345     355
Diaphorase AGTGGCGTTCCAATAGTTCTTGACAATGCCGCTTCATGGATTGAATTAAGTTGAAAAA
           S G V P I V L D N A A S W I E L K V E K

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     365     375     385     395     405     415
Diaphorase GAAATAGACATAGATACCCACACTATATTCGTTGAAAAGTACTTAATTCAGAATTAATA
           E I D I D T H T I F V G K V L N S E L I

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     425     435     445     455     465     475
Diaphorase AAGGATATAGATCCTATGACATATGCATATTATCAGGACGTAAAACGTGGTAAATCTCCA
           K D I D P M T Y A Y Y Q D V K R G K S P

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     485     495     505     515     525     535
Diaphorase CAGACCTCACCAACTCATGCAGCAAATAAAAATAATCCAGTAAAAGATGCTCCTAAATAT
           Q T S P T H A A N K N N P V K D A P K Y

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     545     555     565     575     585     595
Diaphorase CAATGTTCCGTATGTGGATTTATTTATGATCCTGCAGTTGGAGATCCTGACTCTGGTGTT
           Q C S V C G F I Y D P A V G D P D S G V

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     605     615     625     635     645     655
Diaphorase GAACCAGGTACATTATTTGAAGATTTGCCTAAGAGCTGGGAATGTCCAGTCTGTGGCGTA
           E P G T L F E D L P K S W E C P V C G V

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     665     675     685
Diaphorase GGCAAAGCAAAATTTAAACCTTTGGATTAA
           G K A K F K P L D *

```

Abbildung III.69: Anhand der Sequenzierung ermittelte Basensequenz des Diaphorase-Gens aus *Clostridium kluyveri*. Die Abbildung wurde mit dem Programm BioEdit erstellt.

Die Sequenzierung bestätigte die korrekte Sequenz und Orientierung des Diaphorase-Inserts im Expressionsvektor pET-24a(+). Das Diaphorase-Gen hat eine Länge von 690 bp. In Abbildung III.69 ist die aus der Basensequenz resultierende Aminosäuresequenz dargestellt.

7.3 Amplifikation N- bzw. C-terminal His₆-getaggtter Varianten des Diaphorase-Gens

Zur Erleichterung der Anreicherung sollte das Diaphorase-Gen mit C- bzw. N-terminalen Histidin₆-Tags versehen werden. Dies geschah während einer PCR mit Hilfe der Primer Diaphorase_NHis_f und Diaphorase_NHis_r für den N-terminalen His-Tag und mit den Primern Diaphorase_CHis_f und Diaphorase_CHis_r für den C-terminalen His-Tag. Sie enthalten hinter dem Startcodon für den N-terminalen His-Tag bzw. vor dem Stoppcodon für den C-terminalen His-Tag sechs mal ein Codon, das für die Aminosäure Histidin codiert (CAT), und schließlich noch ein Stück des Expressionsvektors und des Diaphorase-Gens um ein besseres Binden der Primer zu ermöglichen. Als Template diente hierbei eine Plasmid-Minipräparation eines pET-24a(+)-Expressionsvektors mit einkloniertem Diaphorase Gen. Zur Amplifikation wurde die *Phusion™ HighFidelity* DNA-Polymerase (Finnzymes) verwendet (siehe II.7.1.2). Zur Amplifikationskontrolle wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe II.6.3). Das Ergebnis ist in Abbildung III.70 dargestellt. Mit Hilfe der verwendeten Primer wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Sall* und *Bam*HI an das PCR-Produkt angefügt.

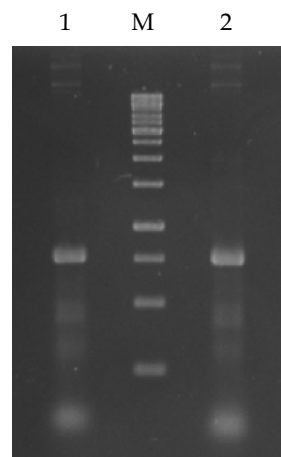


Abbildung III.70: 1,4 % TBE-Agarosegel zur Überprüfung der PCR-Amplifikation Varianten des Diaphorase-Gens mit N- bzw. C-terminalem Histidin₆-Tag. Spur 1: PCR-Produkt mit C-terminalem His-Tag; Spur 2: PCR-Produkt mit N-terminalem His-Tag; Spur M: Marker *GeneRuler* 1 kb-DNA-Leiter (Fermentas).

Die PCR ergab eine Bande bei etwa 710 bp. Die gewünschte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und reisoliert (siehe II.6.4).

7.4 Klonierung Histidin₆-getaggtter Varianten des Diaphorase-Gens

Um die Diaphorase mit C- bzw. N-terminalem His₆-Tag in *E. coli* exprimieren zu können, musste das his-getaggte Diaphorase-Gen zunächst in den Expressionsvektor pET-24a(+) kloniert werden (siehe II.6.5.2). Die frisch aus dem Gel reisolierten (siehe II.6.4) PCR-Produkte wurden hierzu mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I verdaut und anschließend gereinigt, um die Restriktionsendonukleasen vollständig zu entfernen. Die PCR-Fragmente wurden mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase (Fermentas) ohne vorherige TOPO-TA-Klonierung direkt in den Expressionsvektor pET-24a(+) einkloniert. Schließlich wurden elektrokompetente *E. coli* BL21(DE3)Gold-Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert (siehe II.6.7), auf LB_{Kan}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die so erhaltenen Kolonien wurden mittels *Colony*-PCR (siehe II.6.5.3) auf das gesuchte Diaphorase-Insert mit C- bzw. N-terminalem His₆-Tag überprüft. Aus den zahlreichen Klonen, die das richtige Insert trugen wurde pro Variante ein Klon ausgewählt, die Plasmid-DNA isoliert (siehe II.6.1.1) und sequenziert (siehe II.6.6), um die richtige Position und das Vorhandensein des His₆-Tags zu überprüfen. Die Sequenzierung ergab die korrekte Sequenz und Orientierung des C- bzw. N-terminal His₆-getaggtten Diaphorase-Gens.

7.5 Heterologe Expression des Diaphorase-Gens und der his-getaggtten Varianten

Zur heterologen Expression des Diaphorase-Gens in *E. coli* BL21(DE3)Gold wurde zunächst eine Vorkultur erstellt, indem 5 ml Komplexmedium mit Kanamycin entweder mit 5 µl einer Glycerinkultur oder mit einer Kolonie von einer LB_{Kan}-Masterplatte beimpft wurde. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C auf dem Rundschüttler (220 rpm) inkubiert. Für eine 250 ml-Hauptkultur wurde mit der gesamten Vorkultur angeimpft. Für kleinere Testansätze genügte es, ein Hauptkulturvolumen von 25 ml mit 250 µl der Vorkultur anzupfen. Nach weiterer Inkubation auf dem Rundschüttler bei 37°C und 220 rpm für ca. drei Stunden hatten die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,2 erreicht und die Expression des Diaphorase-Gens konnte induziert werden (siehe II.8.1). Nach weiteren 18 bis 20 Stunden Wachstum bei 20°C, 28°C und 37°C wurden die Zellen geerntet. Das Pellet wurde in Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,4) resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (siehe II.9.1). Durch Zentrifugation bei 14000 rpm wurden die Zelltrümmer entfernt. Die Rohextrakt- und Pelletproben wurden für die SDS-PAGE vorbereitet (siehe II.12). Das SDS-Polyacrylamidgel zur Expressionskontrolle der Diaphorase bei unterschiedlichen Temperaturen ist in Abbildung III.71 dargestellt.

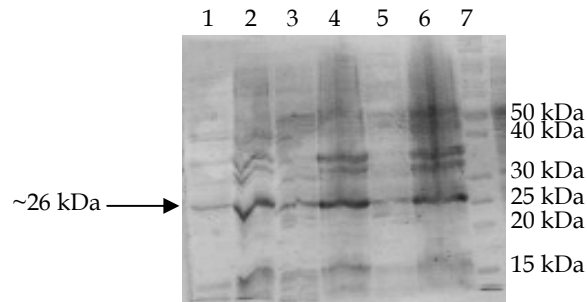


Abbildung III.71: SDS-PAGE zur Expressionskontrolle der Diaphorase mit C-terminalem His₆-Tag bei unterschiedlichen Temperaturen. Spur 1: 20°C, Rohextrakt; Spur 2: 20°C, Pellet; Spur 3: 28°C, Rohextrakt, Spur 4: 28°C, Pellet; Spur 5: 37°C, Rohextrakt, Spur 6: 37°C, Pellet, Spur 7: Marker *Page Ruler Unstained Protein Ladder*, Fermentas.

Generell ist in allen Fraktionen nur eine sehr geringe Überexpression der Diaphorase bei etwa 26 kDa zu erkennen, wobei die Expression im Rohextrakt bei einer Inkubation nach der Induktion bei 28°C noch am stärksten zu sein scheint. Alle weiteren Experimente zur Expression der Diaphorase wurden deshalb bei 28°C durchgeführt.

7.6 Anreicherung heterolog exprimierter Diaphorase

Die Anreicherung der überexprimierten, his-getaggten Diaphorase erfolgte über Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (siehe II.10.3). Dabei wurde ein zweistufiger Imidazol-Gradient verwendet. Zunächst wurde ein Waschschrift mit 15 % Imidazol über wenige Fraktionen durchgeführt, um Proteine, die unspezifisch an die Säule gebunden hatten, zu eluieren. Anschließend wurde die his-getaggte Diaphorase mit 100 % Imidazol eluiert. Die Diaphorase-Aktivität gegenüber DCPIP wurde bestimmt, indem die Extinktionsabnahme bei 600 nm verfolgt wurde (modifiziert nach Chakraborty et al., 2008). Der Ansatz enthielt folgende Komponenten: 2,6 ml 200 mM Tris/HCl (pH 8,5), 0,1 ml 120 mM ZnSO₄, 0,1 ml 6 mM NADH und 0,1 ml 2,4 mM DCPIP. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl verdünnter Enzymlösung gestartet (siehe II.14.2). Ein *Unit* Enzymaktivität wurde als die Menge an Enzym definiert, die 1 µmol DCPIP pro Minute bei 25°C und pH 8,5 reduziert. Im Rohextrakt konnten 118 U/ml gemessen werden, wobei dieser Wert nicht die alleinige Aktivität der Diaphorase repräsentiert, da im Rohextrakt zahlreiche andere Enzyme vorhanden sind, die NADH in irgendeiner Weise umsetzen bzw. verbrauchen. Die spezifische Aktivität betrug 19,6 U/mg. Pro Lauf wurden 15 ml Rohextrakt auf die Säule aufgetragen. Abbildung III.72 zeigt das Elutionsdiagramm der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose. Im Diagramm dargestellt sind die Absorption bei 280 nm (Proteine), bei

450 nm (kovalent gebundenes FMN der Diaphorase) und der Anteil an Elutionspuffer im Gradienten.

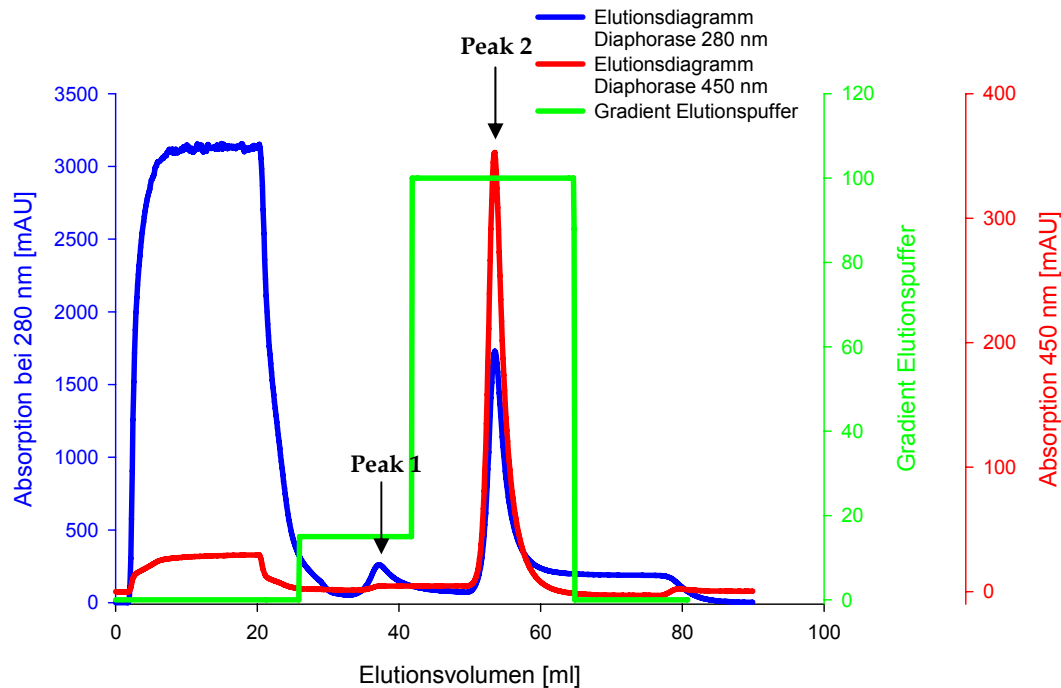


Abbildung III.72: Elutionsdiagramm der Diaphorase nach Affinitätschromatographie an Nickelsepharose. Die blaue Kurve zeigt die Absorption bei 280 nm (Proteine), die rote Kurve die Absorption bei 450 nm (kovalent gebundenes FAD der Diaphorase). In grün ist der Imidazol-Gradient dargestellt.

Während des Waschschritts mit 15% Imidazol wurden wenige unspezifisch gebundene Proteine von der Säule gewaschen (Peak1), wobei jedoch keine Absorptionssteigerung bei 450 nm zu erkennen ist. Bei diesen Proteinen handelt es sich also um Proteine ohne kovalent gebundenes FMN. Nachdem der Imidazol-Gradient auf 100% erhöht wurde, steigt die Absorption bei 280 nm und bei 450 nm (Peak 2), was auf die Elution der Diaphorase hindeutet. Nach der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose wurde die Diaphorase mittels Gelfiltration in Natriumphosphat-Puffer umgepuffert (50 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4). Die Enzymaktivitäten nach den verschiedenen Anreicherungs-schritten sind in Tabelle III.19 zusammengefasst.

Tabelle III.19: Anreicherungstabelle der Diaphorase mit C-terminalem His₆-Tag.

	Gesamt-aktivität [U]	Gesamt-protein [mg]	spezifische Aktivität [U/mg]	Anreicherung [x-fach]	Ausbeute [%]
Rohextrakt	2476	126	19,6	1	100
HisTrap	1556				63
Umpufferung	507	1,4	362,1	18,5	21

Im Rohextrakt betrug die spezifische Aktivität 19,6 U/mg. Nach der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose betrug die Gesamtaktivität 1556 U. Während der Umpufferung mittels Gelfiltration betrug die Gesamtaktivität nur noch 507 Units, also etwa ein Drittel der Gesamtaktivität nach der Affinitätschromatographie. Die spezifische Aktivität konnte jedoch auf 362 U/mg gesteigert werden. Das Enzym wurde 18,5-fach angereichert. In Abbildung III.73 ist die SDS-PAGE zur Expressions- und Reinheitskontrolle dargestellt.

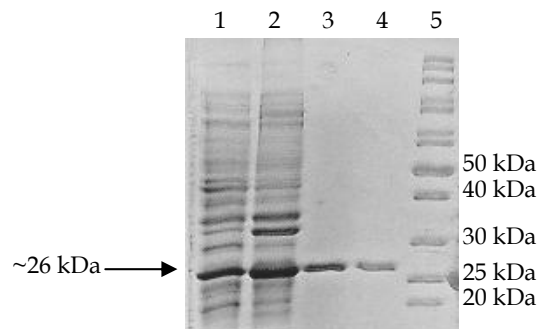


Abbildung III.73: SDS-PAGE zur Expressions- und Reinheitskontrolle der Diaphorase mit C-terminalem His₆-Tag. Spur 1: Rohextrakt; Spur 2: Pellet; Spur 3: Affinitätschromatographie an Nickelsepharose; Spur 4: Umpufferung durch Gelfiltration; Spur 5: Marker *Page Ruler Unstained Protein Ladder*, Fermentas.

In Abbildung III.73 ist deutlich eine überexprimierte Bande bei etwa 26 kDa zu erkennen. Die native Diaphorase hat ein Molekulargewicht von etwa 24 kDa pro Untereinheit, der C-terminale Histidin-Tag erhöht das Molekulargewicht um etwa 2 kDa. Hierbei scheint die Expression im Pellet (Spur 2) stärker zu sein als im Rohextrakt (Spur 1). Nach der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose (Spur 3) sind bereits keine Fremdproteine mehr zu erkennen. Der Verlust an reinem Enzym nach der Umpufferung schlägt sich auch deutlich im Gel nieder.

7.7 Bestimmung der kinetischen Parameter der Diaphorase

Die Lineweaver-Burk-Plots zur Bestimmung des K_m -Werts der Diaphorase aus *C. kluyveri* sind in Abbildung III.74 dargestellt. Aus obiger Abbildung geht für das Substrat NADH+H⁺ ein K_m -Wert der Diaphorase von 0,06 mM (\pm 0,009 mM). Bei einer spezifischen Aktivität von 6,035 mol / (s x g) und einem Molekulargewicht von 80943 g/mol ergibt sich für k_{cat} ein Wert von 488491. Somit liegt die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m bei 8141516. Tabelle III.20 fasst die kinetischen Parameter zusammen.

Tabelle III.20: Kinetische Parameter der Diaphorase aus *C. kluyveri* für das Substrat NADH+H⁺.

	K_m	k_{cat}	k_{cat}/K_m
NADH+H ⁺	0,06 mM	488491	8141516

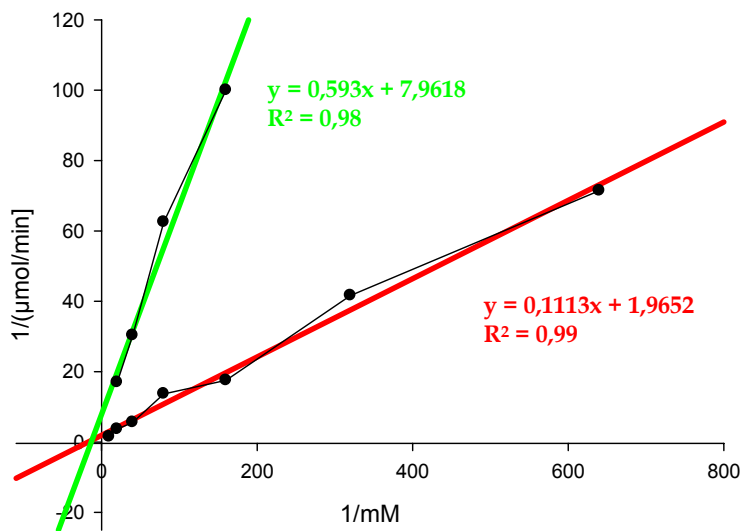


Abbildung III.74: Lineweaver-Burk-Plot zur Bestimmung des K_m -Werts der Diaphorase für das Substrat $\text{NADH}+\text{H}^+$.

7.8 Isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung des pI

Für die isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung des pI der Diaphorase wurden fertige pH-Gradientengele (Serva) benutzt. Der pH-Gradient im Gel reicht von 3 bis 10. Das Ergebnis ist in Abbildung III.75 dargestellt.

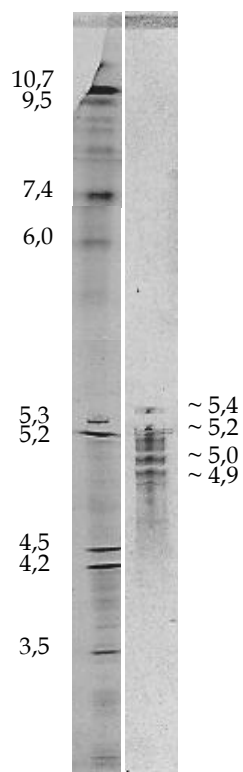


Abbildung III.75: Isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung des pI der Diaphorase. Spur 1: Marker *IEF Markers 3-10, lyophilized* (Serva).; Spur 2: Diaphorase.

Mit Hilfe des „*EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service*“ konnte der theoretische pI der Diaphorase berechnet werden. Er liegt bei einem pH-Wert von 7,81. Auch für die Diaphorase konnte der pI nicht eindeutig bestimmt werden. Im Gel sind verschiedene Banden zu erkennen. Sie liegen in einem pH-Bereich zwischen 4,9 und 5,4.

IV. Diskussion

Ziel des Projektes ERUDES (*„Development of electrochemical reactors using dehydrogenases for enantiopure synthon preparations“*) war die Konstruktion eines elektroenzymatischen Reaktors zur Synthese enantiomerenreiner Feinchemikalien. Auch mehrstufige Synthesen mit unterschiedlichen Enzymen sind durch das Hintereinanderschalten verschiedener Module denkbar. Abbildung I.10 zeigt eine schematische Darstellung des elektroenzymatischen Mikroreaktors im Reduktionsbetrieb.

Verschiedene Gruppen von Naturwissenschaftlern wirkten bei ERUDES mit. Eine Gruppe beschäftigt sich mit der Konstruktion und der Synthese von Mediatoren und Spacern, eine zweite Gruppe mit dem Elektrodenmaterial und der Elektrodenstruktur, mit dem Aufbau der elektrochemischen Zelle und der Konstruktion des Reaktors und weitere Gruppen mit der Entwicklung von geeigneten, funktionellen Oberflächen-Beschichtungen. Grundlegend auf der Arbeit der am Projekt beteiligten Kristallographen und Bioinformatiker sollten während dieser Arbeit die Enzyme, die als Modelle im Projekt dienen, durch Proteinengineering verbessert werden. Im Rahmen dieser Arbeit standen vor allem die Enzyme LSDH aus *B. japonicum*, die heterolog exprimiert und charakterisiert werden sollte, und GatDH aus *R. sphaeroides*, deren Stabilität durch verschiedene Ansätze verbessert werden sollte, im Vordergrund.

Mit Hilfe der LSDH ist durch den Umsatz von L-Sorbitol die Synthese verschiedener seltener Zucker möglich. Durch Oxidation an C2 entsteht L-Fructose, durch Oxidation an C5 entsteht D-Sorbose. Durch entsprechende Oxidation an C6 entsteht D-Gulose, durch Oxidation an C1 entsteht L-Glucose (Mayers-Küntzer, 1993). Da der von Mayers-Küntzer 1993 isolierte Stamm im Zuge der Archivierung seine LSDH-Aktivität verlor, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein neuer Stamm gefunden werden, der eine LSDH bzw. ein Enzym, das in einer Nebenaktivität L-Sorbitol in ausreichender Menge umsetzt, exprimiert. Das LSDH-Gen sollte isoliert und kloniert, das resultierende Enzym charakterisiert werden. Außerdem sollten erste Umsätze durchgeführt werden, um das Reaktionsprodukt mittels HPLC nachzuweisen.

Auch die Galaktitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* kann zur Synthese seltener Zucker eingesetzt werden. In der Vergangenheit wurde sie bereits zur Herstellung von L-Tagatose aus Galaktitol verwendet (Huwig et al., 1998). Zur Verbesserung der Stabilität GatDH, um ihre Anwendung im ERUDES-Reaktor zu ermöglichen, wurden verschiedene aussichtsreiche Methoden ausprobiert: die Zufallsmutagenese (*error-prone* PCR), die Iterative Sättigungsmutagenese (ISM), das rationale Design und die Einführung neuer Disulfid-Brücken am Dimer-Dimer-Interface durch gerichtete Evolution.

Die Klonierung, heterologe Expression und Anreicherung einer Diaphorase, die den Elektronentransfer zwischen einem Mediator und dem Cofaktor im ERUDESP-Reaktor verbessern sollte, war ebenfalls ein Ziel dieser Arbeit.

Zuletzt sollten zwei weitere Modellenzyme – die D-Mandelat-Dehydrogenase aus *Lactococcus lactis* (DMDH) und die L-Mandelat-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* (LMDH) – zum Projekt ERUDESP beigetragen werden. Das entsprechende Gen der DMDH sollte mit His₆-Tag kloniert, das Enzym angereichert und charakterisiert werden. Als Grundlage dienten dabei die Arbeiten von Chambellon et al. (2009). Aufgrund der Membranassoziation der LMDH sollten verschiedene Varianten zur Verbesserung der Löslichkeit des Enzyms konstruiert werden, wie sie bereits von Mitra et al. (1993) beschrieben wurden. Aufgrund ihres Anwendungspotentials für die Produktion enantiomerenreiner α -Hydroxysäuren, sind DMDH und LMDH für die Herstellung semi-synthetischer Antibiotika interessant (Hummel et al., 1988; Kim und Yun, 2004). Die lösliche DMDH ist NAD⁺-abhängig, die membrangebundene LMDH ist FMN-abhängig. Dies wiederum eröffnet die Möglichkeit, die verschiedenen Systeme in elektrochemischen Anwendungen zu vergleichen. Durch gezielte Modifikationen sollen die beiden Enzyme auch in diesem Projekt an Gold-Nanopartikeln direkt immobilisiert werden. Diese Gold-Nanopartikel dienen als Additive in den Sol-Gel-Schichten. Für die lösliche DMDH sollen hier dieselben Sol-Gel-Systeme verwendet werden wie sie bereits erfolgreich für die D-Sorbitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* angewandt wurden (Wang et al., 2010; Gajdzik et al., 2007). Für die membrangebundene LMDH soll diese Methode mit Vesikeln, die in der Sol-Gel-Matrix eingeschlossen sind, angewandt werden.

1. Screening von Boden-Organismen auf L-Sorbitol-Dehydrogenase-Aktivität und Identifizierung von K5

Es ist auf unterschiedlichen Wegen möglich, Mikroorganismen mit neuartigen Enzymeigenschaften aus der Natur zu isolieren. Eine Möglichkeit ist eine Anreicherung durch selektives Wachstum. Dabei wird ein bestimmtes Substrat als alleinige Kohlenstoffquelle eingesetzt, welches durch einen neuen Biokatalysator umgesetzt werden soll (Hummel, 1997; Torsvik et al., 2002). Hierbei kann es sich um ein konstitutiv gebildetes Enzym handeln, das Bestandteil des allgemeinen Kohlenstoffwechsels ist und in einer Nebenaktivität den essentiellen Abbau des neuen Substrats katalysiert (Kühn, 2004), oder die Enzymaktivität wird durch die eingesetzte Kohlenstoffquelle induziert (Cheetham, 1987; Morlock, 1976), da eine ähnliche Struktur wie die des natürlichen Substrats vorliegt (Kühn,

2004). Man spricht von Enzymevolution oder entarteter Evolution, wenn eine Mutante in einer Anreicherungskultur die Fähigkeit entwickelt, auf dem entsprechenden Substrat zu wachsen (Dykhuizen und Hartl, 1983; Hegeman und Rosenberg, 1970; Thompson und Krawiec, 1983).

Aufgrund der Biodiversität des Ökosystems eignet sich Erdboden besonders zur Isolierung von Mikroorganismen. Bereits in 1 cm³ Erdboden befinden sich Millionen von Mikroorganismen und tausende, potenziell unterschiedliche Spezies (Rossello-Mora und Amann, 2001; Torsvik und Ovreas, 2002; Kühn, 2004). So befinden sich in 1 cm³ Waldboden $4,8 \times 10^9$ Zellen, in der gleichen Menge Wiesenboden und Kulturboden $1,8 \times 10^{10}$ bzw. $2,1 \times 10^{10}$ Zellen (Torsvik et al., 2002). Bei Störungen des ökologischen Gleichgewichts können diese Zahlen jedoch variieren (Kozdroj und van Elsas, 2001). Insgesamt sind allerdings weniger als 1% der unter dem Mikroskop beobachteten Mikroorganismen kultivierbar (Amann et al., 1995), weshalb heute vermehrt die gesamte genetische Information der Mikroorganismen in einer Umweltprobe in sogenannten Metagenom-Datenbanken gespeichert wird. Dadurch kann das vollständige Potenzial und die Biodiversität einer Umweltprobe erschlossen werden (Lorenz et al., 2002; Rondon et al., 2000). Durch Sequenzvergleiche können Enzyme identifiziert und direkt in geeigneten Wirtsorganismen exprimiert werden. Dann können Aktivitätsprofile erstellt werden, wie es bereits für das Screening von Esterasen und Lipasen realisiert wurde (Henne et al., 2000; Khalameyzer et al., 1999). Allerdings ist diese Variante des Screenings an industrielle Erfordernisse von neuen Biokatalysatoren angepasst und erfordert speziell entwickelte Hochdurchsatz-Testverfahren (Rodriguez-Valera, 2002; Voget et al., 2003).

Für den Abbau von Polyolen werden bei Bakterien generell zwei Wege genutzt, die oxidativ ablaufen. Die Polyole können durch aktiven Transport aufgenommen und anschließend durch Dehydrogenasen oxidiert werden. Auf diese Weise werden zum Beispiel D-Sorbitol bei *Bacillus subtilis* (Horwitz und Kaplan, 1964) oder *Rhodobacter sphaeroides* (Schneider et al., 1995), L-Sorbitol bei *Stenotrophomonas maltophilia* (Brechtel et al., 2002), D-Arabitol bei *Klebsiella pneumoniae* PRL-R3 (Doten und Mortlock, 1985[1]; Doten und Mortlock, 1985[2]) und 1,5-Anhydro-D-glucitol bei *Pseudomonas* sp. NK-85001 (Nakamura et al., 1986) oxidiert. Andererseits können Polyole über das Phosphotransferase-System aufgenommen und oxidativ durch Polyolphosphat-Dehydrogenasen umgesetzt werden (Kühn, 2004). Diese Art der Verwertung konnte für D-Glucitol, D-Galactitol und D-Mannitol in *E. coli* (Chase, 1986; Novotny et al., 1984; Yamada et al., 1987), für D-Glucitol und D-Mannitol in *Aerobacter aerogenes* (Kelker und Anderson, 1971; Liss et al., 1962; Tanaka et al., 1967) und für D-Ribitol und D-Xylitol in *Lactobacillus casei* (Hausmann und London, 1987) gezeigt werden.

Während dieser Arbeit erfolgte die Selektion der bakteriellen L-Sorbitol-Dehydrogenasen aus Bodenproben durch Wachstum auf Agarplatten, die L-Sorbitol als alleinige Kohlenstoffquelle enthielten (Mayers-Küntzer, 1993). So konnten zahlreiche Organismen isoliert werden, die mit L-Sorbitol als einziger C-Quelle wuchsen, jedoch wuchsen viele nicht in Flüssigkultur. Von denen, die in Flüssigkultur wuchsen zeigte lediglich ein Organismus LSDH-Aktivität. Dieser Organismus wurde aus einer privaten Kompostieranlage in Erfweiler-Ehlingen/Mandelbachtal, Saarland isoliert und trug den Arbeitstitel K5. Die LSDH-Aktivität betrug im Rohextrakt 1,6 U/mg. Somit ist die spezifische Enzymaktivität mit derjenigen der LSDH aus der 1993 isolierten *Stenotrophomonas*-Spezies vergleichbar (Mayers-Küntzer, 1993). Die Identifikation von K5 verlief uneindeutig. Es wurden verschiedene Methoden zur Bakterienidentifikation angewandt. Morphologisch sind die Kolonien als weiß und glänzend, rund und glatt zu beschreiben. Die Zellen sind stäbchenförmig, ca. 2,5 bis 3 µm lang und 0,5 bis 1 µm breit. Zur Identifizierung des Gram-Typs wurden verschiedene Methoden angewandt. Die Gram-Färbung lieferte dabei kein eindeutiges Ergebnis. Sowohl der Testorganismus K5 als auch die beiden Kontrollorganismen *E. coli* und *Bacillus subtilis* zeigten keinen eindeutigen Gram-Typ. Ein möglicher Grund ist die Gramfärbung während einer wenig geeigneten Wachstumsphase. Trotz mehrmaligem Wiederholen konnte jedoch kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden. Verunreinigungen der Kulturen sind auszuschließen, da ihre Reinheit durch Ausstriche auf LB- und NB-Platten überprüft wurde. In allen Fällen konnten keine „Fremdkolonien“ beobachtet werden, so dass von einer Reinkultur ausgegangen wurde. Die beiden Schnelltests zur Gram-Identifizierung KOH-Probe und Aminopeptidase-Test lieferten ein zwar eindeutiges, jedoch nicht mit der später besprochenen 16S-rDNA-Analyse vereinbarendes Ergebnis. Bei der KOH-Probe wird die gramnegative Zellwand durch KOH zerstört, wonach die DNA als viskoser Faden in Erscheinung tritt. Bei K5 konnte kein DNA-Faden erkannt werden, was auf einen grampositiven Organismus hindeutet. Auch das Ergebnis des Aminopeptidase-Tests spricht für einen grampositiven Organismus. Die Aminopeptidase kommt – mit wenigen Ausnahmen – nur bei gramnegativen Organismen vor. Während des Tests wird L-Alanin-4-Nitroanilid mit Hilfe der L-Aminopeptidase in L-Alanin und das gelbe 4-Nitroanilid gespalten. Bei gramnegativen Organismen färbt sich also der Teststreifen gelb, was jedoch bei K5 nicht der Fall war.

K5 ist außerdem katalase-negativ und cytochromoxidase-positiv. Diese Ergebnisse waren eindeutig und auch die Kontrollorganismen zeigten die erwartete Reaktion. K5 ist außerdem nicht in der Lage Casein und Stärke abzubauen. Auch hier zeigten die Kontrollorganismen die erwarteten Ergebnisse.

Im Hugh-Leifson-Test zur Verwertbarkeit von Zuckern konnte weder aerob noch anaerob ein zur Verfügung gestellter Zucker verwertet werden. Es wäre möglich, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle zu hoch war. Da K5 aus einer Bodenprobe isoliert wurde, in der eher geringe Substratkonzentrationen zur Verfügung stehen, wäre eine mögliche Erklärung für das ausbleibende Wachstum eine zu hohe Substratkonzentration. Hohe Substratkonzentrationen hemmen das Wachstum von Mikroorganismen (Edwards, 1970). Viele Bakterien sind bestens dafür ausgestattet, bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen zu wachsen (Poindexter, 1981; Schmidt et al., 1984). Allerdings ist unterhalb einer bestimmten Substratkonzentration kein Wachstum mehr möglich (Button, 1978; Jannasch, 1967). Die Glucose-Konzentration im Hugh-Leifson-Test beträgt etwa 6 mM. K5 wurde mit einem Medium isoliert, in dem die L-Sorbitol-Konzentration 5 mM beträgt. In einem MV-Medium mit 5 mM Glucose als Kohlenstoffquelle konnte bei K5 ebenfalls kein Wachstum festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch in einer bunten Reihe mit den Kohlenstoffquellen Glucose, Lactose und Galactose konnten weder eine Ansäuerung des Mediums noch Gasbildung beobachtet werden.

Die 16S-rDNA-Analyse lieferte ebenfalls ein nicht eindeutiges Ergebnis. Die höchste Übereinstimmung ergab sich dabei für *Sinorhizobium* sp. L1 (AJ879127.1). Die 16S-rDNA befindet sich in den Ribosomen, die als Ort der Proteinsynthese ihrer Funktion nach sehr konservativ erhalten sind. Da ihre Basensequenz weder durch die Degeneration des genetischen Codes noch durch Suppressor-Mutationen beeinflusst wird, konnten sie im Laufe der Evolution erhalten bleiben und sich bei gleichzeitigem Funktionserhalt durchsetzen (Woese, 1987). Die Gattung *Sinorhizobium* gehört innerhalb der α -Proteobakterien zur Ordnung der *Rhizobiales*. Bei den zur Familie der *Rhizobiaceae* gehörenden Bodenbakterien handelt es sich um gram-negative, obligat aerobe, stäbchenförmige Bakterien. Sie bilden keine Sporen, sind polar, subpolar oder peritrich begeißelt. Der GC-Gehalt der Gattung liegt zwischen 57 und 65 mol% (Kühn, 2004). Die Rhizobien werden aufgrund ihrer Eigenschaften systematisch in die Nähe der *Pseudomonadaceae* und *Azotobacteriaceae* gestellt (Werner, 1987), sie sind entweder frei lebend oder in Assoziation mit Pflanzen zu finden (Schloter et al., 1997; Segovia et al., 1991). Bemerkenswert ist die Anpassungsfähigkeit der *Rhizobiaceae* an unterschiedlichste Lebensbedingungen. Sie sind weder auf bestimmte Kohlenstoffquellen spezialisiert, noch sind sie abhängig von physikalisch-chemischen Faktoren im Boden (Kühn, 2004). Charakteristisch für die meisten Vertreter der *Rhizobiaceae* ist die Fähigkeit zur Symbiose mit Leguminosen. Diese Symbiose beruht auf der Nutzung von Stickstoff. Die Symbiose besteht in einem beiderseitigen Nutzen der beteiligten Partner in engem morphologischen Kontakt

(Brill, 1975; Brown und Dilworth, 1975; Emerich et al., 1979). Für diese Symbiose sind die sogenannten *Sym*-Plasmide verantwortlich. Sie tragen zum Beispiel die Information zur Wurzelknöllchenbildung (*nod*-Gene), die Wirtsspezifität und die Stickstofffixierung (*nif*-Gene) (Burkardt et al., 1987; Hynes et al., 1986). Zahlreiche Untersuchungen widmeten sich dem Mechanismus der Wurzelinfektion, der jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Burkardt et al., 1987). Oft wird eine Wechselwirkung zwischen pflanzlichen Lektinen mit Exo- und Lipopolysacchariden der Bakterien beschrieben (Campbell et al., 2002; Lagares et al., 1992; Lagares et al., 2001; Moreira et al., 2000; Niehaus und Becker, 1998). Die Wurzelknöllchenbildung wurde bei mehr als 90% der Leguminosen beobachtet, darunter landwirtschaftlich genutzte Vertreter wie zum Beispiel die Sojabohne (*Glycine* sp.), die Futtererbse (*Pisum* sp.), der Klee (*Trifolium* sp.) und die Luzerne (*Medicago* sp.), aber auch exotische Vertreter wie verschiedene Akazienarten und tropische Baumleguminosen (Kühn, 2004). Im Zuge einer Infektion der Pflanzen werden die Bakterien aus einem Infektionsschlauch freigesetzt. Durch die Bakteroidmembran bleiben sie vom Plasmalemma der Pflanzen getrennt (Hentschel et al., 2000; Oke und Long, 1999; Werner, 1987). Durch die Symbiose wird die Nitrogenase in den Bakteroiden reaktiviert, wodurch die bakterielle Stickstofffixierung möglich wird und die Reduktion von Stickstoff zu Ammoniak stattfindet. Bei freilebenden Rhizobien wird die Nitrogenase-Aktivität durch höhere Sauerstoffkonzentrationen gehemmt (Kühn, 2004). Die Nitrogenaseaktivität konnte jedoch auch in Reinkulturen durch Senkung des Sauerstoffpartialdrucks während der Kultivierung induziert werden (Werner, 1987). Die Tatsache, dass Rhizobien unter Laborbedingungen kultivierbar sind und auch mit ungewöhnlichen Substraten als alleinige C-Quelle in geringer Konzentration wachsen können, zeigt Parallelen zum neu isolierten Stamm K5. Jedoch sind Rhizobien gram-negative Bakterien und K5 ist wahrscheinlich ein gram-positiver Keim. K5 ist katalase-negativ und cytochromoxidase-positiv, er kann weder Casein abbauen, noch ist er in der Lage Stärke zu hydrolysieren. *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5, der von Kühn 2004 isoliert wurde, hingegen ist katalase-positiv und cytochromoxidase-negativ. Außerdem hydrolysiert er im Gegensatz zu K5 Stärke (Kühn, 2004). Somit konnte K5 nicht eindeutig identifiziert werden.

2. LSDH aus K5

Die Enzymaktivität im Rohextrakt von K5 betrug 1,6 U/mg. Aus einer 250 ml-Kultur konnten insgesamt 38 U LSDH gewonnen werden. Nach zwei Anreicherungs-schritten (Ammoniumsulfatfällung und HIC) betrug die Gesamtaktivität noch 13,4 U. Im SDS-Gel

konnte eine prominente Bande bei etwa 25 kDa identifiziert werden, deren Größe derjenigen einer *short-chain*-Dehydrogenase entspricht. Diese Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und im Gel tryptisch verdaut, um sie mittels MALDI-TOF analysieren zu können. Die höchste Übereinstimmung der MALDI-TOF-Analyse ergab die höchste Übereinstimmung zu einer Ribitol-2-Dehydrogenase aus *Bradyrhizobium* sp. BTAi1. Bei einem Score von 69 können die Ergebnisse nicht als signifikant gewertet werden. Außerdem betrug die Sequenzabdeckung lediglich 29%, was damit begründet werden kann, dass bei der Datenbankrecherche nur auf hinterlegte Sequenzen zurückgegriffen werden kann. Außerdem ist es möglich, dass aufgrund der starken Quervernetzung nicht alle Peptide aus den Gelstücken extrahiert wurden und daher erst gar nicht für die MALDI-Untersuchungen zugänglich waren. Der N-Terminus des 1993 isolierten LSDH-Enzyms (Mayers-Küntzer, 1993) wies ebenfalls hohe Übereinstimmungen zu einer Ribitol-2-Dehydrogenase aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 auf. Da das Genom von *B. japonicum* USDA vollständig sequenziert ist, konnten sehr spezifische Primer zur Amplifikation des LSDH-Gens abgeleitet werden, die aufgrund der hohen Ähnlichkeiten auch für die Amplifikation des LSDH-Gens aus K5 genutzt werden konnten. Die PCR-Reaktion lieferte ein sehr spezifisches Produkt einer Länge von etwa 730 bp. Die heterologe Expression des PCR-Produkts und die anschließende Kontrolle im SDS-Gel ergab eine stark überexprimierte Bande bei etwa 25 kDa. Jedoch wurde das rekombinante Enzym fast ausschließlich in Form unlöslicher *inclusion bodies* in der Pelletfraktion exprimiert. Die Gründe für eine Fehlfaltung und damit für eine Ablage des rekombinanten Proteins in Form unlöslicher *inclusion bodies* sind vielfältig. So wird in der Literatur zum Beispiel ein sogenannter *crowding*-Effekt beschrieben. Durch die hohe Konzentration an Makromolekülen im zellfreien Extrakt wird die Fehlfaltung der Proteine und damit ihre Fehlfaltung gefördert (Agashe et al., 2000; Mogk et al., 2001; Hartl et al., 2002; Schlieker et al., 2002). Aufgrund der räumlich eng begrenzten Proteinsynthese und -faltung neigen gerade Proteine, die aus mehreren Domänen bestehen, zur Bildung von *inclusion bodies* (Mogk et al., 2001; Barral et al., 2004). Die Enzymaktivität im Rohextrakt betrug lediglich 2,2 U/mg für D-Sorbitol und 0,005 U/mg für L-Sorbitol. Auch eine Anzucht bei niedrigerer bzw. bei höherer Temperatur konnte die Enzymaktivität nicht steigern. Durch die Coexpression der Chaperon-Plasmide pGro7 und pG-KJE8 konnte die Enzymaktivität zwar leicht gesteigert werden, sie war jedoch immer noch recht gering, so dass nach einem anderen Enzym gesucht wurde, das LSDH-Aktivität aufweist. Da das 1993 isolierte Enzym hohe Übereinstimmungen zur Ribitol-2-Dehydrogenase aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 aufwies, sollte dieses Enzym in einem nächsten Schritt kloniert und heterolog exprimiert werden und auf LSDH-Aktivität getestet werden.

3. LSDH aus *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

Mayers-Küntzer isolierte 1993 eine *Stenotrophomonas*-Spezies, die eine Dehydrogenase exprimiert, deren Hauptsubstrat L-Sorbitol war. Im Zuge der Archivierung bei der DSMZ ging diese L-Sorbitol-Dehydrogenase-Aktivität verloren. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit nach weiteren Dehydrogenasen gesucht werden, die L-Sorbitol in ausreichender Menge umsetzen, um den seltenen Zucker D-Sorbose herzustellen. Der N-Terminus des Enzyms aus *Stenotrophomonas maltophilia* wies eine 85 %ige Übereinstimmung zu einem *open reading frame* im Genom von *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 auf, der als Ribitol-2-Dehydrogenase ausgewiesen war. Aufgrund der vollständigen Sequenzierung des *Bradyrhizobium japonicum*-Genoms (Kaneko et al., 2002) konnten für die Amplifikation und Klonierung des Ribitol-2-Dehydrogenase-Gens, welches im Folgenden als LSDH-Gen bezeichnet wird, sehr spezifische Primer abgeleitet werden.

3.1 Klonierung, heterologe Expression des LSDH-Gens und Anreicherung des rekombinanten Enzyms

Die PCR-Reaktion lieferte ein Fragment von etwa 730 bp, welches über die Schnittstellen *Bam*HI und *Nde*I in den Expressionsvektor pET-24a(+), bei dem das Fremdgen unter der Kontrolle der sehr starken Transkriptions- und Translationssignale des Bakteriophagen T7 steht, kloniert wurde. Für die heterologe Expression des LSDH-Gens wurden *E. coli* BL21Gold(DE3)-Zellen verwendet, die die T7-RNA-Polymerase nach Induktion des lacUV5-Promotors durch die Zugabe von IPTG zur Verfügung stellen.

Die heterologe Expression ergab ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 26 kDa pro Untereinheit, eine Enzymuntereinheit besteht aus 243 Aminosäuren. Die Sequenzierung zeigte das für die Gruppe der *short-chain*-Dehydrogenasen typische NAD-Bindemotiv GXXXGXXG (GAASGIG). Das charakteristische Motiv des aktiven Zentrums YXXXK (YASSK, Position 163-167) (Nidetzky et al., 1996) konnte ebenfalls gefunden werden, jedoch fehlt das am aktiven Zentrum beteiligte hochkonservierte Ser144 der *short-chain*-Dehydrogenasen. An dieser Position befindet sich ein Histidin. Trotzdem kann das Enzym eindeutig als *short-chain*-Dehydrogenase identifiziert werden.

Die Enzymaktivität für das Substrat L-Sorbitol ist mit 0,1 U/mg recht gering, jedoch ausreichend für Biokonversionen. Das Hauptsubstrat der LSDH aus *B. japonicum* ist allerdings D-Sorbitol, für welches die spezifische Aktivität mehr als 1000 mal höher ist als für L-Sorbitol (115 U/mg). Weitere Substrate der Oxidationsreaktion des Enzyms sind D-

Mannitol (5,46 U/mg), Ribitol (1,4 U/mg), D- und L-Arabitol (0,12 bzw. 1,05 U/mg), Xylitol (1,17 U/mg) und Galactitol (0,12 U/mg). In der Reduktionsreaktion werden D-Fructose (49,7 U/mg), L-Sorbose (16,5 U/mg) und zu einem geringen Maß auch D-Galactose (0,05 U/mg).

Zur vereinfachten Anreicherung des Enzyms wurden zwei His₆-getaggte Varianten konstruiert, eine mit einem N-terminalen His₆-Tag und eine weitere mit einem C-terminalen His₆-Tag. Die Variante mit N-terminalem His-Tag zeigte eine vergleichbare Aktivität wie die native Enzymvariante ohne Tag. Die C-terminal His₆-getaggte Variante zeigte keine Aktivität. Ein möglicher Grund dafür ist die mutmaßliche Lokalisation des C-Terminus im Zentrum der Quartärstruktur des Enzyms. Im Falle der GatDH ist der C-Terminus an der Komplexierung eines Magnesium-Ions und damit am Zusammenhalt des aktiven tetrameren Proteins beteiligt (Kornberger, 2009). Möglicherweise ist der C-Terminus der LSDH ebenfalls an der Komposition der Untereinheiten beteiligt. Diese Vermutungen können jedoch erst durch die fertige Kristallstruktur bestätigt werden.

Aus einer 250 ml-Kultur konnten ca. 5000 Units für das Substrat D-Sorbitol und 4,5 Units für das Substrat L-Sorbitol gewonnen werden. Aufgrund der relativ hohen Temperaturstabilität der LSDH, die durch CD-Spektroskopie-Daten von Harm Otten (*Department of Chemistry, Group of Leila LoLeggio, University of Copenhagen*) vermutet werden konnte und die durch entsprechende Messungen bestätigt werden konnte, konnte der Rohextrakt einem Hitzefällungsschritt unterworfen werden, wodurch ein Großteil an Fremdproteinen ausgefällt und durch Zentrifugation entfernt werden konnte. Während der Anreicherung mittels Affinitätschromatographie an Nickelsepharose und anschließender Umpufferung mittels Gelfiltration gingen jedoch 63% der Gesamtaktivität verloren, so dass lediglich 1840 Units für D-Sorbitol und 1,6 Units für L-Sorbitol übrig blieben. Durch das Auftragen geringerer Mengen an Rohextrakt konnte die Ausbeute nicht gesteigert werden, so dass ein Überladen der Säule als Grund für die geringe Ausbeute ausgeschlossen werden kann. Auch durch die Verwendung eines Imidazol-Gradienten konnte die Ausbeute nicht gesteigert werden. Die spezifische Aktivität konnte im Verlauf der Anreicherung von 35,7 U/mg auf 115 U/mg für D-Sorbitol und von 0,03 U/mg auf 0,1 U/mg für L-Sorbitol gesteigert werden; das Enzym wurde 3,2-fach angereichert. Die DSDH aus *R. sphaeroides* konnte zu einer spezifischen Aktivität von etwa 113 U/mg für das Substrat D-Sorbitol angereichert werden (Klein, 2009). Die Enzymaktivität für dieses Substrat ist also vergleichbar. Allerdings setzt die DSDH im Gegensatz zur LSDH kein L-Sorbitol um.

3.2 Biochemische Charakterisierung der LSDH

Das pH-Optimum der LSDH für die Oxidationsreaktion liegt bei pH 7,5, das pH-Optimum für die Reduktionsreaktion liegt bei 6,5. Das pH-Optimum für die Oxidationsreaktion ist im Vergleich zu anderen Dehydrogenasen eher niedrig (Burnell und Holmes, 1983; Rehg und Torack, 1977; Schauder et al., 1995; Chase, T., Jr., 1986; Schneider und Giffhorn, 1989). Da Protonen an der Reaktion von Dehydrogenasen beteiligt sind, wird die Reduktionsreaktion durch niedrige, die Oxidationsreaktion durch hohe pH-Werte begünstigt (Kühn, 2004). Die pH-Optima der GatDH und der DSDH aus *Rhodobacter sphaeroides* für die Oxidation von Polyolen liegen bei pH 9 (Kornberger, 2009; Klein, 2009). Die Messungen zur Bestimmung des pH-Optimums wurden in verschiedenen Puffern durchgeführt. Für die Reaktion der Dehydrogenasen werden häufig organische Puffersubstanzen wie BisTris oder Tris, welche auch für die LSDH verwendet wurden, verwendet (Jeziore-Sassoon et al., 1998; Schneider und Giffhorn, 1989) und auch im Falle der 1,5-Anhydro-D-fructose-Reduktase aus *Sinorhizobium morelense* S-30.7.5 konnte ein solches Puffer-System die Enzymaktivität begünstigen (Kühn, 2004).

Die LSDH weist eine außergewöhnliche Temperaturstabilität auf (persönliche Mitteilung Harm Otten, *Department of Chemistry, Group of Leila LoLeggio, University of Copenhagen*). Wie bereits erwähnt, liegt ihr $T_{50/10}$ -Wert bei 64,6°C. Bei 50°C und 55°C ist das Enzym über mehr als eine Stunde stabil. Erst bei 60 °C verliert das Enzym nach etwa 30 Minuten deutlich an Aktivität, wobei auch nach 60 Minuten noch 10% der Aktivität vorhanden sind. Bei 65°C ist nach 30-minütiger Inkubation nahezu die gesamte Aktivität verloren, bei 70°C schon nach 10 Minuten. Die maximale Temperatur der LSDH ist außergewöhnlich hoch für ein Enzym aus einem mesophilen Organismus. Sie liegt bei etwa 55°C. Durch den Vergleich mit einem Enzym aus *Stenotrophomonas maltophilia*, welches sich nur an zwei Positionen von der LSDH unterscheidet, konnten zwei Aminosäuren identifiziert werden, die wahrscheinlich für die Thermostabilität verantwortlich sind. Es sind die Aminosäuren C68 und M228. Im ähnlichen Enzym aus *S. maltophilia* befinden sich an diesen Stellen ein Phenylalanin (Position 68) bzw. ein Alanin (Position 228). Das Enzym aus *S. maltophilia* hat einen $T_{50/10}$ -Wert von etwa 45,8°C, während die LSDH einen $T_{50/10}$ -Wert von 64,6°C hat. Dieser Wert für die LSDH wurde auch durch die Messungen und Daten von Harm Otten erhalten. Die beiden Varianten der LSDH C68F und M228A weisen $T_{50/10}$ -Werte auf, die zwischen diesen beiden Temperaturen liegen (55,3°C (C68F) und 57,4°C (M228A)). Für verschiedene Enzyme konnte eine Verbesserung der Thermostabilität durch die Erzeugung neuer Disulfidbrücken verbessert werden (Björk et al., 2003; Sauer et al., 1986; Shirakawa et al., 1991, Gokhale et al., 1994, Tamura et al., 1994).

Auch im Falle der GatDH konnte während dieser Arbeit eine leichte Erhöhung der Stabilität bei höheren Temperaturen durch die Einführung neuer Disulfidbrücken erzielt werden. Möglicherweise wird die LSDH ebenfalls durch eine Disulfidbrücke zwischen C68 und M228 stabilisiert. Diese Theorie kann jedoch erst durch eine eindeutige Kristallstruktur bestätigt werden.

Das Substratspektrum der LSDH ist relativ eingeschränkt. Zu den Substraten der Oxidationsreaktion zählen neben dem Hauptsubstrat D-Sorbitol auch L-Sorbitol, Xylitol, D- und L-Arabitol, D-Mannitol, Ribitol und Galaktitol. In einer Reduktionsreaktion werden D-Fructose, L-Sorbose und D-Galactose verwertet. Die Enzymaktivität gegenüber D-Sorbitol ist etwa 1000 mal höher als für das Substrat L-Sorbitol. Das Hauptsubstrat der LSDH ist also nicht L-Sorbitol, wie bei dem 1993 isolierten Enzym (Mayers-Küntzer et al., 1993), sondern D-Sorbitol. Umsätze mit diesem Substrat sind jedoch aufgrund des Produkts D-Fructose weniger interessant als Umsätze mit L-Sorbitol. Die LSDH-Aktivität ist allerdings ausreichend für Umsätze und kann eventuell durch gerichtete Evolution oder Zufallsmutagenese weiter verbessert werden. Die Verwertbarkeit von D-Sorbose konnte aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit nicht getestet werden. Die LSDH besitzt neben ihrer außergewöhnlichen Stabilität gegenüber der DSDH den Vorteil, dass L-Sorbitol zur Liste der Substrate der LSDH zählt. Im Vergleich zum 1993 isolierten Enzym (Mayers-Küntzer, 1993; Reichert, 1994) ist das Substratspektrum der LSDH etwas mehr eingeschränkt. Neben seinem Hauptsubstrat L-Sorbitol (100%) setzte das Enzym in einer Oxidationsreaktion auch L-Arabitol (67%), Ribitol (62%), Xylitol (41%), Galactitol (32%) und L-Iditol (4%) um. D-Sorbitol, welches das Hauptsubstrat der neu isolierten LSDH ist, wird im Vergleich zu L-Sorbitol nur mit einer relativen Enzymaktivität von 18% umgesetzt. Trotzdem ist die Enzymaktivität der LSDH für L-Sorbitol ausreichend für Umsätze zur Herstellung von D-Sorbose. In einer Reduktionsreaktion werden D-Sorbose (100%), L-Sorbose (15%), D-Glucose (10%), D-Fructose (5%), D-Galactose (2%) und D-Mannose (1%) umgesetzt (Mayers-Küntzer et al., 1994). D-Mannitol wird mit einer relativen Aktivität von 5% umgesetzt. Alle anderen Substrate werden deutlich schlechter umgesetzt. Reduktiv werden von der LSDH D-Fructose (100%), L-Sorbose (33%) und D-Galactose (<1%) verwertet.

Zur Bestimmung der Untereinheiten-Komposition des nativen Enzyms wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Zum einen eine Gelfiltration an einer Superdex-HR200-Säule und zum anderen eine native PAGE. Im Falle der nativen PAGE wurde auf die Rf-Werte von Standardproteinen zurückgegriffen. Das Molekulargewicht der Eichproteine wurde halblogarithmisch gegen die Rf-Werte aufgetragen und so eine Eichgerade ermittelt. Die Regression der Eichgerade lag bei 0,99 und war somit recht genau. Für die LSDH ergab

sich aus dieser Eichgerade ein Molekulargewicht von 77,7 kDa. Bei einer Fehlerquote von 0,94 % ergibt sich also ein Molekulargewicht von $77,7 \text{ kDa} \pm 0,73 \text{ kDa}$. Geht man von einem Molekulargewicht von 27,2 kDa für das His₆-getaggte Protein aus, ergibt sich für das Trimer ein Molekulargewicht von 81,6 kDa. Das mit Hilfe der Eichgerade errechnete Molekulargewicht von 77,7 kDa liegt also am nächsten am Molekulargewicht des Trimers. Aufgrund der nativen PAGE können also ein Dimer und ein Tetramer ausgeschlossen werden. Auch bei der Gelfiltration wurden die Molekulargewichte halblogarithmisch gegen das Retentionsvolumen der Eichproteine in ml aufgetragen, um eine Eichgerade zu erstellen. Mit Hilfe dieser Eichgerade ergab sich für die LSDH, deren Retentionsvolumen bei 12,6 ml lag, ein Molekulargewicht von 83,24 kDa. Die Regression der Eichgerade lag bei 0,99 und gilt somit als verlässlich. Bei einer Fehlerquote von 0,017% ergibt sich für die LSDH ein Molekulargewicht von $83,24 \text{ kDa} \pm 0,014 \text{ kDa}$. Auch im Falle der Gelfiltration ließ sich die LSDH also als Trimer identifizieren. Die kristallographischen Daten sprechen jedoch eher für eine tetramere Proteinstruktur. Allerdings ist die Auflösung der bisher erhaltenen Kristallstrukturen recht gering und liegt bei etwa 3,6 Å (persönliche Mitteilung Harm Otten, *Department of Chemistry, Group of Leila LoLeggio, University of Copenhagen*). Somit lässt die Struktur Raum zur Interpretation. Die Komposition der Untereinheiten konnte somit nicht eindeutig geklärt werden. Die trimere Quartärstruktur gilt jedoch aufgrund der sehr eindeutigen biochemischen Daten als recht wahrscheinlich. Eine vierte Möglichkeit zur Bestimmung der Komposition der Untereinheiten wäre die Elektronenmikroskopie. Bei der Negativkontrastierung, die nicht nur für isolierte Proteine und Proteinaggregate angewandt wird, sondern z.B. auch für Lipoproteine, Protein-Nukleinsäure-Komplexe, Zellkomponenten aus Zellaufschlüssen, zur Überprüfung von Fraktionen aus Trennungsvorgängen, Zellorganellen und deren Bruchstücke und ganze Bakterienzellen. In Wasser lösliche Schwermetalle wie z.B. Uranylacetat trocknen dabei in amorpher Form um das abzubildende Objekt ein. Das Objekt bleibt gut durchstrahlbar, während seine Umgebung im Elektronenmikroskop dunkel erscheint. Dabei konnten gute Ergebnisse für die bakterielle Glutaminsynthase und für die hexamere Citratlyase erzielt werden. Allerdings sind diese deutlich größer als die LSDH, weshalb vergleichbar gute Ergebnisse für die LSDH nicht unbedingt erwartet werden können.

Die kinetischen Parameter der LSDH für die Substrate D-Sorbitol und D-Fruktose sind mit denen der DSDH vergleichbar, wobei der K_m -Wert für D-Sorbitol mit 12,7 mM gegenüber dem der DSDH (6,5 mM; Klein, 2009) leicht verschlechtert ist. Der K_m -Wert für D-Fruktose ist mit 93,4 mM gegenüber dem entsprechenden Wert der DSDH (49,7 mM; Klein, 2009) deutlich schlechter. Die Wechselzahl k_{cat} für D-Fruktose ist mit 426618 gegenüber dem

entsprechenden Wert der DSDH ($k_{\text{cat}} = 146666$; Klein, 2009) etwa dreifach erhöht. Die katalytische Effizienz liegt bei 4568 und ist somit im Vergleich zur DSDH für das Substrat D-Fructose etwa 1,5-fach höher ($k_{\text{cat}}/K_m = 2969$; Klein 2009). Der K_m -Wert für das Substrat L-Sorbitol ist mit 9,2 mM mit dem für D-Sorbitol vergleichbar. Allerdings ist k_{cat} für D-Sorbitol (157824) etwa 71-fach erhöht gegenüber der Wechselzahl für L-Sorbitol (2219). Dementsprechend ist die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m für D-Sorbitol mit 12427 gegenüber derjenigen für L-Sorbitol deutlich höher. Die K_m -Werte für NAD^+ und $\text{NADH} + \text{H}^+$ liegen bei 0,3 mM bzw. bei 0,1 mM. Aufgrund fehlender Literaturwerte kann hier jedoch kein Vergleich angestellt werden.

Zuletzt wurde zur biochemischen Charakterisierung der pI der LSDH bestimmt. Mit Hilfe des „EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service“ konnte der theoretische pI der LSDH berechnet werden. Er liegt bei einem pH-Wert von 5,23. Die isoelektrische Fokussierung zeigte verschiedene Banden. Oberhalb einem pH-Wert von 5,3 sind zwei Banden zu erkennen, ebenso bei einem pH-Wert von 5,8 bzw. 5,9, die deutlich stärker sind als die beiden Banden oberhalb von einem pH-Wert von 5,3. Ein Grund für das Vorhandensein verschiedener Banden sind geringfügige Unterschiede in der Faltung bzw. der Aminosäuresequenz, die in einer SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen als eine Bande zu erkennen sind. Bei einer IEF, die unter nativen Bedingungen durchgeführt wird, erscheinen sie jedoch als verschiedene Banden. Auch der His₆-Tag beeinflusst den pI eines Enzyms, da Histidin eine basische Aminosäure ist und den pI eines Proteins in die basische Richtung verschiebt. Eine Aktivitätsfärbung nach der IEF führte zu einer deutlich sichtbaren Formazan-Bildung auf Höhe der beiden Banden oberhalb von einem pH-Wert von 5,3, was darauf schließen lässt, dass es sich bei diesen beiden Banden um die LSDH handelt. Im pH-Bereich der beiden anderen Banden der Coomassie-Färbung ist nach der Aktivitätsfärbung kein Formazan zu sehen. Deshalb handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit bei den beiden Banden oberhalb von 5,3 um die LSDH und der theoretische pI von 5,23 kann bestätigt werden.

3.3 Biokonversionen zur Herstellung von D-Sorbose mit Hilfe der LSDH

Die analytischen Umsätze mit Hilfe der LSDH wurden unter enzymatischer Cofaktorregenerierung mit dem Lactat-Dehydrogenase (LDH)-System durchgeführt. Der Umsatz enthielt als Substrat der LDH Pyruvat im Überschuss, um das Gleichgewicht auf die Seite der Reduktion zu legen. Aus dem während der Oxidation von L-Sorbitol entstehenden $\text{NADH} + \text{H}^+$ entsteht durch die Reaktion der LDH mit Pyruvat NAD^+ . Zunächst wurden die

Retentionszeiten aller im Umsatz verwendeten Substanzen bestimmt. Da die verwendete Säule keine Enantiomere trennen kann, haben D- und L-Sorbitol, ebenso wie D- und L-Sorbose dieselbe Retentionszeit. Die Umsätze wurden bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren durchgeführt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und mittels HPLC untersucht. Bei einem Umsatz mit D-Sorbitol als Substrat war ein zunehmender Peak bei etwa 16 Minuten zu beobachten, während der Peak bei 29,9 Minuten mit fortschreitender Reaktion kleiner wurde. Der Peak bei 16 Minuten kann dem Reaktionsprodukt D-Fructose zugeordnet werden; der Peak bei 29,9 Minuten gehört zum Substrat D-Sorbitol. Die LSDH oxidiert also D-Sorbitol zu D-Fructose. Dieser Umsatz ist bereits nach 6 Stunden abgeschlossen und ist somit etwa 4-fach schneller als ein Umsatz mit L-Sorbitol. Im Gegensatz zu einem Umsatz mit D-Sorbitol ist bei einem Umsatz mit L-Sorbitol kein Peak bei 16 Minuten zu erkennen, sondern bei 18,5 Minuten. Dieser Peak kann anhand der Retentionszeiten der Standards zweifelsfrei dem Reaktionsprodukt D-Sorbose zugeordnet werden. Dies kann eventuell durch NMR, Drehwinkelbestimmung, Dünnschichtchromatographie oder enantioselektive HPLC-Säulen eindeutig bestätigt werden. Allerdings benötigt dieser Umsatz fast 26 Stunden bis zur vollständigen Umsetzung. In der Vergangenheit konnte ein Umsatz mit dem 1993 isolierten Enzym in 23 Stunden abgeschlossen werden. Eingesetzt wurden dabei 240 mU LSDH in einem Volumen von 500 μ l je Umsatz (Reichert, 1994). Umsätze mit ganzen Zellen des 1993 isolierten *Stenotrophomonas*-Stammes dauerten etwa 35 Stunden bei einer Substratkonzentration von bis zu 2,5% (Huwig et al., 1996). Dhawale et al., 1986 beschrieben einen Umsatz mit einem nicht-identifizierten Bakterien-Stamm MD-13, der bis zur Volendung 5 bis 6 Tage benötigte. Die Substratkonzentration durfte dabei 1% nicht überschreiten. Durch den Einsatz einer größeren Menge an LSDH oder einer größeren Substratmenge kann der Umsatz wahrscheinlich optimiert werden. Trotzdem gelingt der Umsatz mit der neu isolierten LSDH in einem angemessenen Zeitrahmen. Die LSDH ist somit für die Produktion des seltenen Zuckers D-Sorbose, der in der Nahrungsmittel- und Pharmaindustrie Anwendung finden kann, geeignet. Das Edukt L-Sorbitol ist relativ teuer, wenn es erworben werden muss, jedoch lässt es sich einfach durch die Reduktion des relativ günstigen Gulono- γ -Lacton mit NaBH_4 herstellen. Die Aufreinigung des L-Sorbitol lässt sich durch verschiedene Ionenaustauscher ebenfalls recht einfach bewerkstelligen, so dass die Herstellung von D-Sorbose mit Hilfe der Oxidation von L-Sorbitol als effizient und wirtschaftlich zu betrachten ist.

3.4 Weitere Varianten der LSDH: LSDH-Cys, LSDH-2Cys und LSDH-Thrombin

Für elektroenzymatische Anwendungen wurden zwei Cystein-getaggte Varianten der LSDH erzeugt. Die LSDH-Cys trägt einen einfachen Cystein-Tag vor dem N-terminalen His₆-Tag, die Variante LSDH-2Cys einen zweifachen Cystein-Tag. Die LSDH soll dabei in einem enzymatischen Bioreaktor mit elektrochemischer Cofaktor-Regenerierung Verwendung finden. Dabei werden die Cystein-getagkten Enzyme auf Goldelektroden immobilisiert. Eine solche Biofunktionalisierung von Metalloberflächen kommt vor allem in der analytischen und klinischen Diagnostik (Portaccio et al., 2007), aber auch bei der Herstellung biologischer Brennstoffzellen (Heller, 2006) vor. Sehr interessant sind elektroenzymatische Synthesen aber auch für die pharmazeutische Industrie und für die Herstellung enantiomerenreiner Feinchemikalien (Tienharra und Meany, 1973). Ein deutlicher Vorteil solcher Reaktoren ist die Reduktion der Reinigungsschritte des Reaktionsproduktes, wenn alle Komponenten auf der Elektrodenoberfläche immobilisiert sind und folglich nur das Edukt und das Substrat in Lösung sind. Zur Immobilisierung der Biokatalysatoren auf Goldelektroden gibt es verschiedene Möglichkeiten: die Modifizierung der Metalloberfläche mit einem *self-assembled-monolayer* (Stoica et al., 2006) oder ein Netz aus Glutaraldehyd und dem quervernetzenden Rinderserumalbumin (Miao et al., 2001). Um auf solche Vernetzungssysteme oder Linkermoleküle verzichten zu können, können die Biokatalysatoren direkt an die Goldelektrode immobilisiert werden. 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). In der Literatur wurden Cystein-modifizierte Goldelektroden als SAM beschrieben (Meng et al., 2001; Wu et al., 1999), die eine stabile Bindung zwischen der Thiolgruppe der Cysteine und der Goldoberfläche zeigten. Methionin, welches ebenfalls über ein Schwefelatom in der unpolaren Seitenkette verfügt und daher ebenfalls in Frage käme, hat den Nachteil, dass eine weitere Schwefelgruppe an das Schwefelatom gebunden ist, während das Schwefelatom im Cystein als Thiolgruppe vorliegt. Die Adsorption der Cystein-getagkten Varianten beruht dabei auf der natürlichen Affinität zwischen Schwefelverbindungen wie Thiolen und Disulfiden und Metalloberflächen. Die beiden Enzymvarianten zeigten gegenüber der N-Terminal his-getagkten Variante keinerlei Aktivitätsverlust, die Enzymaktivitäten waren sogar gegenüber der LSDH-NHis erhöht. Aus einer 250 ml-Kultur konnten für die LSDH-Cys fast 7000 Units gewonnen werden, für die LSDH-2Cys fast 6000 Units. Die Enzymaktivitäten sind hier aufgrund der besseren Verwertbarkeit nur für das Hauptsubstrat D-Sorbitol angegeben. Im Verlauf der

Anreicherung, die eine Hitzefällung bei 55°C für eine Stunde, eine Affinitätschromatographie an Nickelsepharose sowie eine anschließende Umpufferung durch Gelfiltration beinhaltet, konnte die spezifische Aktivität von 81,3 U/mg auf 201,8 U/mg (LSDH-Cys) bzw. von 98,6 U/mg auf 179,7 U/mg (LSDH-2Cys) gesteigert werden. Diese Werte liegen deutlich über denen der LSDH-NHis. Die Ausbeute nach den drei Anreicherungsschritten lag für die LSDH-Cys bei 47%, für die LSDH-2Cys bei lediglich 26%. Auch für diese Varianten konnte jedoch keine Verbesserung der Ausbeute durch Verringerung der Auftragsmenge erzielt werden. Im Durchfluss der Säule befand sich ebenfalls kein Enzym, so dass eine Überladung der Säule als Grund für die geringe Ausbeute nicht in Frage kam.

Eine weitere Variante der LSDH-NHis ist LSDH-Thrombin mit Protease-Schnittstelle zur Abspaltung des His₆-Tags. Die Variante zeigte ebenfalls zur LSDH-NHis vergleichbare Enzymaktivitäten. Der His₆-Tag ist jedoch eine recht flexible Struktur und beeinflusst die Kristallisationseigenschaften eines Proteins negativ, so dass die Entfernung des His-Tags die Kristallisation deutlich vereinfachen kann. Die Abspaltung erfolgte mit Hilfe des *Thrombin CleanCleave*TM-Kits von Sigma-Aldrich. Hier ist die Protease Thrombin an Agarose-Kügelchen immobilisiert, so dass sie nach beendeter Spaltung einfach durch Zentrifugation entfernt werden kann. Ein weiterer Anreicherungsschritt ist nicht notwendig. Die LSDH ohne Tag kann somit vereinfacht durch Affinitätschromatographie an Nickelsepharose angereichert werden und trotzdem zur einfacheren Kristallisation eingesetzt werden. Die Experimente zur Kristallisation wurden von Harm Otten (*Department of Chemistry, Group of Leila LoLeggio, University of Copenhagen*) durchgeführt. Es konnten für die ungetaggte LSDH einige Kristalle erhalten werden. Die strukturellen Daten sprechen jedoch im Gegensatz zu den biochemischen Daten, nach denen ein Trimer wahrscheinlich ist, eher für ein Tetramer. Allerdings konnte die Kristallstruktur bisher lediglich mit einer Auflösung von etwa 3,6 Å aufgeklärt werden und lässt somit Raum zur Spekulation (persönliche Mitteilung Harm Otten, Veröffentlichung eingereicht). Die biochemischen Daten hingegen waren recht eindeutig. Somit konnte die Komposition der Untereinheiten der LSDH nicht eindeutig geklärt werden, jedoch gilt eine trimere Struktur aufgrund der sehr genauen biochemischen Daten als wahrscheinlicher.

3.5 Aktivitätsnachweis durch Cyclovoltammetrie

Ziel des Projekts ERUDES (Electrochemical Reactors Using Dehydrogenases for Enantiopure Synthon Preparations) war die Konstruktion eines elektroenzymatischen Reaktors, in dem alle

notwendigen Komponenten an einer Goldlektrode immobilisiert sind. Nur Edukt und Produkt der enzymatischen Reaktion bleiben in Lösung. Dabei werden die Komponenten in einen Sol-Gel-Film eingebettet, der sich in makroporösen Goldelektroden befindet. Die cyclovoltammetrischen Messungen wurden von Zhijie Wang und Mathieu Etienne (*Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), CNRS, Université Henri Poincaré, Nancy*) durchgeführt. Mit Hilfe der Cyclovoltammetrie können thermodynamische und kinetische Parameter von heterogenen Elektronentransfer-Reaktionen gemessen werden (Schröder, 2003). So können auch katalytische Reaktionen von enzymatischen Umsätzen durch Cyclovoltammetrie beobachtet werden (Antiochia et al., 2001). Die makroporösen Goldelektroden wurden durch Elektrodeposition von Gold in den Zwischenräumen eines Pseudokristalls aus Silica-Kügelchen hergestellt. Nach der Elektrodeposition wird das Silica-Template aufgelöst und man erhält makroporöse Gold-Elektroden (vgl. Abbildung III.41). Diese werden dann mit einem Sol-Gel-Film, in den die Enzyme eingebettet werden, beschichtet.

Den Substrateigenschaften entsprechend zeigte die LSDH eine starke Reaktion mit dem Substrat D-Sorbitol, jedoch war für das Substrat L-Sorbitol ebenfalls eine Antwort erkennbar. Vergleichend wurden die gleichen Experimente mit der DSDH aus *Rhodobacter sphaeroides* durchgeführt. Dieses Enzym zeigt höhere Aktivitäten für das Substrat D-Sorbitol als die LSDH, jedoch zeigt es keinerlei Aktivität für das Substrat L-Sorbitol (Klein, 2009). Dieser Sachverhalt spiegelt sich deutlich in den Cyclovoltammogrammen nieder. Für das Substrat D-Sorbitol konnte für die DSDH eine stärkere Antwort als bei der LSDH registriert werden. Für L-Sorbitol jedoch kann im Cyclovoltammogramm keine Aktivität gezeigt werden. Somit konnte die Aktivität der LSDH in einem solchen elektroenzymatischen Reaktor bestätigt werden, was das Enzym aufgrund seiner Enzymaktivität gegenüber L-Sorbitol sehr interessant für weitere Anwendungen macht. Durch rationales Design und gerichtete Evolution könnte die Enantiomer-Spezifität verändert werden, um die Enzymaktivität gegenüber dem Substrat L-Sorbitol zu verbessern. Die LSDH stellt somit ein effizientes und kostengünstiges System zur Herstellung des seltenen Zuckers D-Sorbose dar.

4. GatDH aus *Rhodobacter sphaeroides*

Die GatDH aus *Rhodobacter sphaeroides* kann beispielsweise zur Herstellung des seltenen Zuckers L-Tagatose verwendet werden (Huwig et al., 1998). Aufgrund ihres breiten Substratspektrums und der enantiomerenreinen Reaktionsprodukte ist sie ebenfalls für die Anwendung in einem elektroenzymatischen Reaktor interessant. Das Enzym wurde bereits

kloniert, erfolgreich heterolog exprimiert und mit einem N-terminalen His₆-Tag versehen (Zimmer, 2006, Kornberger 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Temperaturstabilität der GatDH für die Anwendung im elektroenzymatischen Reaktor verbessert werden. Dazu wurden verschiedene Methoden ausprobiert: die zufallsbasierte *error-prone*-PCR, die Iterative Sättigungsmutagenese, rationales Design und die Erzeugung neuer Disulfid-Brücken durch gezielte Mutationen. Bei den beiden letzten Methoden wurde auf die bioinformatischen Arbeiten von Chresten Søndergaard (*Department of Chemistry, Group of Prof. Jan Jensen, University of Copenhagen*) zurückgegriffen.

4.1 Anreicherung der GatDH-NHis

Aus einer 250 ml-Kultur konnten insgesamt 871 Units für das Substrat 1,2-Hexandiol gewonnen werden. Die spezifische Aktivität lag bei 4,3 U/mg. Nach Affinitätschromatographie an Nickelsepharose und anschließender Umpufferung mittels Gelfiltration konnte eine Gesamtaktivität von 547 Units gemessen werden. Das entspricht einer Ausbeute von 63%. Die spezifische Aktivität konnte auf 7,3 U/mg gesteigert werden. Das Enzym wurde 1,7-fach angereichert. In der Literatur konnten aus dem gleichen Kulturvolumen 1200 Units gewonnen werden. Die spezifische Aktivität im Rohextrakt liegt etwas unter den Literaturwerten (Kornberger, 2009), ebenso wie die spezifische Aktivität des reinen Enzyms (7,3 U/mg gegenüber ~15 U/mg bei Kornberger 2009). Auch die Ausbeute liegt laut Literatur bei über 80%, hier konnten jedoch nur 63% erreicht werden. Mögliche Gründe für die geringere Ausbeute sind eine nicht optimale Anzucht der Zellen oder eine verfrühte oder verspätete Induktion der GatDH-Expression. Durch das Einhalten der optimalen Anzuchtbedingungen ließe sich die Ausbeute sicherlich den Literaturwerten anpassen. Im Rahmen dieser Arbeit war jedoch nicht eine besonders hohe Ausbeute das oberste Ziel, sondern eher eine möglichst exakte Vergleichbarkeit der Expressionsversuche der unterschiedlichen Varianten.

4.2 Optimierung der Temperaturstabilität der GatDH

Für die Anwendung der GatDH in einem elektrochemischen Reaktor ist es notwendig, die Stabilität auch bei höheren Temperaturen zu verbessern. Zur Verbesserung der Temperaturstabilität wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Die Zufallsmutagenese oder *error-prone*-PCR führte dabei ebenso wie die Iterative Sättigungsmutagenese (ISM) zu keinen verbesserten Enzymvarianten. Bei der *error-prone*-

PCR werden zufällig Mutationen eingefügt. Das Screening dieser Varianten ist sehr arbeitsintensiv und die Zufallsmutagenese führt zu zahlreichen inaktiven bzw. verkürzten Varianten. Deshalb wurde auf die ISM zurückgegriffen. Bei dieser Methode werden Aminosäuren an bestimmten Positionen, die für eine bestimmte Eigenschaft besonders kritisch sind, zufällig gegen alle 20 proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht. So wurden solche Aminosäuren ausgewählt, die besonders hohe B-Faktoren aufweisen und somit für die Thermostabilität besonders kritisch sind. Durch die verwendeten Primer wurden gleichzeitig zwei Aminosäuren an den Positionen 49/50 und 201/202 ausgetauscht. Die Positionen 49/50 liegen in der Peripherie des Enzyms, während die Positionen 201/202 im aktiven Zentrum der GatDH liegen. Letztere führen somit mit größerer Wahrscheinlichkeit zu inaktiven Varianten. Die Wahrscheinlichkeit einer Mutation, durch die ein Stop-Codon generiert wird, wird durch die Verwendung bestimmter degenerierter Codons verringert. Dadurch wird der Screening-Aufwand deutlich eingeschränkt. Im Rahmen des Screenings im Mikrotiterplattenmaßstab konnten einige Varianten gefunden werden, die eine erhöhte Thermostabilität vermuten ließen. Nach einer Anzucht im größeren Maßstab (25 ml-Kultur) zeigten diese Varianten zwar prozentual erhöhte Thermostabilität, jedoch nur geringe spezifische Aktivität, weshalb sie für eine weitere Anwendung nicht interessant sind. Ein möglicher Grund dafür, dass keine verbesserten Varianten gefunden werden konnten, ist die Tatsache, dass trotz *DpnI*-Verdau nach der Mutagenese und Entfernung der Templates noch unmutierte Plasmide vorhanden sind. Die daraus resultierenden Proteine sind identisch mit der nativen GatDH und daher in ihren katalytischen und physikalischen Eigenschaften nicht verbessert. Ein weiteres Problem des Screenings im Mikrotiterplattenmaßstab ist die Bildung von Luftblasen, die zu einer höheren Absorption führen und somit verbesserte Varianten vermuten lassen.

Eine dritte Methode zur Verbesserung der Thermostabilität von Proteinen ist das rationale Design. Bei der Auswahl von geeigneten Mutanten wurde auf die bioinformatischen Arbeiten von Chresten Søndergaard (*Department of Chemistry, Group of Prof. Jan Jensen, University of Copenhagen*) zurückgegriffen. Mit Hilfe der Suchmaschinen BLAST, die für Sequenzhomologien verwendet wird, und DALI, welche für das Finden struktureller Homologien eingesetzt wird, wurden stabile Proteinstrukturen gesucht, die hohe Homologien mit der GatDH aufweisen. Insgesamt konnten 191 Proteine als Matrizen verwendet werden. Mit Hilfe des Programms „PropKa2“ wurden die stabilisierenden Interaktionen der Matrizenproteine identifiziert. Dieses Programm sagt die pKa-Werte der Proteine voraus, die die Basis für die Berechnung der elektrostatischen Kräfte sind, die zwischen den geladenen Gruppen innerhalb von Proteinen wirken. Stabilisierende

Interaktionen, die sich aus den Vergleichsproteinen ableiten, werden auf das Zielprotein übertragen. Diejenigen, die die Stabilität am positivsten beeinflussen werden ausgewählt, wobei solche Mutationen, die sich in der Nähe des aktiven Zentrums befinden oder die an der Interaktion der Monomere beteiligt sind, nicht beachtet wurden. Das anschließende Modelling mit Hilfe der „*alignment method*“ gibt Aufschluss über den Einfluss der Interaktionen auf die Stabilität. Von den vorgeschlagenen Mutationen wurden in Absprache mit Chresten Søndergaard die aussichtsreichen für eine Erhöhung der Thermostabilität ausgewählt. Die vorgeschlagenen Mutationen wurden mit Hilfe der *QuikChange*TM-Methode generiert. Insgesamt wurden 17 verschiedene Varianten erzeugt, von denen lediglich eine nicht aktiv war (A12R/P235D). Die Inaktivierung dieser Variante ist vermutlich durch den Austausch eines Prolins begründet. Durch seine charakteristische und einzigartige Struktur führt ein Austausch eines Prolins oder ein Austausch gegen ein Prolin erfahrungsgemäß fast immer zur Zerstörung der Proteinstruktur und damit zur Inaktivierung des Enzyms. Prolin wird oft als „Helixbrecher“ bezeichnet (Alías et al., 2009). Der Grund ist die fehlende Drehbarkeit am α -C-Atom aufgrund des Ringschlusses.

Zwei weitere Mutanten verloren ihre Aktivität bereits nach zehnminütiger Inkubation bei 45°C vollständig (A77H und A77H/A126E). Die Variante A77H/A126E wurde zunächst ausschließlich in Form unlöslicher *inclusion bodies* exprimiert. Folglich war das Enzym inaktiv. Durch die Coexpression des Chaperon-Plasmids pGro7 konnte die Expression als lösliches Protein gesteigert werden, jedoch betrug die Aktivität nur etwa 12 % im Vergleich zum Wildtyp. Chaperone werden oft auch als Faltungshelfer oder „molekulare Anstandsdamen“ bezeichnet (Alberts, 2005). Sie unterstützen die korrekte Faltung fehlerhaft gefalteter Proteine. Zur heterologen Expression werden elektrokompetente *E. coli* BL21Gold(DE3)-Zellen, die bereits das Plasmid mit der GatDH-Variante A77H/A126E tragen, mit den Plasmiden, die die Chaperone kodieren, transformiert. Durch die Anwesenheit der Chaperon-Plasmide wird den Zellen eine Chloramphenicol-Resistenz verliehen. Diese Resistenz kann als Beweis für die Anwesenheit der Chaperone in den Zellen herangezogen werden, da die Zellen durch die alleinige Anwesenheit des Expressionsvektors pET-24a(+) keine Chloramphenicol- sondern lediglich eine Kanamycin-Resistenz erhalten. Zum eindeutigen Nachweis der Anwesenheit der Chaperon-Plasmide und der Expressionsplasmide können entweder eine *Colony*-PCR oder ein Kontrollverdau der isolierten Plasmid-DNA durchgeführt werden.

Desweiteren können die Chaperone nach der Expression im SDS-Gel nachgewiesen werden. Im Falle des Chaperon-Plasmids pGro7 werden die beiden Chaperone GroEL und GroES, die Molekulargewichte von 60 bzw. 10 kDa aufweisen. Während GroEL deutlich im SDS-Gel

zu erkennen ist, ist GroES mit lediglich 10 kDa nicht mehr im Gel zu sehen. Durch die Coexpression dieser beiden Chaperone konnte der Anteil an löslichem Protein der GatDH-Variante A77H/A126E deutlich gesteigert werden. Diese fassförmigen Chaperone führen fehlgefaltete Proteine zur Proteolyse und unterstützen unter ATP-Verbrauch die korrekte Faltung der Proteine (Thomas, 1997). In der Vergangenheit wurde beschrieben, dass die Coexpression der Chaperone GroEL und GroES besonders nützlich für Proteine mit einem Molekulargewicht unter 60 kDa ist (Baneyx und Mujacic, 2004). Kleinere Proteine passen besser in die Höhle von GroEL, jedoch konnte auch die Aconitase, deren Molekulargewicht bei 82 kDa liegt, von GroEL *in vivo* und *in vitro* zurückgefaltet werden. Allerdings wird vermutet, dass dieser Prozess bei größeren Proteinen unabhängig vom Einschließen in die Faltungskammer erfolgt (Chaudhuri et al., 2001). Abbildung IV.1 zeigt ein Modell der Chaperon-unterstützten Proteinfaltung in *E. coli*. Es werden für die Coexpression von Chaperonen vor allem solche *E. coli*-Stämme verwendet, die protease-defizient sind, da Proteasen mit den Chaperonen um fehlgefaltete Protein-Aggregate konkurrieren können (Kanemori et al., 1997; Nishihara et al., 1998).

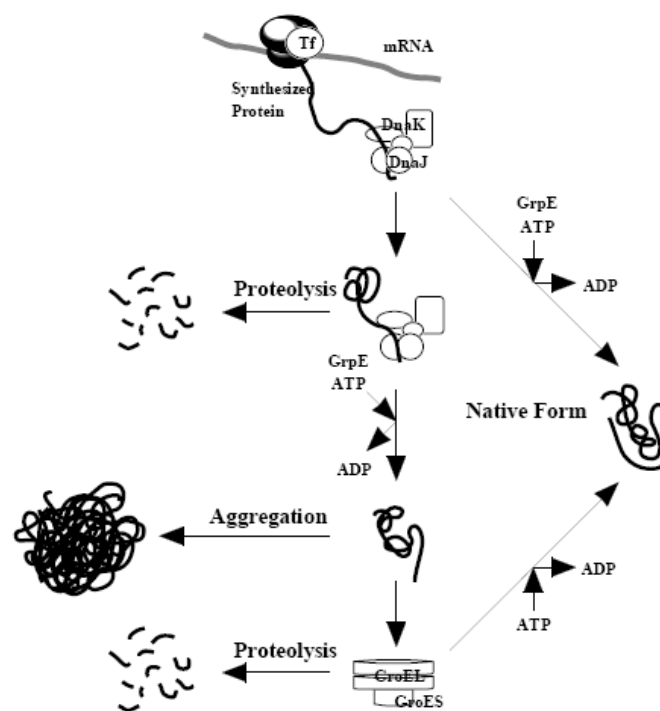


Abbildung IV.1: Modell der Chaperon-unterstützten Proteinfaltung in *E. coli* (Thomas, 1997).

In *in vivo* unterliegt die Proteinfaltung ständiger Gefährdung durch den sogenannten *crowding*-Effekt, die hohe makromolekulare Konzentration der zellulären Lösung. In *E. coli* befinden

sich ca. 340 g/l Proteine und andere Makromoleküle im zellfreien Extrakt (Agashe et al., 2000; Mogk et al., 2001; Hartl et al., 2002; Schlieker et al., 2002), wodurch die Fehlfaltung der Proteine und damit ihre Aggregation gefördert werden. Außerdem sind die Proteinsynthese und die -faltung räumlich eng begrenzt, wodurch die intrinsische Faltungsinformation eines Proteins bei naszierenden Polypeptidketten zu Beginn der Faltung nicht komplett vorliegt, sondern nur teilweise freigegeben wird. Proteine, die aus mehreren Domänen bestehen, können sich also nur posttranslational in ihre native Konformation falten. Viele Proteine besitzen deshalb während der Faltung temporär exponierte hydrophobe Bereiche. Diese müssen stabilisiert werden, um falsche Wechselwirkungen verschiedener Abschnitte der Polypeptidkette und somit die Bildung von *inclusion bodies* zu verhindern (Mogk et al., 2001, Barral et al., 2004). Diese Aufgabe wird von der zellulären Maschinerie der Chaperone übernommen.

GroEL und sein Cofaktor GroES, die im Falle der GatDH-Variante A77H/A126E die Ausbeute an löslichem Protein steigern konnten, gehören zu den Chaperoninen. Sie kommen ubiquitär vor (Mogk et al., 2001). Die Mitglieder dieser Klasse zeigen hohe Sequenzhomologien, besitzen ein Molekulargewicht von etwa 60 kDa und bilden Doppelring-Komplexe, wobei jeder Ring eine zentrale Höhle umschließt. Sie sind für die Zelle unter allen Bedingungen notwendig (Agashe et al., 2000; Schlieker et al., 2002). Im Falle von GroEL besteht ein Ring aus sieben homo-oligomeren Einheiten, wobei jede dieser Einheiten aus einer äquatorial angeordneten ATP-Bindedomäne, einer mittleren verbindenden Domäne und einer apikalen Substrat-Bindedomäne aufgebaut ist (Mogk et al., 2001; Barral et al., 2004). Die Mechanismen von Faltung und Entfaltung des Proteins laufen hierbei an beiden Ringen phasenverschoben ab (Mogk et al., 2001; Hartl et al., 2002). Hat ein Protein an einen Ring gebunden, folgt die Bindung von ATP und der Cofaktor GroES verschließt die Höhle. Dadurch ändert GroEL seine Konformation und die Größe der zentralen Höhle sowie die Hydrophilie der inneren Oberfläche nehmen zu. Es kommt zur Bildung des sogenannten Anfinsen-Käfigs (Barral et al., 2004). Die N- und C-Termini des eingeschlossenen Proteins sind an verschiedenen Stellen der inneren Oberfläche gebunden. Durch die Konformationsänderung wird das Protein nun zunächst global entfaltet, um sich dann unbeeinflusst vom *crowding*-Effekt in seine native Form zu falten. Nach ATP-Hydrolyse und Bindung von ATP am entgegengesetzten Ring werden GroES und das neu gefaltete Protein von GroEL freigesetzt. Die gleiche Reaktion läuft nun am entgegengesetzten Ring ab. Es können mehrere Zyklen aus Entfaltung und Faltung notwendig sein bis ein Protein seine native Konformation erreicht hat (Mogk et al., 2001; Hartl et al., 2002; Barral et al., 2004).

Der Triggerfaktor, der direkt nach der Proteinsynthese cotranslational die korrekte Faltung eines Proteins unterstützt (Agashe et al., 2000), führte zu keiner Verbesserung bei Coexpression mit der GatDH-Variante A77H/A126E. Dabei sollte diese cotranslationale Faltungsunterstützung gerade für Multi-Domän-Proteine besonders geeignet sein, da so mögliche unproduktive inter- und intramolekulare Wechselwirkungen während früher Faltungsschritte begrenzt werden (Ferbitz et al., 2004). Trotzdem konnte im Falle der tetrameren GatDH keine Verbesserung der Ausbeute an löslichem Protein erzielt werden. Im Falle der Pyranose-2-Oxidase, die ebenfalls ein Tetramer ist, konnte durch die Coexpression des Triggerfaktors die spezifische Aktivität am meisten gesteigert werden, wobei wahrscheinlich auch die zweite Aktivität des Triggerfaktors – die Prolinisomerisierung (Schiene und Fischer, 2000) – beansprucht wird (Pitz, 2007).

Die Coexpression der Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE sowie eine Kombination der Chaperone DnaK, DnaJ und GrpE mit GroEL/GroES bewirkte ebenfalls keine bzw. nur eine leichte Verbesserung der Löslichkeit der GatDH-Variante A77H/A126E. In der Literatur wird ein so genanntes Netzwerk-Modell der Chaperone beschrieben (Mogk et al., 2001). Dabei konkurrieren die verschiedenen Chaperone um die fehlgefalteten Proteine. Wahrscheinlich stört diese Konkurrenz den Faltungsprozess. Gleiches gilt für die Kombination des GroEL/GroES-Systems mit dem Triggerfaktor.

Die meisten Varianten, die durch rationales Design erzeugt wurden, erreichten nach zehnminütiger Inkubation bei 45°C prozentual gesehen höhere Restaktivitäten als die Wildtyp-Variante, jedoch waren die Ausgangsaktivitäten meist zu niedrig, so dass diese Varianten für eine weitere Verwendung und vor allem zum Erzielen möglichst hoher Ausbeuten wenig geeignet sind. Die Variante S87D erreichte 119,2 % der Wildtyp-Aktivität, verlor jedoch nach zehnminütiger Inkubation bei 45°C mehr als 90 % ihrer Ausgangsaktivität. Die Varianten A57E und A58R zeigten noch höhere Ausgangsaktivitäten als S87D und erreichten 130,4 bzw. 123,1 % der Wildtyp-Aktivität. Nach zehn Minuten bei 45°C waren bei diesen Varianten noch 29,5% bzw. 17,8% der Ausgangsaktivität übrig. Dies ist zwar keine echte Thermostabilität, jedoch sind diese Varianten deutlich stabiler als der Wildtyp und bedeuten somit eine Verbesserung der Hitzestabilität. Eine Kombinations-Variante beider Mutationen zeigte zwar ebenfalls eine vergleichbar hohe Restaktivität nach der Inkubation bei 45°C, jedoch war auch hier die Ausgangsaktivität relativ gering. Auch die Coexpression von Chaperonen konnte keine Verbesserung der Löslichkeit und damit der Ausbeute an aktivem Protein hervorrufen. Eine mögliche Erklärung der verbesserten Stabilität der Varianten A57E und A58R ist vermutlich die vermehrte Wasserstoffbrückenbildung zwischen benachbarten Aminosäureresten. Abbildung IV.2 zeigt

die beiden Aminosäuren A57 und A58 und ihre Lokalisation in einem Loop an der Peripherie der GatDH. Loop-Regionen sind sehr flexibel und daher kritisch für die Thermostabilität. Vermutlich wurden durch den Aminoäsureaustausch an den Positionen 57 und 58 neue Wasserstoffbrücken erzeugt, die den Loop stabilisieren. Dies konnte bereits mehrfach beschrieben werden (Arnold et al., 2001; Gershenson et al., 2000; Colombo und Merz, 1999).

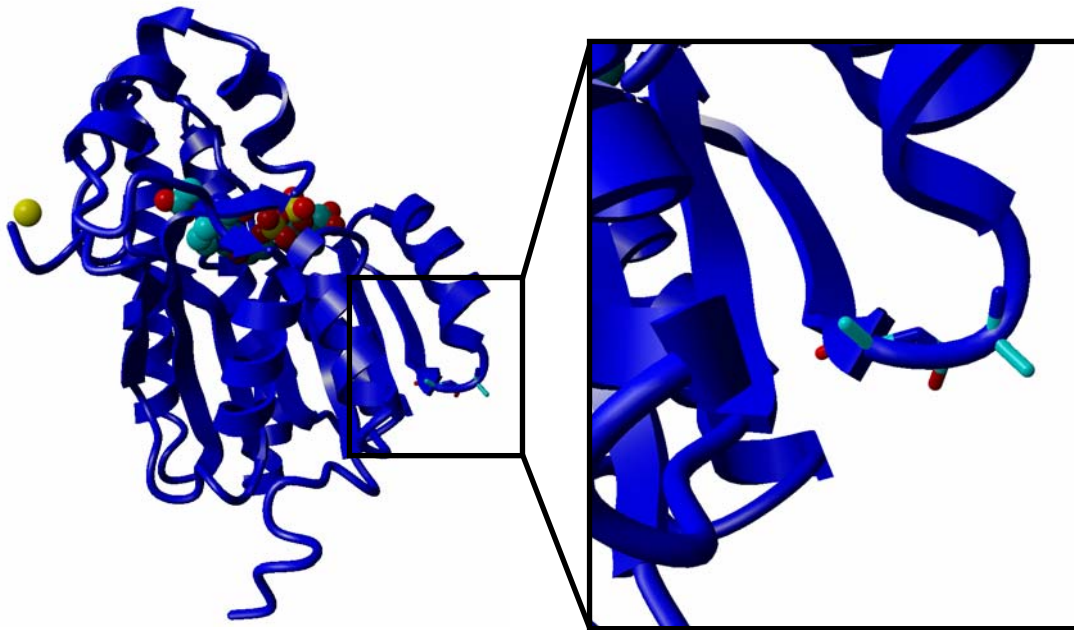


Abbildung IV.2: Monomer der GatDH und die Lokalisation der beiden Aminosäuren A57 und A58 in einem Loop an der Enzym-Peripherie. a) gesamtes Monomer, b) Vergrößerung des Loops mit den Aminosäuren A57 und A58.

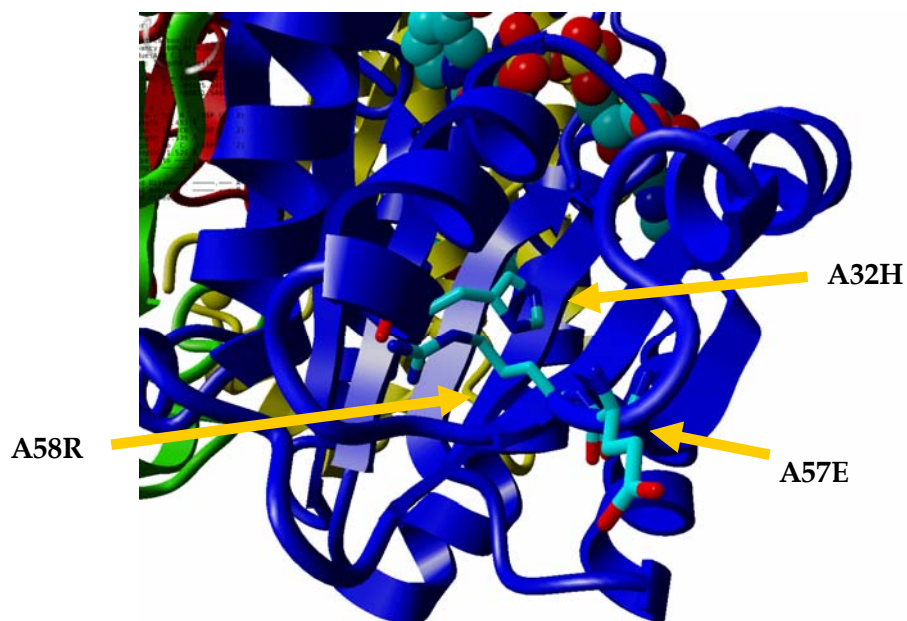


Abbildung IV.3: Sterische Hinderung der drei ausgetauschten Aminosäuren A32H, A57E und A58R.

Die vorgeschlagene Dreifachmutante A32H/A57E/A58R zeigte nur geringe Ausgangsaktivität, was auf eine zunehmende sterische Hinderung der drei Aminosäuren im Loop begründet zu sein scheint (siehe Abbildung IV.3). Bereits der Austausch an Position A32 gegen Histidin (A32H) bewirkte einen großen Aktivitätsverlust (~60%). Diese Aminosäure liegt nicht mehr im Loop, sondern in einer Helix. Durch den Austausch des relativ kleinen Alanins gegen ein eher großes Histidin, wird vermutlich diese Helix in ihrer Struktur derart verändert, dass die korrekte Faltung des Enzyms nicht gewährleistet werden kann. Folglich verliert das Enzym an Aktivität. Der Austausch von A32H wirkt sich auch in Kombination mit den Austauschen A57E bzw. A58R negativ auf die Enzymaktivität aus. Beide Varianten (A32H/A57E und A32H/A58R) zeigen deutlich verringerte Aktivitäten im Vergleich zum Wildtyp (13,7% bzw. 17,8%) und nur unwesentlich verbesserte Stabilität (9,7% bzw. 13,6% Restaktivität im Vergleich zu 5,3% beim Wildtyp). Die Variante A57E/A58R zeigt ebenfalls hohe Restaktivität nach einer zehnminütigen Inkubation bei 45°C (22,5%), jedoch ist ihre Ausgangsaktivität sehr gering: sie beträgt lediglich 6% der Wildtyp-Aktivität. Diese geringe Enzymaktivität ist vermutlich auch auf eine sterische Hinderung durch die relativ großen Aminosäurereste E (Glutaminsäure) und R (Arginin) zurückzuführen.

Eine vierte Möglichkeit zur Stabilisierung mesophiler Enzyme bei höheren Temperaturen ist die Generierung neuer Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten (Björk et al., 2003). Zahlreiche Protein-Engineering-Projekte befassen sich mit der Verbesserung der Thermostabilität. Vor allem Proteine aus hyperthermophilen Organismen dienen dabei als Modelle, um die stabilisierenden Strukturen, die zur erhöhten Thermostabilität führen, sind dabei von großem Interesse (Russel et al., 1994; Yip et al., 1995; Yip et al., 1998; Arnott et al., 2000; Szilagyi und Zavodszky, 2000; Vieille und Zeikus, 2001). Allerdings können keine allgemeinen Regeln für die Erhöhung der Thermostabilität formuliert werden (Van den Burg und Eijsink, 2002). In einigen Studien konnte eine Korrelation zwischen Thermostabilität und dem Oligomerisationsstatus beobachtet werden (Vieille und Zeikus, 2001; Jaenicke und Bohm, 1998; Walden et al., 2001). Interaktionen zwischen den Untereinheiten führen also zu einem stabileren Enzym (Arnott et al., 2000; Thoma et al., 2000; Kabashima et al., 2001; Trejo et al., 2001; Clantin et al., 2001; Flores und Ellington, 2002; Maeda et al., 2002; Bogin et al., 2002). So gewann zum Beispiel die Malat-Dehydrogenase (CaMDH) aus *Chloroflexus aurantiacus* deutlich an Stabilität durch die Generierung einer neuen Disulfidbrücke am Dimer-Dimer-Interface (Björk et al., 2003). Ebenso wie die GatDH ist die CaMDH ein Tetramer. Beide Enzyme können als ein Dimer aus zwei Dimeren betrachtet werden. Aufgrund der Ähnlichkeiten im Oligomerisationsstatus sollte diese Methode auch angewandt

werden, um die Thermostabilität der GatDH zu erhöhen. Die bisherigen Erfolge in vergleichbaren Studien variieren (Kabashima et al., 2001; Bunting et al., 2002), jedoch führte diese Strategie bei verschiedenen dimeren Proteinen zu Erfolgen (Sauer et al., 1986; Shirakawa et al., 1991; Gokhale et al., 1994; Tamura et al., 1994). Auch hier wurde auf die bioinformatischen Arbeiten von Chresten Søndergaard zurückgegriffen, um geeignete Mutationen ausfindig zu machen. Ebenso wie bei der CaMDH wurde für die GatDH das Programm *WHAT IF* (Vriend, 1990) verwendet, um solche Positionen zu identifizieren, an denen neue Disulfidbrücken durch gezielte Mutationen erzeugt werden können. Dabei wurden nur solche Mutationen berücksichtigt, die tatsächlich am Dimer-Dimer-Interface der GatDH liegen. Solche, die z.B. am aktiven Zentrum liegen, wurden von vorne herein ausgeschlossen. Die meisten Varianten jedoch zeigten trotz guter Expression keine Aktivität. Bei denjenigen Varianten, die als unlösliche *inclusion bodies* exprimiert wurden, konnte auch die Coexpression der Chaperone GroEL und GroES, die bereits bei der Variante A77H/A126E zur Verbesserung der Löslichkeit führten, keine höhere Ausbeute an löslichem Protein hervorrufen. Die einzige Variante, die aktiv war, war M160C/Q168C, jedoch zeigte diese Variante keine verbesserte Thermostabilität. Da die Aminosäure Methionin ebenfalls ein Schwefel-Atom enthält, mit dem ebenfalls Disulfidbrücken eingegangen werden können, wurden folgende Einzelmutationen getestet: Q168C und Q168M. Die Variante GatDH-Q168C zeigte zwar Aktivität, jedoch war diese im Vergleich zum Wildtyp sehr gering. Die Variante zeigte auch keine verbesserte Thermostabilität. Die Variante GatDH-Q168M zeigte etwa 60% der Wildtyp-Aktivität und eine leicht verbesserte Thermostabilität gegenüber der GatDH-NHis. Zwar verliert sie bei niedrigeren Temperaturen unter 50°C schneller an Aktivität als der Wildtyp, jedoch ist bei höheren Temperaturen, bei denen die GatDH-NHis bereits keine Restaktivität mehr zeigt, noch etwa 20% Restaktivität vorhanden. Ebenso wie beim rationalen Design, kann hier nicht von echter Thermostabilität gesprochen werden, jedoch ist es eine Verbesserung, auf der weiter aufgebaut werden kann. Selbstverständlich kann die Ausbildung der Disulfid-Brücke nur vermutet und mit moderner Software errechnet werden.

Aus einer 250 ml-Kultur konnten für die Variante GatDH-Q168M 510 Units gewonnen werden. Die spezifische Aktivität des Enzyms liegt bei 2,7 U/mg im Rohextrakt und ist somit etwas niedriger als beim Wildtyp (4,3 U/mg), jedoch ausreichend für weitere Anwendungen. Im Verlauf der Anreicherung konnte die spezifische Aktivität trotz vergleichbarer Reinheit jedoch nur auf 3,1 U/mg gesteigert werden. Die Ausbeute betrug ebenfalls nur 35%. Durch die Optimierung der Anzuchtbedingungen und der Enzymanreicherung kann dies jedoch noch verbessert werden. Da das Protein fast

ausschließlich als lösliches Protein im Rohextrakt exprimiert wird, ist vermutlich ein Überladen der Säule der Grund für die geringe Ausbeute.

5. Mandelat-Dehydrogenase aus *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (DMDH) und aus *Pseudomonas putida* (LMDH)

Als weitere Modellenzyme sollten eine lösliche und eine membrangebundene Mandelat-Dehydrogenase zum Projekt ERUDES beigesteuert werden. DMDH und LMDH sollen außerdem in einem weiteren Projekt Anwendung finden. Aufgrund ihres Anwendungspotentials für die Produktion enantiomerenreiner α -Hydroxysäuren, sind sie für die Herstellung semi-synthetischer Antibiotika interessant (Hummel et al., 1988; Kim und Yun, 2004). Die lösliche DMDH ist NAD⁺-abhängig, die membrangebundene LMDH ist FMN-abhängig. Dies wiederum eröffnet die Möglichkeit, die verschiedenen Systeme in elektrochemischen Anwendungen zu vergleichen. Durch gezielte Modifikationen sollen die beiden Enzyme auch in diesem Projekt an Gold-Nanopartikeln direkt immobilisiert werden. Diese Gold-Nanopartikel dienen als Additive in den Sol-Gel-Schichten. Für die lösliche DMDH sollen hier dieselben Sol-Gel-Systeme verwendet werden wie sie bereits erfolgreich für die D-Sorbitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* angewandt wurden (Wang et al., 2010; Gajdzik et al., 2007). Für die membrangebundene LMDH soll diese Methode mit Vesikeln, die in der Sol-Gel-Matrix eingeschlossen sind, angewandt werden.

5.1 DMDH aus *L. lactis* subsp. *cremoris*

Die D-Mandelat-Dehydrogenase gehört zu den Hydroxysäure-Dehydrogenasen und katalysieren die stereospezifische Reduktion von verzweigten 2-Ketosäuren zu 2-Hydroxysäuren. Bei der Entstehung des Käsearomas durch den Abbau von Aminosäuren spielen sie eine wichtige Rolle (Chambellon et al., 2009), jedoch sind sie auch an einer Vielzahl weiterer Prozesse beteiligt, darunter die Produktion von stereospezifischen Isomeren der 2-Hydroxysäuren für die Herstellung semisynthetischer Antibiotika (Kallwass, 1992). Aufgrund der fungiziden und antilisterialen Aktivitäten der 2-Hydroxysäuren sind Hydroxysäure-Dehydrogenasen auch beteiligt an den konservierenden Eigenschaften der Milchsäurebakterien (Dieuleveux und Gueguen, 1998; Lavermicocca et al., 2003; Wilson et al., 2005).

5.1.1 Klonierung, heterologe Expression des DMDH-Gens und Anreicherung des rekombinanten Enzyms

Die Amplifikation des DMDH-Gens aus der genomischen DNA von *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ergab eine sehr spezifische Bande erwarteter Größe (939 kb). Mit Hilfe der verwendeten Primer (DMDH_f und DMDH_r) wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Nde*I und *Bam*HI an das PCR-Produkt angefügt, über die das Fremdgen in den Expressionsvektor pET-24a(+) einkloniert wurde. Die heterologe Expression der DMDH erfolgte wie in Kapitel II.8 beschrieben. Eine SDS-PAGE zur Expressionskontrolle ergab eine prominente, überexprimierte Bande bei etwa 36 kDa, was sehr gut mit dem mit Hilfe von *VectorNTI* errechneten Molekulargewicht der Untereinheiten übereinstimmt (34,471 kDa). In der Literatur wird das errechnete Molekulargewicht einer Untereinheit mit 34,361 kDa angegeben, wobei auch hier nach einer SDS-PAGE eine Bande bei etwa 36 kDa zu erkennen ist (Chambellon et al., 2009). Durch Sequenzierung der rekombinanten Plasmide mit vektorspezifischen Primern konnte die Identität der DMDH aus *L. lactis* bestätigt werden.

Zur vereinfachten Anreicherung wurde eine Variante mit N-terminalem His₆-Tag konstruiert. Im Vergleich zur nativen DMDH ist diese Variante um etwa 1 kDa pro Untereinheit vergrößert (35,279 kDa). Die Anreicherung der DMDH erfolgte mittels Affinitätschromatographie an Nickelsepharose. Aus einer 250 ml-Kultur konnten insgesamt etwa 4500 Units gewonnen werden, die spezifische Aktivität liegt im Rohextrakt bei 7,9 U/mg. Im Verlauf der Anreicherung gingen etwa 30% der Gesamtaktivität verloren. Die spezifische Aktivität konnte allerdings auf 22,2 U/mg gesteigert werden. Das Enzym wurde 2,8-fach angereichert. In der Literatur sind die spezifischen Aktivitäten für die Reduktion von Leucin mit 2 U/mg und für Benzoylformiat mit 3,1 U/mg bei pH 7 und 37°C angegeben. Für D-Mandelat liegt die spezifische Aktivität laut Literatur bei 38 ± 3 U/mg (Chambellon et al., 2009). Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Enzymaktivität für das Substrat D-Mandelat liegt bei 22,2 U/mg und ist somit gegenüber dem Literaturwert leicht erniedrigt. Andere Substrate wurden in dieser Arbeit nicht getestet.

5.1.2 Biochemische Charakterisierung der DMDH

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde im Vergleich zu Chambellon et al. (2009) ein leicht modifizierter Aktivitätstest durchgeführt. In der Literatur wurde die Enzymaktivität mit Hilfe der Formazanbildung aus Iodonitrotetrazolium bestimmt. Außerdem wurde

während des Enzymassays eine Diaphorase verwendet, die den Elektronentransfer begünstigen soll. In dieser Arbeit wurde die Enzymaktivität anhand der NADH + H⁺-Bildung während der Reaktion gemessen. Die Menge an entstandenem NADH + H⁺ ist dabei der Menge an umgesetzten Substrat äquivalent. Der Assay zur Bestimmung der D-Mandelat-DH-Aktivität enthielt 500 µl Tris/HCl-Puffer (200 mM, pH 9), 30 µl NAD⁺ (36 mM), 270 µl H₂O_{deion.} und 100 µl des mit Messpuffer verdünnten Enzyms. Als Messpuffer diente in der Literatur TAE-Phosphat-Puffer, der mit 1% Triton versetzt war. Die Verwendung von Triton im Messpuffer hatte jedoch keinen Einfluss auf die Enzymaktivität, weshalb auf einen Triton-Zusatz verzichtet werden konnte. Auf diese Weise können außerdem die Kosten für Iodonitrotetrazolium und Diaphorase eingespart werden.

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurden verschiedene Puffer verwendet, die einen pH-Bereich zwischen 3 und 12 abdecken. Für die Oxidation von D-Mandelat ergab sich ein pH-Optimum von 9, was mit dem Literaturwert übereinstimmt (Chambellon et al., 2009). Das Optimum der Reduktionsreaktion, die hier nicht getestet wurde, liegt laut Chambellon et al. (2009) bei pH 7.

Das Temperatur-Optimum der Oxidation von D-Mandelat liegt bei 40°C. Das Enzym ist jedoch über einen relativ weiten Temperaturbereich zwischen 30°C und 40°C sehr stabil und zeigt ähnliche Enzymaktivitäten. Erst ab einer Temperatur von 45°C verliert die DMDH deutlich an Aktivität. In der Literatur ist jedoch das Temperatur-Optimum bei 55°C angegeben und bei 37°C betrug die Enzymaktivität lediglich 65% des Maximalwerts (Chambellon et al., 2009). Bei 55°C konnte jedoch während dieser Arbeit keine Aktivität mehr gemessen werden. Ein möglicher Grund für die geringere Stabilität des Enzyms könnte die Verwendung eines anderen Puffer-Systems sein. Chambellon et al. (2009) verwendeten TAE-Puffer mit 1% Triton (pH 9). Milde Detergenzien wie Triton X-100 und CHAPS können die Erhaltung der nativen Proteinstruktur unterstützen. Jedoch wurde auch hier Triton ausschließlich im Messpuffer verwendet, die Proteinlösung wurde nicht durch Triton X-100 stabilisiert. Auch der Einsatz des gleichen Puffers konnte keine Verbesserung der Stabilität erzielen.

Eine native PAGE und eine Gelfiltrationschromatographie identifizierten das Enzym als Dimer. Mit Hilfe von Proteinen bekannten Molekulargewichts konnte für die His₆-getaggte DMDH ein Molekulargewicht von etwa 72 kDa mittels nativer PAGE und von 72,8 kDa mittels Gelfiltration ermittelt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Chambellon et al. (2009) überein.

Eine isoelektrische Fokussierung zur Bestimmung des pI der DMDH ergab einen pI im pH-Bereich zwischen 4,9 und 5,3. Anhand der Aminosäuresequenz konnte mit Hilfe des „EMBL

WWW Gateway to Isoelectric Point Service“ ein theoretischer pI von 5,29 bestimmt werden. Das Programm VectorNTI (Invitrogen) ermittelte einen theoretischen pI von 5,81 für das His₆-getaggte Protein. Das ungetaggte Protein besitzt laut VectorNTI einen pI von 5,37. Die sechs basischen Histidine verschieben den pI sinngemäß mehr in Richtung des basischen pH-Werts. Der mittels isoelektrischer Fokussierung ermittelten pI-Werte stimmen also recht gut mit den theoretisch errechneten pI-Werten. Literaturwerte, die zum Vergleich herangezogen werden könnten, konnten nicht gefunden werden.

Die kinetischen Parameter für das Substrat D-Mandelat und für NAD⁺ wurden ebenfalls bestimmt. Der K_m-Wert für D-Mandelat liegt bei 0,37 mM. Chambellon et al. bestimmten einen K_m-Wert für D-Mandelat, der bei 3,0 mM liegt. Der von uns bestimmte K_m-Wert ist also um eine Zehnerpotenz verbessert. Ein möglicher Grund ist der optimierte Aktivitätstest, der unabhängig von Iodonitrotetrazolium und einer Diaphorase ist. Die Wechselzahl k_{cat} oder auch *turnover number* ist ein Maß für die Effizienz eines Enzyms. Sie gibt an, wie viele Substratmoleküle bei vollständiger Sättigung des Enzyms pro Zeiteinheit in das Reaktionsprodukt umgesetzt werden. Sie entspricht der kinetischen Konstanten k₂ und wird über die Maximalgeschwindigkeit v_{max} und die Gesamtkonzentration der aktiven Zentren des Enzyms berechnet. Die für die DMDH ermittelte Wechselzahl liegt bei 26640 s⁻¹. Für die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m ergibt sich ein Wert von 72000 s⁻¹ mM⁻¹. Zum Vergleich können mit dem K_m-Wert aus der Literatur (3 mM) folgende kinetischen Parameter berechnet werden. Mit einer spezifischen Aktivität von 0,63 mol / (s x g) und einem Molekulargewicht der DMDH von 72000 g/mol ergibt sich für die Wechselzahl k_{cat} ein Wert von 45360 s⁻¹. Die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m liegt somit bei 15120. Die Wechselzahl k_{cat} für das Enzym aus der Literatur ist also 1,7-fach erhöht.

5.2 LMDH aus *Pseudomonas putida*

Die L-Mandelat-Dehydrogenase aus *P. putida* ist ein FMN-abhängiges, membranassoziiertes Enzym (Mitra et al., 1993). Sie katalysiert die Oxidation von L-Mandelat zu Benzoylformiat (Xu und Mitra, 1999) und ist am Mandelat-Pathway von *P. putida* beteiligt (Tsou et al., 1990). Abbildung IV.4 zeigt den Mandelat-Pathway nach Tsou et al. (1990). Am Mandelat-Pathway in *Pseudomonas putida* sind folgende Enzyme beteiligt: Mandelat-Racemase (*mdlA*), L-Mandelat-Dehydrogenase (*mdlB*), Benzoylformiat-Decarboxylase (*mdlC*), eine NAD⁺-abhängige Benzaldehyd-Dehydrogenase (*mdlD*) und eine NADP⁺-abhängige Benzaldehyd-Dehydrogenase (*mdlE*). Die Gene *mdlC*, *mdlB* und *mdlA* sind in einem einzigen Operon (*mdlCBA*) organisiert (Ransom et al., 1988). Die L-Mandelat-Dehydrogenase weist hohe

Homologien zur Glykolat-Oxidase aus Spinat und zur Ferricytochrom-b₂-Lactat-Dehydrogenase aus Hefe auf (Tsou et al., 1990), während für die Mandelat-Racemase Sequenzähnlichkeiten zu Muconat lactonisierenden Enzymen gefunden werden konnten (Neidhardt et al., 1990). Die Benzoylformiat-Dehydrogenase zeigt Homologien zu Enzymen, die Pyruvat mit Thiamin-Pyrophosphat als Cofaktor decarboxylieren. Durch diese Beobachtungen wird die Hypothese unterstützt, dass der Mandelat-*Pathway* durch die Rekrutierung von Enzymen bereits existierender metabolischer *Pathways* entstanden ist (Tsou et al., 1990). Die Enzyme des Mandelat-*Pathway* erlauben es verschiedenen Pseudomonaden, eins oder beide Enantiomere des Mandelats als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen (Fewson, 1988). Normalerweise wird für den Katabolismus von D-Mandelat die Anwesenheit der Mandelat-Racemase benötigt, um L-Mandelat herzustellen, welches dann durch die anderen am Mandelat-*Pathway* beteiligten Enzyme oxidativ zu Benzoat abgebaut werden kann (Tsou et al., 1990).

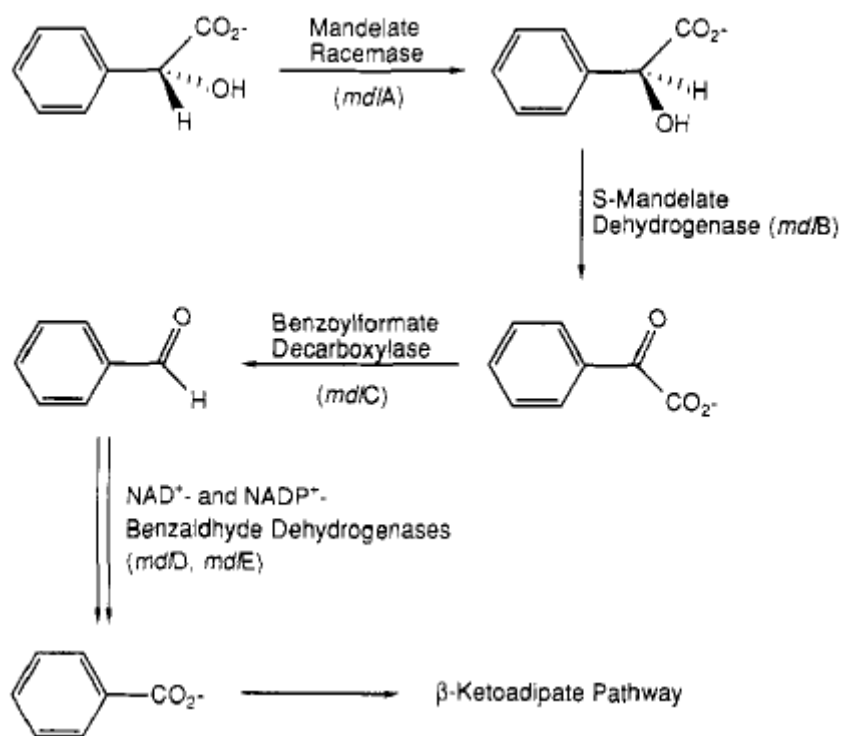


Abbildung IV.4: Mandelat-*Pathway* in *Pseudomonas putida* ATCC 12633 (Tsou et al., 1990).

Zunächst wurde die Enzymaktivität in der Vesikelfraktion von *P. putida* bestimmt. *P. putida* wurde dazu in einem geeigneten Medium angezogen und die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen. Aus dem so erhaltenen Überstand konnte durch Ultrazentrifugation bei 150000 x g die Vesikelfraktion isoliert werden. Die Bestimmung der

Enzymaktivität beruht auf der Reduktion von DCPIP, die photometrisch bei 600 nm verfolgt werden kann. In der Vesikelfraktion konnte eine Volumenaktivität für die Oxidation von L-Mandelat durch die LMDH von 7,5 U/ml gemessen werden. Die spezifische Aktivität betrug 2 U/mg.

5.2.1 Klonierung und heterologe Expression des LMDH-Gens

Mit Hilfe der Primer LMDH_f und LMDH_r wurde das Gen der LMDH aus der genomischen DNA von *P. putida* amplifiziert. Durch die verwendeten Primer wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Nde*I und *Bam*HI an das 1182 bp lange PCR-Produkt angefügt, über die das PCR-Produkt in den Expressionsvektor pET-24a(+) einkloniert wurde. Die Sequenzierung des rekombinanten Plasmids ergab die korrekte Sequenz der LMDH. Die heterologe Expression, die wie in II.8 beschrieben erfolgte, und anschließende Expressionskontrolle im SDS-Gel ergab eine überexprimierte Bande eines Molekulargewichts von etwa 43 kDa (43,352 kDa). Jedoch wird das Protein auch nach heterologer Expression nur in der Pelletfraktion als unlösliche *inclusion bodies* exprimiert. In der Vesikelfraktion des rekombinanten *E. coli* ist keine Aktivität nachweisbar. Die Ergebnisse von Mitra et al. (1993) konnten somit nicht bestätigt werden. Aufgrund der identischen Proteinsequenz könnte dies auf das verwendete Expressionssystem (*E. coli* BL21Gold(DE3), Expressionsvektor pET-24a(+)), welches in der Arbeitsgruppe bereits vielfach erfolgreich verwendet wurde, zurückzuführen sein, welches sich von dem in der Literatur (Mitra et al., 1993) verwendeten (*E. coli* JM105; Expressionsvektor pKK223-3) unterscheidet. Durch die Wahl eines anderen Expressionssystems könnte der Einbau der LMDH in die Vesikel auch bei heterologer Expression möglicherweise bestätigt werden.

5.2.2 Konstruktion zweier Deletionsmutanten der LMDH und der beiden Chimären aus LMDH und GOX und die Auswirkungen auf die Löslichkeit der Enzyme

In früheren Studien über die Verbesserung der Löslichkeit der LMDH aus *Pseudomonas putida* wurde ein 53 Aminosäuren langes Fragment identifiziert, welches für die Membranassoziation verantwortlich ist. Durch Deletion dieses Fragments und durch die Konstruktion zweier chimärer Proteine, konnte die Löslichkeit der LMDH verbessert werden. Eine Chimäre, bei der das komplette Membranbindeselement deletiert und gegen die korrespondierenden 34 Aminosäuren der Glykolat-Oxidase aus Spinat wurde, war zwar löslich, jedoch handelte es sich bei der Chimäre um ein ineffizientes, unspezifisches Enzym

(Xu und Mitra, 1999). In einem zweiten Experiment konnte gezeigt werden, dass das Membranbindeselement etwas kürzer ist und nur aus etwa 39 Aminosäuren besteht. Die Deletion dieses Fragments zerstörte die Membranassoziation der LMDH und wirkte sich nicht auf die katalytischen Eigenschaften der LMDH aus. Bei der zweiten Chimäre wurden 39 Aminosäuren des Membranbindeselements gegen die korrespondierenden 20 Aminosäuren der Glykolat-Oxidase aus Spinat ersetzt. Diese zweite Chimäre war in ihren katalytischen Eigenschaften sehr ähnlich zum Wildtyp-Enzym (Xu und Mitra, 1999).

Die membranassoziierte L-Mandelat-Dehydrogenase aus *P. putida* weist hohe Homologien zu verschiedenen Vertretern einer Familie von FMN-abhängigen α -Hydroxysäure-Dehydrogenasen/Oxidasen auf. Zu dieser Familie zählt neben der Lactat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium*, Flavocytochrom b_2 aus Hefe und einer *long-chain* α -Hydroxysäure-Oxidase aus Rattenniere auch die Glykolat-Oxidase aus Spinat (Stenberg et al., 1995). Im Gegensatz zu all diesen Vertretern dieser Familie, ist die LMDH aus *P. putida* ein membranassoziiertes Protein. Durch Vergleiche auf Aminosäureebene konnte ein großer Bereich innerhalb der LMDH detektiert werden, der keine signifikante Homologie zu den anderen Vertretern zeigte. Dieser Bereich ist zudem bei der LMDH länger als bei den anderen Vertretern. Diese interne, nicht-homologe Region konnte durch Vergleich mit anderen Strukturen der Glykolat-Oxidase und des Flavocytochrom b_2 einem großen, auf der Enzymoberfläche exponierten Segment zugeordnet werden, welches in direkter Nachbarschaft zum aktiven (FMN-bindenden) Zentrum liegt. So konnte gefolgert werden, dass diese nicht-homologe Sequenz für die Membranassoziation verantwortlich ist (Mitra et al., 1993).

Zur Verbesserung der Löslichkeit der LMDH sollte nun zunächst die Membranbindedomäne deletiert werden. Auch nach Deletion der Aminosäuren 2 bis 4 am N-Terminus bzw. der letzten 17 Aminosäuren am C-Terminus blieb die Membranassoziation der MDH erhalten (Mitra et al., 1993). Die Membranbindung wurde durch Sequenzvergleiche mit anderen Vertretern der Enzymfamilie, die nicht membrangebunden sind, einem internen Bereich der MDH zugeschrieben, der aus ca. 50 Aminosäuren besteht (Mitra et al., 1993). Eine ähnliche Insertion wurde bei der L-Lactat-Dehydrogenase aus *E. coli* gefunden (Dong et al., 1993). Es wurden zwei verschiedene Deletionsmutanten erzeugt. Zum einen wurden die Aminosäuren 177-215 deletiert, in einer zweiten Mutante wurden die Aminosäuren 177-229 deletiert. Die beiden Deletionsmutanten wurden durch SOE-PCR erzeugt. Die korrekte Deletion der Membranbindeselemente wurde durch Sequenzierung der rekombinanten Plasmide und Auswertung mit Hilfe des Programms *VectorNTI* bestätigt. Eine SDS-PAGE zur Expressionskontrolle nach heterologer Expression der beiden Deletionsmutanten zeigte

jedoch kein lösliches Protein. Die beiden Deletionsmutanten wurden ebenfalls ausschließlich als unlösliche *inclusion bodies* exprimiert. Durch die Deletion des mutmaßlichen Membranbindesegments konnte die Löslichkeit also nicht verbessert und die Ergebnisse aus der Literatur nicht bestätigt werden.

Da durch die Deletion der mutmaßlichen Membranbindedomäne keine Verbesserung der Löslichkeit erzielt werden konnte, sollte nun diese Membranbindedomäne gegen die korrespondierenden Bereiche der löslichen Glykolat-Oxidase (GOX) aus Spinat ausgetauscht werden. Da die Amplifikation der GOX aus der genomischen Spinat-DNA nicht das gewünschte Fragment lieferte, wurden die beiden chimären Proteine mittels SOE-PCR erzeugt. Das chimäre Protein MDH/GOX_1 wurde erzeugt durch Deletion der Aminosäuren 177-215 der Mandelat-Dehydrogenase und durch Insertion der Aminosäuren 176-195 der GOX. Eine zweite Chimäre MDH/GOX_2 wurde konstruiert durch Deletion der Aminosäuren 177-229 der Mandelat-Dehydrogenase und Insertion der Aminosäuren 176-209 der GOX. Laut Literatur war zwar MDH/GOX_2 löslich, zeigte jedoch nur 1% der ursprünglichen LMDH-Aktivität für das Substrat L-Mandelat (Mitra et al., 1993). Es handelte sich dabei um ein unspezifisches und ineffizientes Protein (Xu und Mitra, 1999). MDH/GOX_1 hingegen war ebenfalls löslich, zeigte jedoch verglichen mit der Wildtyp-MDH sehr ähnliche spektroskopische Eigenschaften, Substratspezifität, katalytische Aktivität und kinetische Mechanismen (Xu und Mitra, 1999). Diese Beobachtungen konnten jedoch in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Löslichkeit des Enzyms konnte auch durch die Insertion des korrespondierenden Bereichs der GOX nicht verbessert werden.

6. Diaphorase aus *Clostridium kluyveri*

Im Verlauf des Projektes ERUDESP erwies es sich als nützlich, eine Diaphorase in den Reaktor zu integrieren, um den Elektronentransfer zwischen dem Mediator und dem Cofaktor zu verbessern. Um das Enzym selbst produzieren zu können und somit unabhängig vom Erwerb zu sein, sollte das Diaphorase-Gen aus *C. kluyveri* kloniert und heterolog exprimiert werden. Der Ausdruck Diaphorase fasst eine Klasse flavin-gebundener Enzyme zusammen, die NADH-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen. Als Elektronenakzeptor dient dabei meist ein oxidiertes synthetisches Farbstoff wie Methylenblau oder DCPIP (Argyrou et al., 2003). Diaphorasen sind sehr nützlich in der colorimetrischen NAD(P)H-Bestimmung. Deshalb können die Aktivitäten vieler Dehydrogenasen mit Hilfe verschiedener Farbstoffe, die als Wasserstoff-Akzeptoren von NAD(P)H fungieren, bestimmt werden. Diaphorasen finden außerdem Anwendung in der Histochemie, um die Stickstoffmonoxid-Synthase in

verschiedensten Zelltypen zu detektieren, weshalb sie große Bedeutung als diagnostische Chemikalie gewann. In Cyanobakterien beispielweise ist eine Diaphorase wahrscheinlich am respiratorischen Komplex I beteiligt (Bothe et al., 2010). Viele Diaphorasen sind kommerziell zu erwerben. Da eine Diaphorase den Elektronentransport zwischen dem Mediator und dem Cofaktor verbessern kann, bestand im Rahmen des Projekts ERUDES groß Interesse daran, das Gen der Diaphorase aus *Clostridium kluyveri* heterolog zu exprimieren, um so die Diaphorase selbst produzieren und die relativ teure Beschaffung umgehen zu können. Abbildung IV.5 verdeutlicht die Anwendung der Diaphorase im elektroenzymatischen Reaktor. Die Diaphorase überträgt hier Elektronen zwischen Mediator und dem Cofaktor NAD/NADH+H⁺.

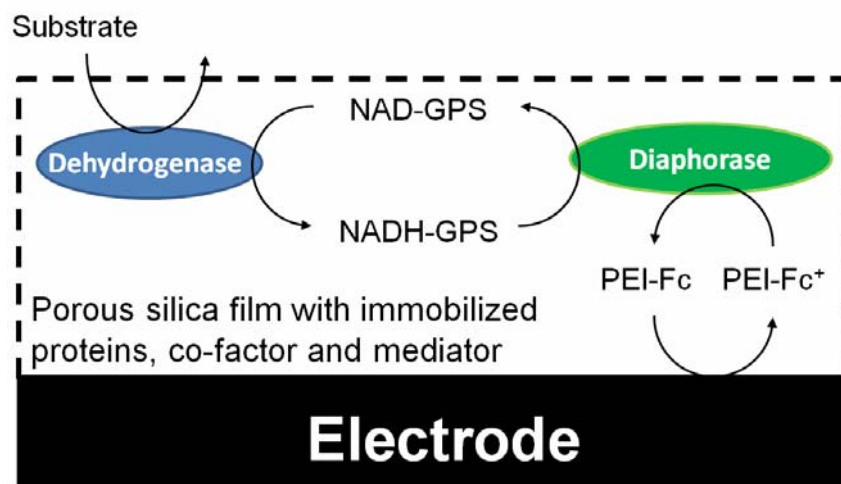


Abbildung VI.5: Modell zur Anwendung der Diaphorase zur Elektronenübertragung zwischen Cofaktor und Mediator im elektroenzymatischen Reaktor. PEI-Fc bzw. PEI-Fc⁺: Polyethylenimin-Ferrocen; GPS: Glycidoxypropyltrimethoxysilane. Auf der Elektrode befindet sich ein poröser Silica-Film mit dem immobilisierten Enzym, dem Cofaktor und dem Mediator.

6.1 Klonierung, heterologe Expression des Diaphorase-Gens und Anreicherung des rekombinanten Enzyms

Da die Sequenz des Diaphorase-Gens aus *Clostridium kluyveri* bekannt war, konnten für die Amplifikation sehr spezifische Primer abgeleitet werden, so dass die PCR eine einzige Bande der erwarteten Größe ergab. Durch die verwendeten Primer (Diaphorase_BamHI_f und Diaphorase_SalI_r) wurden die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Sal*I an das PCR-Produkt angefügt, über die das Diaphorase-Gen in den Expressionsvektor pET-24a(+) inkloniert wurde. Für die heterologe Expression der Diaphorase wurden *E. coli* BL21Gold(DE3)-Zellen verwendet. Dieser Stamm ist ein Derivat des *E. coli* K12-Stammes, welcher im Chromosom integriert eine Kopie des Gens für die T7-RNA-Polymerase unter

der Kontrolle des lacUV5-Promotors enthält, der durch die Zugabe von IPTG induziert werden kann. Im Expressionsvektor wiederum steht das Fremdgen unter der Kontrolle der sehr starken Transkriptions- und Translationssignale des Bakteriophagen T7. Die Expression des Fremdgens wird also induziert, wenn der Kultur IPTG zugesetzt wird und dadurch die T7-RNA-Polymerase von der Wirtszelle zur Verfügung gestellt wird. Das Vorhandensein des korrekten Diaphorase-Inserts wurde durch *Colony*-PCR und durch Sequenzierung des rekombinanten Plasmids bestätigt. Das Diaphorase-Gen ist 690 bp lang, das resultierende Protein besteht aus 230 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von errechneten 25,091 kDa, was im SDS-Gel bestätigt werden konnte. Somit konnten die Literaturergebnisse bestätigt werden (Chakraborty et al., 2008).

Zur vereinfachten Anreicherung wurde das Enzym mit einem N-terminalen bzw. einem C-terminalen His₆-Tag versehen. Für die Amplifikation wurden die Primer Diaphorase_NHis_f und Diaphorase_NHis_r bzw. Diaphorase_CHis_f und Diaphorase_CHis_r verwendet. Als Template diente ein pET-24a(+)-Vektor mit einkloniertem Diaphorase-Gen ohne Tag. Die Amplifikation ergab Banden der erwarteten Größe, die wiederum in den Expressionsvektor pET-24a(+) einkloniert wurden. Auch hier wurden für die Expression *E. coli* BL21Gold(DE3)-Zellen verwendet. Beide Varianten zeigten Enzymaktivität gegenüber NADH + H⁺ und DCPIP, jedoch zeigte die Variante mit C-terminalem His₆-Tag eine dreifach höhere Aktivität, weshalb alle weiteren Experimente mit dieser Variante durchgeführt wurden. Die größte Proteinmenge und damit die höchste Enzymaktivität konnte durch eine Anzucht bei 28°C nach der Induktion erzielt werden. Eine Anzucht bei 37°C nach der Induktion führt oft trotz einer höheren Zelldichte zu einer geringeren Ausbeute an löslichem Protein, da aufgrund des schnelleren Wachstums und der damit verbundenen schnelleren Proteinexpression vermehrt Proteine fehlgefaltet in Form unlöslicher *inclusion bodies* abgelegt werden.

Die Anreicherung der Diaphorase erfolgte durch Affinitätschromatographie an Nickelsepharose. Aus einer 250 ml-Kultur konnten insgesamt etwa 2500 Units gewonnen werden. Die generelle Expression war jedoch eher schwach. Durch Optimierung der Anzucht- und Induktionsbedingungen kann dies sicherlich noch verbessert werden. Die Aktivitätsmessung im Rohextrakt kann allerdings nicht als ein absoluter Wert angesehen werden, da im Rohextrakt noch zahlreiche andere Dehydrogenasen vorhanden sind, die das Substrat NADH verwerten können. Nach der Affinitätschromatographie an Nickelsepharose ist das Protein rein und es kann eine Gesamtaktivität von 1556 Units gemessen werden. Nach der anschließenden Umpufferung in einen stabilisierenden Puffer waren noch insgesamt 507 Units vorhanden. Die spezifische Aktivität konnte im Verlauf der Anreicherung von 19,6 U/mg auf 326,1 U/mg gesteigert werden. Geht man von einer

Aktivität im Rohextrakt von 2500 Units aus, so beträgt die Ausbeute nach zwei Anreicherungsschritten lediglich 21%. Da die Aktivität im Rohextrakt jedoch einen wenig verlässlichen Wert darstellt, sollte eher die Gesamtaktivität nach Affinitätschromatographie an Nickelsepharose als Vergleichswert herangezogen werden. Ausgehend von 1556 Units nach HisTrap, beträgt die Ausbeute nach einem weiteren Anreicherungsschritt also etwa 33%. Die Ausbeute kann sicherlich durch eine Optimierung des Anreicherungsverfahrens noch verbessert werden. Aufgrund der relativ geringen Menge an löslichem, rekombinantem, his-getagtem Protein kann jedoch eine überladene Säule als Grund für die geringe Ausbeute ausgeschlossen werden.

6.2 Biochemische Charakterisierung der Diaphorase

In der Literatur wird die Diaphorase als trimeres Protein beschrieben (Chakraborty et al., 2008). Die Lösung des angereicherten Enzyms ist gelb, weshalb geschlossen werden kann, dass das Enzym ein Flavin-Molekül als prosthetische Gruppe enthält. Das UV-Spektrum der Enzymlösung zeigt Maxima bei 283 nm, 384 nm und bei 457 nm, was für flavin-gebundene Enzyme charakteristisch ist (Chakraborty et al., 2008). Eine Dünnschichtchromatographie identifizierte FMN (nicht FAD) als prosthetische Gruppe, wobei ein Diaphorase-Molekül ein FMN enthält (Chakraborty et al., 2008), was auch für das native Enzym, das aus *C. kluyveri* angereichert wurde, gilt (Kaplan et al., 1969).

Ein genauerer Blick auf die Aminosäuresequenz zeigte die Rubredoxin-ähnliche Domäne, die das Eisen-Atom enthält. Durch IPC Atom-Emissions-Spektroskopie konnte die Menge an Eisen zu 1,1 Moleküle pro Diaphorase-Molekül bestimmt werden (Chakraborty et al., 2008).

Der K_m -Wert für NADH liegt laut Literatur bei 0,15 mM. Der K_m -Wert der nativen Diaphorase aus *C. kluyveri* lag bei 0,09 mM (Kaplan et al., 1969). Während dieser Arbeit konnte ein K_m -Wert für NADH von 0,07 mM bestimmt werden. Der neu bestimmte K_m -Wert ist also mit den beiden Literaturwerten vergleichbar. Das Temperaturoptimum der Diaphorase liegt bei 40°C, der optimale pH-Wert liegt bei 8,0 (Chakraborty et al., 2008).

Eine isoelektrische Fokussierung zeigte verschiedene Banden, die jedoch alle in einem pH-Bereich zwischen 4,9 und 5,4 lagen. Mit Hilfe des Programms VectorNTI (Invitrogen) konnte der pI der Diaphorase bestimmt werden. Er liegt für das ungetaggte Protein bei 7,76. Der durch den „EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service“ bestimmte pI der ungetaggtten Diaphorase liegt bei 7,81. Sechs basische Histidine verschieben den pI weiter in Richtung des basischen pH-Werts. Der mittels isoelektrischer Fokussierung ermittelte pI liegt jedoch zwischen 4,9 und 5,4. Das Enzym erschien in der SDS-PAGE rein, so dass es sich bei dem

Protein in der IEF mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um Fremdproteine handelt. Eine mögliche Erklärung für den großen Unterschied zwischen ermitteltem und errechneten pI ist das Vorkommen von Salzen in der Proteinlösung. Die Proteinlösung wurde zwar über mehrere Zentrifugationsschritte mit Hilfe von Vivaspin-Säulen (Sartorius) entsalzt, jedoch besteht die Möglichkeit, dass immer noch Salze in der Proteinlösung vorhanden waren. Diese verfälschen das Ergebnis der IEF. Aufgrund fehlender Literaturwerte konnten für die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der Diaphorase keine Vergleichswerte herangezogen werden.

V. Zusammenfassung

Da die LSDH-Aktivität der 1993 isolierten *Stenotrophomonas*-Spezies im Zuge der Archivierung verloren ging, wurden erneut Bodenbakterien auf LSDH-Aktivität gescreent. Ein neu isolierter Bodenorganismus (K5) zeigte ebenfalls LSDH-Aktivität. Aufgrund zu geringer Aktivität der K5-LSDH wurde ein weiteres Enzym mit LSDH-Aktivität gesucht. Der N-Terminus des *Stenotrophomonas*-Enzyms wies hohe Übereinstimmung zur Ribitol-2-DH aus *B. japonicum* USDA110 auf. Das entsprechende Gen wurde in einen Expressionsvektor kloniert und heterolog exprimiert. Das resultierende Protein besteht aus 243 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 26 kDa je Untereinheit. Die spezifischen Aktivitäten des reinen Enzyms für L- und D-Sorbitol sind 0,1 U/mg bzw. 115 U/mg. Die K_m -Werte für L- und D-Sorbitol liegen bei 13,6 mM bzw. 12,7 mM. Biochemische Daten identifizieren das Enzym als Trimer. Bei einem Umsatz mit dem Substrat L-Sorbitol entsteht der seltene Zucker D-Sorbose. Das Temperaturoptimum der LSDH liegt bei etwa 55°C. Als stabilisierende Aminosäuren konnten C68 und M228 identifiziert werden.

Die Stabilität der GatDH konnte durch rationales Design und durch das Einführen neuer Disulfid-Brücken am Dimer-Dimer-Interface leicht gesteigert werden. Verbesserte Varianten sind A57E, A58R und Q168M.

Weitere Modellenzyme für das Projekt ERUDESP, die in dieser Arbeit heterolog exprimiert und charakterisiert wurden waren die DMDH aus *L. lactis*, die LMDH aus *P. putida* und die Diaphorase aus *C. kluyveri*.

VI. Summary

As the *Stenotrophomonas*-species isolated in 1993 lost LSDH-activity in the course of archiving, a new soil bacterium with LSDH-activity had to be found. The newly isolated organism K5 showed LSDH-activity, but this was very low. The N-Terminus of the 1993 isolated *Stenotrophomonas*-enzyme revealed high homology to a ribitol-2-dehydrogenase from *B. japonicum* USDA110. The corresponding gene was cloned to an expression vector and heterologously expressed. The resulting protein consists of 243 amino acids and has a molecular weight of 26 kDa per subunit. The specific activities for L- and D-sorbitol are 0,1 U/mg and 115 U/mg, respectively. K_m -values for L- and D-sorbitol are 9,2 and 12,7 mM, respectively. Biochemical data identify the enzyme as a trimer. A bioconversion with the substrate L-sorbitol yielded D-sorbose. The temperature-optimum of LSDH is at 55°C. Amino acids responsible for high temperature stability are C68 and M228.

The stability of GatDH could be increased through rational design and the construction of new disulfide bonds at the dimer-dimer-interface. Improved variants are A57E, A58R and Q168M.

Further model-enzymes for the project ERUDES, that were heterologously expressed during this work and characterised were DMDH from *L. lactis*, LMDH from *P. putida* and Diaphorase from *C. kluyveri*.

VII. Anhang

1. Vektorkarten

1.1 E. coli-Expressionsvektor pET-24a(+)

pET-24a(+) sequence landmarks

T7 promoter	311-327
T7 transcription start	310
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	714-1793
pBR322 origin	3227
Kan coding sequence	3936-4748
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(+).

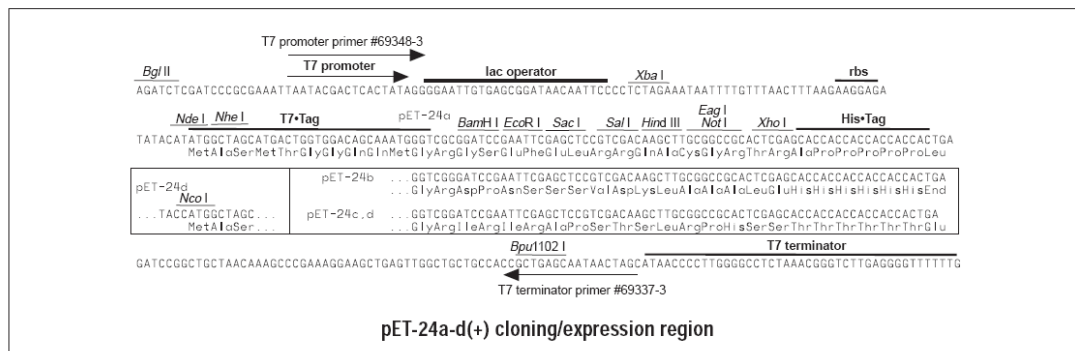
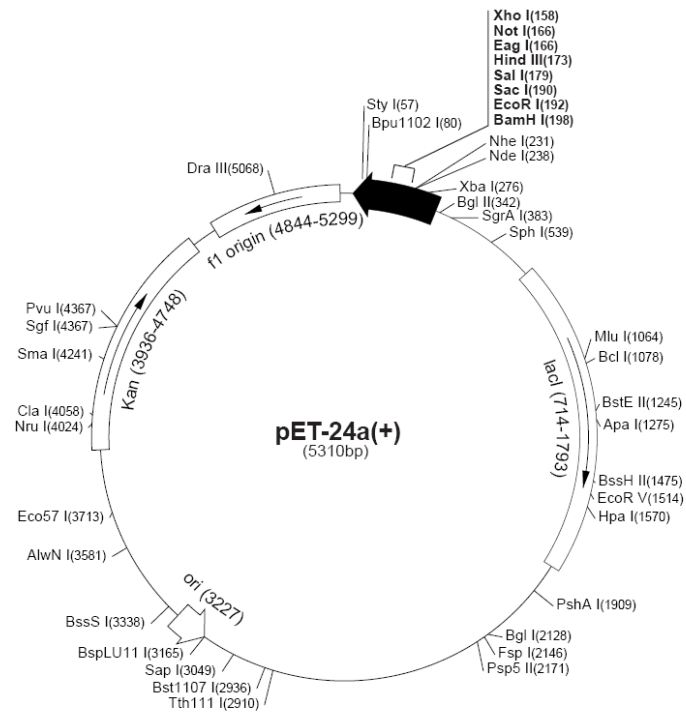
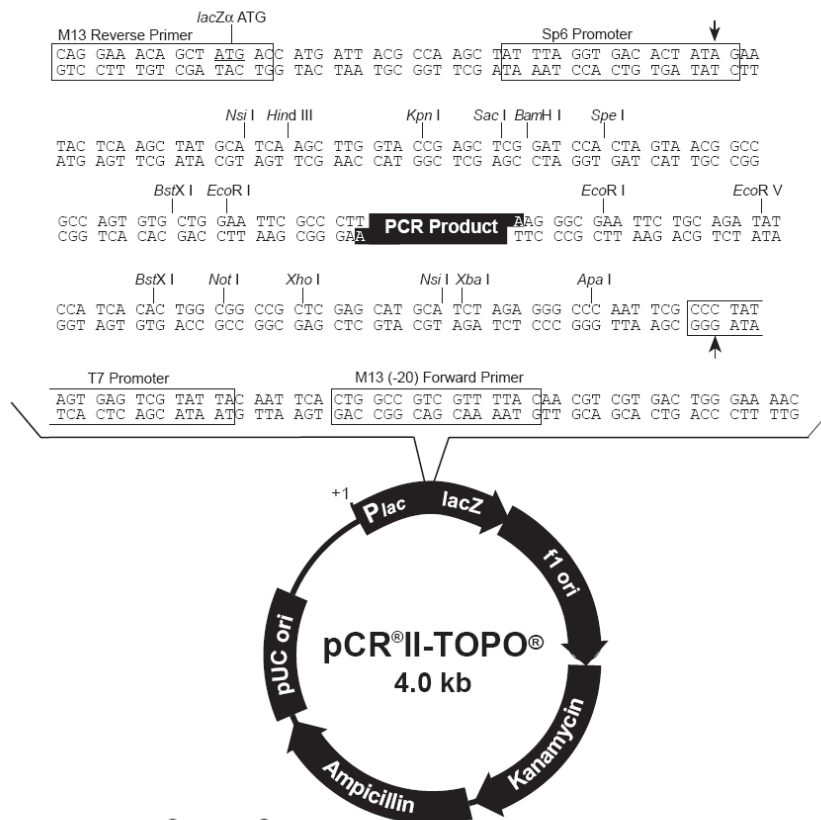


Abbildung VII.1: Vektorkarte des E. coli-Expressionsvektors pET-24a(+). (Novagen).

1.2 Klonierungsvektor pCR[®]II-TOPO[®]



Comments for pCR[®]II-TOPO[®] 3973 nucleotides

LacZα gene: bases 1-589
M13 Reverse priming site: bases 205-221
Sp6 promoter: bases 239-256
Multiple Cloning Site: bases 269-383
T7 promoter: bases 406-425
M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
f1 origin: bases 590-1027
Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
pUC origin: bases 3178-3851

Abbildung VII.2: Klonierungsvektor pCR[®]II-TOPO[®] (Invitrogen).

2. Protein- und DNA-Standards

2.1 Protein-Standards

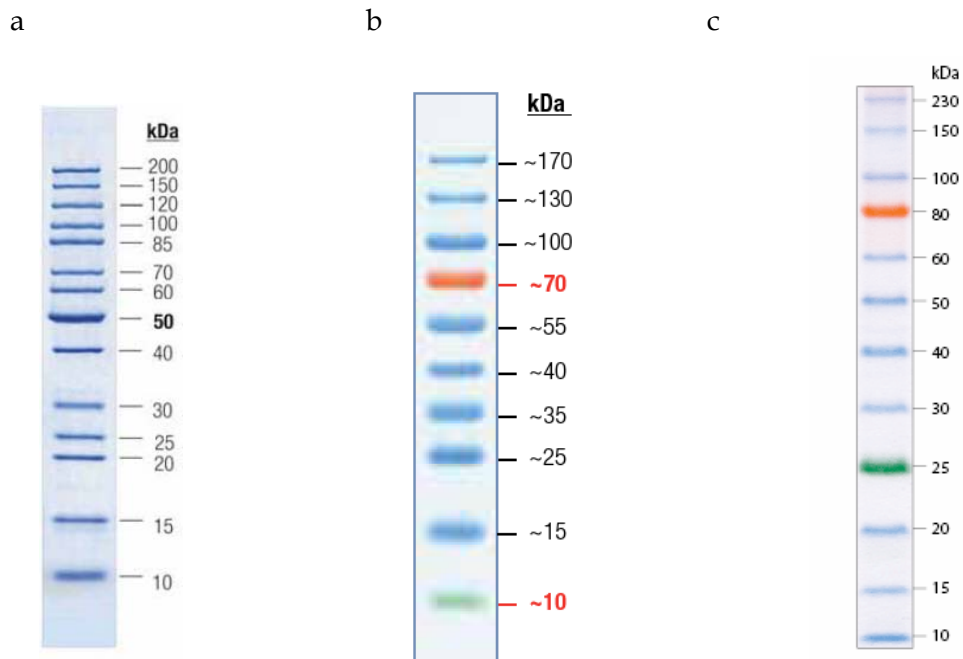


Abbildung VII.3: a) Proteinmarker *Page Ruler Unstained Protein Ladder*, Fermentas; b) Proteinmarker *Page Ruler Prestained Protein Ladder*, Fermentas; c) *ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa)*, New England Biolabs.

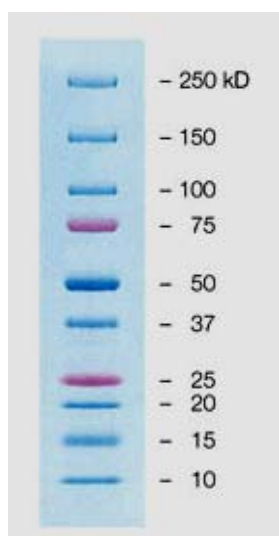


Abbildung VII.4: Proteinmarker *Precision Plus Protein Dual Color Standard*, BioRad.

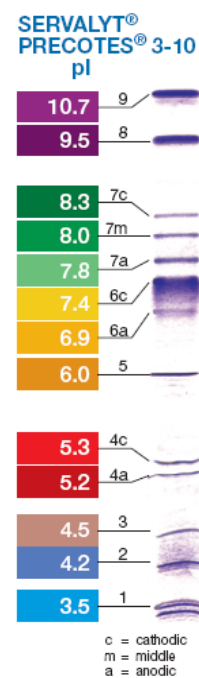


Abbildung VII.5: IEF-Marker *IEF Markers 3-10, SERVA Liquid Mix* (Serva).

2.2 DNA-Standards

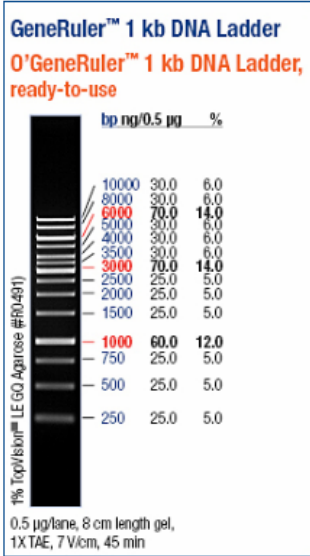


Abbildung VII.6: DNA-Leiter Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas.

3. Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström	DMDH	D-Mandelat-Dehydrogenase aus <i>L. lactis</i>
AcCN	Acetonitril	DMF	Dimethylformamid
Amp	Ampicillin	DMSO	Dimethylsulfoxid
APS	Ammoniumpersulfat	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AS	Aminosäure	DNase	Desoxyribonuclease
ASF	Ammoniumsulfatfällung	DSDH	D-Sorbitol-Dehydrogenase
BCA	Bicinchinonsäure	DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
BisTris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris(hydroxymethyl)-methan		
bp	Basenpaare	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Rinderserumalbumin)	EDTA	Ethylendiamintetracetat
bzgl.	bezüglich	ε	molarer Extinktionskoeffizient
bzw.	beziehungsweise	EtOH	Ethanol
°C	Grad Celsius	f	<i>forward</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat	FF	<i>Fast Flow</i>
cm	Zentimeter	FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
Cm	Chloramphenicol	GatDH	Galaktitol-Dehydrogenase
C-Quelle	Kohlenstoffquelle	GPS	Glycidoxypropyltrimethoxysilan
C-Terminus	Carboxylterminus	x g	x-fache Erdbeschleunigung
CV	<i>column volume</i> (Säulenvolumen)	h	Stunde
Da	Dalton	HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
Dia	Diaphorase	HisTrap	Affinitätschromatographie an Nickelsepharose
dNTPs	Desoxyribonucleotid-triphosphat	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	IEF	Isoelektrische Fokussierung
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	IPTG	Isopropylthiogalactosid
dTTP	Desoxythymidin-triphosphat	Kan	Kanamycin
ddATP	Didesoxyadenosin-triphosphat	kb	Kilobasen
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat	kbp	Kilobasenpaare
ddGTP	Didesoxyguanosin-triphosphat	kDa	Kilodalton
ddTTP	Didesoxythymidin-triphosphat	KM	Komplexmedium
ΔE	Extinktionsänderung	λ	Wellenlänge
d	Tag	LB	Luria-Bertani
deion.	deionisiert	LMDH	L-Mandelat-Dehydrogenase aus <i>P. putida</i>
DH	Dehydrogenase		

LSDH	L-Sorbitol-Dehydrogenase	r	<i>reverse</i>
M	molar	RDH	Ribitol-Dehydrogenase
mA	Milliampere	rDNA	ribosomale DNA
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption ionisation</i>	rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
mAU	Milli-Absorption-Units	RT	Raumtemperatur
MDH	Mandelat-Dehydrogenase	S	Svedberg bzw. Siemens
MeOH	Methanol	SAM	<i>self assembled monolayer</i>
μF	Mikrofarad (Einheit der elektrischen Kapazität)	SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
mg	Milligramm	SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-gelelektrophorese
μg	Mikrogramm	TEOS	Tetraethylorthosilicat
min	Minute	TBE	Tris-Borat-EDTA
ml	Milliliter	TCA	Trichloressigsäure
μl	Mikroliter	TE	Tris-EDTA
mm	Millimeter	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
M _r	relative Molekularmasse	TFA	Trifluoressigsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>	T _m	Schmelztemperatur
μS	Mikrosiemens	TOF	<i>time of flight</i>
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
MW	Molekulargewicht	U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
NAD(P)	Nicotinamidadenin-dinukleotid(phosphat), oxidierte Form	ü.N.	über Nacht
NAD(P)H	Nicotinamidadenin-dinukleotid(phosphat), reduzierte Form	UV	Ultraviolett
n.b.	nicht bestimmt	V	Volumen bzw. Volt
nm	Nanometer	v/v	Volumen pro Volumen
N-Terminus	Amino-Terminus	Vis	<i>visible</i> (UV/Vis-Spektren)
OD	optische Dichte	w/v	Gewicht pro Volumen
Ω	Ohm (Einheit des elektrischen Widerstands)	X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
ORF	<i>open reading frame</i>		
PCR	Polymerasekettenreaktion		
PEI	Polyethylenimin		
pH	pH-Wert		
pI	isoelektrischer Punkt		

4. Literaturverzeichnis

Alberts, B. (2005). Lehrbuch der molekularen Zellbiologie, 3. Auflage, Wiley-VCH.

Abokitse, K. und 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.

Agashe, V. und Hartl, F. (2000). Roles of molecular chaperones in cytoplasmatic protein folding. *Cell and Development Bio.*, 11:15-25.

Alías, M., Ayuso-Tejedor, S., Fernández-Recio, J., Cativiela, C., Sancho, J. (2009). Helix propensities of conformationally restricted amino acids. Non-natural substitutes for helix breaking proline and helix forming alanine. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 8:788-792.

Allen, E.K. und Allen, O.N. (1950). Biochemical and symbiotic properties of the rhizobia. *Bacteriol. Rev.*, 14(4)_273-330.

Alper, J. (2001). Searching for medicine's sweet spot. *Science* 291(5512):2338-43.

Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59: 143-169.

Antiochia, R., Lavagnini, I., Magno, F. (2001). A general method for the electrochemical evaluation of the bimolecular rate constant in enzyme catalyzed reaction kinetics. *Electroanal.*, 13:601-602.

Argyrou, A., Sun, G., Palfey, B.A., Blanchard, J.S. (2003). Catalysis of diaphorase reactions by *Mycobacterium tuberculosis* lipoamide dehydrogenase occurs at the EH4 level. *Biochemistry*, 42:2218-2228.

Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K., Gershenson, A. (2001). How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem. Sci.*, 26(2):100-106.

Arnott, M.A., Michael, R.A., Thompson, C.R., Hough, D.W., Danson, M.J. (2000). Thermostability and thermoactivity of citrate synthases from the thermophilic and hyperthermophilic archaea, *Thermoplasma acidophilum* and *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.*, 304:657-668.

Asano T., Ishihara K., Morota T., Takeda S., Aburada M. (2003). Permeability of the flavonoids liquiritigenin and its glycosides in licorice roots and davidigenin, a hydrogenated metabolite of liquiritigenin, using human intestinal cell line Caco-2. *J. Ethnopharmacol.* 89(2-3):285-9.

Baneyx, D.K. und Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *E. coli*. *Review. Nat. Biotechnol.*, 22(11):1399-1408.

Barber, R.D. und Donohue, T.J. (1998). Function of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides*, formaldehyde oxidation and assimilation. *Biochem.*, 37:530-537.

- Barker H.A. (1956).** Bacterial Fermentations. Wiley, New York, pp 28-56.
- Barker, H.A. und Taha, S.M. (1942).** *Clostridium kluyveri*, an organism concerned in the formation of caproic acid from ethyl alcohol. *J. Bacteriol.*, 43:347-363.
- Barral, J., Broadley, S., Schaffar, G., Hartl, F. (2004).** Roles of molecular chaperones on protein misfolding diseases. *Cell and Development Bio.*, 15:17-29.
- Bastian S., Rekowski M.J., Witte K., Heckmann-Phl D.M., Giffhorn F. (2005).** Engineering of pyranose-2-oxidase from *Peniophora gigantea* towards improved thermostability and catalytic efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67(5):654-63.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. (2001).** Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy Journal*, 11:259-274.
- Bergel, A. und DevauxBasseguy, R. (1996).** First attempts in bioelectrochemical engineering. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 93:735-762.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6):1513-1523.
- Bjørk, A., Dalhus, B., Mantzilas, D., Eijsink, V.G.H., Sirevag, R. (2003).** Stabilization of a tetrameric malate dehydrogenase by introduction of a disulfide bridge at the dimer-dimer interface. *J. Mol. Biol.*, 334:811-821.
- Bock, K., Pedersen, C., Defaye, J., Gadelle, A. (1991).** Steric and electronic effects in the formation of dihexulose dianhydrides. Reaction of racemic sorbose in anhydrous hydrogen fluoride and a facile synthesis of D-sorbose. *Carbohydr. Res.*, 216:141-148.
- Bogin, O., Levin, I., Hacham, Y., Tel-Or, S., Peretz, M., Frolow, F., Burstein, Y. (2002).** Structural basis for the enhanced thermal stability of alcohol dehydrogenase mutants from the mesophilic bacterium *Clostridium beijerickii*: contribution of salt bridging. *Protein Sci.*, 11: 2561-2574.
- Bornstein, B.T. und Barker, H.A. (1948).** The nutrition of *Clostridium kluyveri*. *J. Bacteriol.*, 55:223-230.
- Bothe, H., Schmitz, O., Yates, M.G., Newton, W.E. (2010).** Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in Cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4):529-551.
- Brechtel, E., Huwig, A., Giffhorn, F. (2002).** L-Glucitol catabolism in *Stenotrophomonas maltophilia* Ac. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:582-587.
- Brill, W.J. (1975).** Regulation and genetics of bacterial nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.*, 29:109-129.
- Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G., Sahl, H.-G. (1998).** Role of lipid-bound peptidoglykan in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology*, 30(2):317-327.
- Brown, C.M. und Dillworth, M.J. (1975).** Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. *J. Gen. Microbiol.*, 86:39-48.

- Bunting, K.A., Cooper, J.B., Tickle, I.J., Young, D.B. (2002).** Engineering of an intersubunit disulfide bridge in the iron-superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch., Biochem. Biophys.*, 397:69-76.
- Burkardt, B., Schillik, D., Puhler, A. (1987).** Physical characterization of *Rhizobium meliloti* megaplasmids. *Plasmid*, 17:13-25.
- Burnell, J.N. und Holmes, R.S. (1983).** Purification and properties of sorbitol-dehydrogenase from mouse liver. *Int. J. Biochem.*, 15:507-511.
- Burnett, J.N. und Underwood, A.L. (1965).** Electrochemical reduction of diphosphopyridine dinucleotide. *Biotechnol. Tech.*, 10:371-374.
- Button, D.K. (1978).** On the theory of control of microbial growth kinetics by limiting nutrient concentrations. *Deep Sea Res.*, 25(12):1163-1177.
- Campbell, G.R., Reuhs, B.L., Walker, G.C. (2002).** Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:3938-3943.
- Carius, Y., Christian, H., Faust, A., Zander U., Klink, B.U., Kornberger, P., Kohring, G.W., Giffhorn F., Scheidig, A.J. (2010).** Structural insight into substrate differentiation of the sugar-metabolizing enzyme galactitol-dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D. *J. Biol. Chem.*, 285(26):200006-200014.
- Casalta, E. und Montel, M.-C. (2008).** Safety assessment of diary microorganisms: the *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126:271-273.
- Cerny, G. (1978).** Studies on the aminopeptidase-test for the distinction of the gram-negative from gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5:113-122.
- Chakraborty, S., Sakka, M., Kimura, T., Sakka, K. (2008).** Cloning and expression of a *Clostridium kluyveri* gene responsible for diaphorase activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(3):735-741.
- Chambellon, E., Rijnen, L., Lorquet, F., Gitton, C., van Hylckama, J.E.T., Wouters, J.A., Yvon, M. (2009).** The D-2-hydroxyacid-dehydrogenase incorrectly annotated PanE is the sole reduction system for branched-chain 2-keto acids in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 191(3):873-881.
- Chang, J.Y. (1985).** Thrombin specificity: requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrates. *Eur. J. Biochem.*, 151:217-224.
- Chase, T., Jr. (1986).** Mannitol-1-phosphate dehydrogenases of *Escherichia coli*. Chemical properties and binding of substrates. *Biochem. J.*, 239:435-443.
- Chaudhuri, T., Farr, G., Fenton, W., Rospert, S., Horwich, A. (2001).** GroEL/GroES-mediated folding of a protein too large to be encapsulated. *Cell*, 107:235-246.
- Cheetham, P.S.J. (1987).** Screening for novel biocatalysts. *Enzyme Microb. Technol.*, 9:194-213.

- Chenault H.K. und Whitesides G.M. (1987).** Regeneration of nicotinamide cofactors for use in organic synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 14:147-197.
- Cherry, J.R. und Fidantsef, A.L. (2003).** Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(4):438-43.
- Chica, R.A., Doucet, N., Pelletier, J.N. (2005).** Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16(4):378-84.
- Chin-Joe, I., Haberland, J., Straathof, A.J.J., Jonejan, J.A., Liese, A., 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.
- Choudhary M., MacKenzie, C., Nereng, K., Sodergren, E., Weinstock, G.M. und Kaplan S. (1997).** Low-resolution sequencing of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1: chromosome II is a true chromosome. *Microbiol.*, 143:3085-3099.
- Ciampi, M.S., Schmid, M.B., Roth, J.R. (1982).** Transposon TN10 provides a promoter for transcription of adjacent sequences. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:5016-5020.
- Clantin, B., Tricot, C., Lonhienne, T., Stalon, V., Villeret, V. (2001).** Probing the role of oligomerization in the high thermal stability of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase by site-specific mutants. *Eur. J. Biochem.*, 268:3937-3942.
- Colombo, G. und Merz, K.M. (1999).** Stability and activity of mesophilic subtilisin E and its thermophilic homolog: insights from molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, 121:6895-6903.
- Conway T. und Ingram L.O. (1989).** Similarity of *Escherichia coli* propandiole oxidoreductase (fucO product) and an unusual alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 171:3754-3759.
- Dambe T.R., Kühn A.M., Brossette T., Giffhorn F., Scheidig A.J. (2006).** Crystal structure of NADP(H)-dependant 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.
- Delves-Broughton, J., Blacknum, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. (1996).** Applications of the bacteriocin nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69:193-202.
- DevauxBasseguy, R., Gros, P., Bergel, A. (1997).** Electroenzymatic process: a clean technology alternative for highly selective synthesis?, *J. Chem. Technol., Biotechnol.*, 68:389-396.
- Dhawale, M.R., Szarek, W.A., Hay, G.W., Kropinski, A.M.B. (1986).** Preparation of L-fructose and D-sorbose by the bacterial oxidation of L-mannitol and L-glucitol, respectively. *Carbohydr. Res.*, 155:262-265.
- Di Cera, E., De Cristofano, R., Albright, D.J., Fenton, J.W. 2nd (1991).** Linkage between proton binding and amidase activity in human alpha-thrombin: effect of ions and temperature. *Biochemistry*, 30(32):7913-7924.

Diêp Lê, K.H. und Lederer, F. (1991). Amino acid sequence of long chain alpha-hydroxy acid oxidase from rat kidney, a member of the family of FMN-dependent alpha-hydroxy acid-oxidizing enzymes. *J. Biol. Chem.*, 266(31):20877-81.

Dieuleveux V. und Gueguen, M. (1998). Antimicrobial Effects of D-3-Phenyllactic Acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE Medium, Milk, and Cheese. *Journal of Food Protection*, 61(10):1281-1285(5).

Dong, J.M., Taylor, J.S., Latour, D.J., Iuchi, S., Lin, E.C.C. (1993). Three overlapping *lct* genes involved in L-lactate utilization by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 175(20):6671-6678.

Doten, R.C. und Mortlock, R.P. (1985)[1]. Inducible xylitol dehydrogenases in enteric bacteria. *J. Bacteriol.*, 162:845-848.

Doten, R.C. und Mortlock, R.P. (1985)[2]. Production of D- and L-xylulose by mutants of *Klebsiella pneumoniae* and *Erwinia uredovora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:158-162.

Drakesmith, F.G. und Gibson, A. (1988). A combined electrochemical process for the regeneration of coenzymes. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1493-1494.

Drueckhammer D.G., Hennen W.J., Pederson R.L., Barbas C.F., Gautheron C.M., Krach T., Wong C.H. (1991). Enzyme catalysis in synthetic carbohydrate chemistry. *Synthesis* 7, 499-525.

Duetz, W.A., van Beilen, J.B., Witholt, B. (2001). Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:419-425.

Dykhuisen, D.E. und Hartl, D.L. (1983). Selection in chemostats. *Microbiol. Rev.*, 47:150-168.

Edwards, V.H. (1970). The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 7:679-712.

El Hawrani, A.S., Sessions, R.B., Moreton, K.M., Holbrook, J.J. (1996). Guided evolution of enzymes with new substrate specificities. *J. Mol. Biol.*, 264:97-110.

Ellis, R.J. (1987). Proteins as molecular chaperones. *Nature*, 328:378-379.

Ellis, R. und Hart, F. (2000). Folding and binding: problems with proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10:13-15.

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

Entner, N. und Doudoroff, M. (1952). Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *The Journal of Biological Chemistry*, 196:853-862.

Fassoune, A., Laval, J.M., Moiroux, C.B., Bourdillon, C. (1990). Electrochemical regeneration of NAD in a plug-flow reactor. *Biotech. Bioeng.*, 35:935-939.

- Ferbitz, L., Maier, T., Patzelt, H., Bukau, B., Deuerling, E. (2004).** Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins. *Nature*, 431:590-596.
- Fewson, C.A. (1988).** Microbial metabolism of mandelate: a microcosm of diversity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 4(2):85-110.
- Fibla, J. und Gonzalez-Duarte, R. (1993).** Colorimetric assay to determine alcohol dehydrogenase activity. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 26:87-93.
- Findrik, Z., Vasic-Racki, D., Lütz, S., Daußmann, T., Wandrey, C. (2005).** Kinetic modelling of acetophenone reduction catalyzed by alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter* sp.. *Biotechnol. Lett.*, 27:1087-1095.
- Flores, H. und Ellington, A.D. (2002).** Increasing the thermal stability of an oligomeric protein, betaglucuronidase. *J. Mol. Biol.*, 315:325-337.
- Fry, A.J., Sobolov, S.B., Leonida, M.D., 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.
- Fuchs, G. (2007).** Allgemeine Mikrobiologie, 8. Auflage. *Thieme Verlag*, Stuttgart.
- Gajdzik, J. (2007).** Immobilisierung von Redoxenzymen auf nano- und polykristallinen Metalloberflächen. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- 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.
- Ganström, T.B., Takata, G., Tokuda, M., Izumori, K. (2004).** Izumoring: a novel and complete strategy for bioproduction of rare sugars. *J. Biosci. Bioeng.*, 97(2):89-94.
- Gavrilescu M. und Chisti Y. (2005).** Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.*, 23:471-499.
- Gershenson, A., Schauerte, J.A., Giver, L., Arnold, F.H. (2000).** Tryptophan phosphorescence study of enzyme flexibility and unfolding in laboratory-evolved thermostable esterases. *Biochemistry*, 39:4658-4665.
- Giegel, D.A., Williams, C.H., Massey, V. (1990).** L-lactate-2-monooxygenase from *Mycobacterium smegmatis*. Cloning, nucleotide sequence, and primary structure homology within an enzyme family. *J. Biol. Chem.*, 265(12):6626-6632.
- Gokhale, R.S., Agarwalla, S., Francis, V.S., Santi, D.V., Balaram, P. (1994).** Thermal stabilization of thymidylate synthase by engineering two disulfide bridges across the dimer interface. *J. Mol. Biol.*, 235:89-94.
- Gorton, L. (2002).** Electrochemistry of NAD(P)⁺/NAD(P)H. In: *Bard, A.J., Stratmann, M., eds. Encyclopedia of Electrochemistry*, Wiley-VCH (Weinheim), pages 67-143.
- Gorton, L. und Dominguez, E. (2002).** Electrocatalytic oxidation of NAD(P)H at mediator-modified electrodes. *Rev. Mol. Biotechnol.*, 82:371-392.

- Gregersen, T. (1987).** Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 5:123-127.
- Güssow, D. und Clackson, T. (1989).** Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 17(10):4000.
- Guiard, B. (1985).** Structure, expression and regulation of a nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L(+)-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b2). *EMBO J.*, 4(12):3265-3272.
- Haberecht, M.F., Schmidt, H.H., Mills, S.L., Massey, S.C., Nakane, M., Redburn-Johnson, D.A. (1998).** Localization of nitric oxide synthase, NADPH diaphorase and soluble guanylyl cyclase in adult rabbit retina. *Visual Neurosci.*, 15:881-890.
- Haberland J., Hummel, W., Daußmann, T. und Liese, A. (2002).** New continuous production process for enantiopure (2R, 5R)-hexanediol. *Org. Process. Res. Dev.*, 6:458-462.
- Hall, B.G. (1981).** Changes in the substrate specificities of an enzyme during directed evolution of new functions. *Biochemistry*, 20(14):4042-4049.
- Hall, B.G., Yokoyama, S., Calhoun, D.H. (1983).** Role of cryptic genes in microbial evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 1(1):109-124.
- Hall, B.G. (1988).** Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations. I. Mutations involving an insertion sequence. *Genetics*, 120(4):887-897.
- Hall, B.G. (1989).** Selection, adaptation, and bacterial operons. *Genome*, 31(1):265-271.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166:557-580.
- Hartl, F. (1996).** Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381:571-579.
- Hartl, F. und Hayer-Hartl, M. (2002).** Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295:1852-1858.
- Hartree, E.F. (1972).** Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48:422-427.
- Hausmann, S.Z. und London, J. (1987).** Purification and characterization of ribitol-5-phosphate and xylitol-5-phosphate dehydrogenase from strains of *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.*, 169:1651-1655.
- Hegemann, G.D. und Rosenberg, S.L. (1970).** The evolution of bacterial enzyme systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, 24:429-462.
- Heller, A. (2006).** Potentially implantable miniature batteries. *Anal. Bioanal. Chem.*, 385:469-473.
- Henne, A., Schmitz, R.A., Bomeke, M., Gottschalk, G., Daniel, R. (2000).** Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:3113-3116.

- Hochuli, E., Döbeli, H., Schacher, A. (1987).** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *Journal of Chromatography*, 411:177-184.
- Hofer, R. (1969).** Synthese der D-Sorbose und Aminozuckerderivate. Teilauszug Dissertation, TH Zürich.
- Hollmann, F. und Schmid, A. (2004).** Electrochemical regeneration of oxidoreductases for cell-free biocatalytic redox reactions. *Biocatal. Biotransform.*, 22:63-88.
- Hon, W.M., Chhatawal, V.J.S., Khoo, H.E., Moochhala, S.M. (1997).** Histochemical method for detecting nitric oxide synthase activity in cell cultures. *Biotech. Histochem.*, 78:29-32.
- Horwitz, S. und Kaplan, N. (1964).** Hexitol dehydrogenases of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.*, 239:830-838.
- Hummel, W. (1997).** New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 58:145-184.
- Hummel, W. (1999).** Large-scale applications of NAD(P)-dependant oxidoreductases: recent developments. *Trends Biotechnol.*, 17:487-492.
- Hummel, W., Schütte, H., Kula, M.R. (1988).** D-(-)-mandelic acid dehydrogenase from *Lactobacillus curvatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28(4-5):433-439.
- Huwig, A., Emmel, S., Giffhorn, F. (1996).** Preparation of D-sorbose from L-glucitol by bioconversion with *Pseudomonas* sp. *Ac. Carbohydr. Res.*, 281(1):183-186.
- Huwig, A., Emmel, S., Jäkel, G., Giffhorn, F. (1998).** Enzymatic synthesis of L-tagatose from galactitol with galactitol-dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D. *Carbohydrate Research*, 305:337-339.
- Hynes, M.F., Simon, R., Müller, P., Niehaus, K., Labes, M., Pühler, A. (1986).** The two megaplasmids of *Rhizobium meliloti* are involved in the effective nodulation of alfalfa. *Mol. Gen. Genet.*, 202:356-362.
- Imhoff, J.F., Trüper, H.G. und Pfennig, N. (1984).** Rearrangements of the species and genera of the phototrophic purple nonsulfur bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34:340-343.
- Ishida, Y., Kamiya, T., Itoh, H., Kimura Y., Izumori, K. (1997).** Cloning and characterization of the D-tagatose-3-epimerase gene from *Pseudomonas cichorii* St-24. *J. Ferment. Bioeng.*, 83(6):529-534.
- Itoh, H. und Izumori, K. (1996).** Enzymatic production of L-tagatose and L-fructose from L-sorbose and L-psicose, respectively. *J. Ferment. Bioeng.*, 81:351-353.
- Itoh, H., Okaya, H., Khan, A.R., Tajima, S., Hayakawa, S., Izumori, K. (1994).** Purification and characterization of D-tagatose-3-epimerase from *Pseudomonas* sp. ST-24. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58:2168-2171.
- Itoh, H., Sato, T., Takeuchi, K. (1995)[1].** Preparation of D-psicose from D-fructose by immobilized D-tagatose-3-epimerase. *J. Ferment. Bioeng.*, 80:101-103.

- Itoh, H., Sato, T., Takeuchi, T., Anisur, R.K., Izumori, K. (1995)[2].** Preparation of D-sorbose from D-tagatose by immobilized D-tagatose-3-epimerase. *J. Ferment. Bioeng.*, 79:184-185.
- Izumori, K., Miyoshi, T., Tokuda, S., Yamabe, K. (1984).** Production of D-tagatose from dulcitol by *Arthrobacter globiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(5):1055-1057.
- Izumori, K. (2002).** Bioproduction strategies for rare hexose sugars. *Naturwissenschaften*, 89:120-124.
- Izumori, K. (2006).** Izumoring: a strategy for bioproduction of all hexoses. *J. Biotechnol.*, 124:717-722.
- Jaegfeldt, H. (1981).** A study of the products formed in the electrochemical reduction of nicotinamide-adenine-dinucleotide. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 8:355-370.
- Jaeger, K.E. und Eggert, T. (2002).** Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13(4):390-397.
- Jaeger K.E. und Reetz M.T. (2000).** Directed evolution of enantioselective enzymes for organic chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4(1):68-73.
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T., Dijkstra, B.W. (2002).** Directed evolution to produce enantioselective biocatalysts. *ASM News*, 68(11):556-562.
- Jaenicke, R. und Bohm G. (1998).** The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8:738-748.
- Jäkel G. (1994).** Isolierung und Charakterisierung einer durch Enzymevolution entstandenen Galaktitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* D. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.
- Jannasch, H.W. (1967).** Growth of marine bacteria at limiting concentrations of organic carbon in seawater. *Limnol. Oceanogr.*, 12(2):264-271.
- Jeziore-Sassoon, Y., Hamblin, P.A., Bootle-Wilbraham, C.A., Poole, P.S., Armitage, J.P. (1998).** Metabolism is required for chemotaxis to sugars in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology*, 144(1):229-239.
- Jörnvall H., Persson, B. und Jeffrey, J. (1987).** Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, 167:195-201.
- Jones, J.B., Sneddon, D.W., Higgins, W., 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.*, 856-857.
- Jordan, D.C. und Allen, O.N. (1974).** In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ed. R.E. Buchanan, N.E. Gibbons. pp. 261-267. Baltimore: Williams & Wilkins, 8th ed.
- Julliard, M. und Lepetit, J. (1982).** Regeneration of NAD⁺ and NADP⁺ cofactors by photosensitized electron-transfer. *Photochem. Photobiol.*, 36:283-290.

- Kabashima, T., Li, Y., Kanada, N., Ito, K und Yoshimoto, T. (2001).** Enhancement of the thermal stability of pyroglutamyl peptidase I by introduction of an intersubunit disulfide bond. *Biochem. Biophys. Acta*, 1547:214-220.
- Kahle C., Schneider, K.H. und Giffhorn F. (1992).** Pentitol metabolism of *Rhodobacter sphaeroides* Si4: purification and characterization of a ribitol dehydrogenase. *J. Gen. Microbiol.*, 138:1277-1281.
- Kallwass, H.K.W. (1992).** Potential of R-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei* for stereospecific reductions. *Enzyme Microb. Technol.*, 14:28-34.
- Kanagasundaram, V. und Scopes, R.K. (1992).** Cloning, sequence analysis. and expression of the structural gene encoding glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.*, 174:1439-1447.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shinpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., Tabata, S. (2002).** Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Research*, 9:189-197.
- Kanemori, M., Nishihara, K., Yanagi, H., Yura, T. (1997).** Synergistic roles of Hslvu and other ATP-dependent proteases in controlling in vivo turnover of sigma32 and abnormal proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 179:7219-7225.
- Kaplan, F., Setlow, P., Kaplan, N.O. (1969).** Purification and properties of a DPNH-TPNH diaphorase from *Clostridium kluyveri*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 132:91-98.
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1994).** Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 14. Auflage. *Thieme Verlag, Stuttgart, New York*.
- Karyakin, A.A., Karyakina, E.E., Schuhmann, W., Schmidt, H.L. (1999).** Electropolymerized azines: part II. In search of the best electrocatalyst of NADH oxidation. *Electroanal.*, 11:553-557.
- Kataoka, M., Kita, K., Wada, M., Yasohara, Y., Hasegawa, J. und Shimizu, S. (2003).** Novel bioreduction systems for the production of chiral alcohols. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62:437-445.
- Kelker, N.E. und Anderson, R.L. (1971).** Sorbitol metabolism in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.*, 105:160-164.
- Kesters, K. (1967).** Rapid screening assay for soluble and particulate bacterial dehydrogenases. *Antonie van Leeuwenhoek*, 33(1):63-72.
- Khalameyzer, V., Fischer, I., Bornscheuer, U.T., Altenbuchner, J. (1999).** Screening, nucleotide sequence, and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:477-482.
- Khan, A.R., Takahata, S., Okaya, H., Tsumura, T., Izumori, K. (1992).** "D-sorbose fermentation" from galactitol by *Pseudomonas* sp. ST24. *J. Ferment, Bioeng.*, 74(3):149-152.

- Kiley, P.J. und Kaplan, S. (1988).** Molecular genetics of photosynthetic membrane biosynthesis in *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiol. Rev.*, 52:50-69.
- Kim, M.H. und Yun, S.E. (2004).** Construction of an electro-enzymatic bioreactor for the production of (R)-mandelate from benzoylformate. *Biotechnol. Lett.*, 26(1):21-26.
- Klein, M., Hoffmann, L., Block, H.J., Hermann, U. (1993).** The energy utilization of L-fructose in rats. *Nahrung*, 37(4):305-320.
- Klein, T. (2009).** Molekularbiologische Optimierung einer Sorbitol-Dehydrogenase aus *Rhodobacter sphaeroides* Si4 zum Einsatz in elektroenzymatischen Reaktionen. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.
- Ko, S.Y., Lee, A.W., Masamune, S., Reed, L.A., Shapless, K.B., Walker, F.J. (1983).** Total synthesis of the L-hexoses. *Science*, 220(4600):949-951.
- Kohring, G.W., Wiehr, P., Jeworski, M. und 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.
- Kornberger, P. (2009).** Expression der Galaktitol-Dehydrogenase in *Rhodobacter sphaeroides* D und Herstellung von aktiven Mutationen zur Immobilisierung auf Goldelektroden. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Kornberger, P., Gajdzik, J., Natter, H., Wenz, G., Giffhorn, F., Kohring, G.W., Hempelmann, R. (2009).** Modification of galactitol-dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D for immobilization on polycrystalline gold surfaces. *Langmuir*, 25(20):12380-12386.
- Kozdroj, J. und Van Elsas, J.D. (2001).** Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J. Microbiol. Methods*, 43:197-212.
- Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W. und Wandrey, C. (1996).** Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example. *Biotechnol. Bioeng.*, 52:309-319.
- Kubala, J., Caplovic, J., Ondrejko, A., Svec, J. (1986).** Czech.CS Pat. 221038; *Chem. Abstr.*, 105:172971.
- 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.
- Kühn, A., Yu, S. und 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 rare sugar synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:1248-1257.
- Kula, M.R., Wichmann, R., Oden, U., Wandrey, C. (1980).** Influence of substrate or product inhibition on the performance of enzyme reactors. *Biochemie*, 62:523-536.

- Lagares, A., Caetano-Anolles, G., Niehaus, K., Lorenzen, J., Ljunggren, H.D., Puhler, A., Favelukes, G. (1992).** A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.*, 174:5941-5952.
- Lagares, A., Hozbor, D.F., Niehaus, K., Otero, A.J., Lorenzen, J., Arnold, W., Puhler, A. (2001).** Genetic characterization of a *Sinorhizobium meliloti* chromosomal region in lipopolysaccharide biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 183:1248-1258.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lane, D.J., (1991).** 16S/23S rRNA Sequencing, S. 115-175. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Nucleic acid techniques in bacterial systematics. *Wiley & Sons*, New York.
- Laskey, R.A., Honda, B.M., Mills, A.D., Finch, J.T. (1978).** Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature*, 275:416-420.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Visconti, A. (2003).** Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1):634-640.
- Lee, L.G. und Whitesides, G.M. (1985).** Enzyme-catalyzed organic synthesis: a comparison of strategies for in situ regeneration of NAD⁺ from NADH. *J. Am. Chem. Soc.*, 107:6999-7008.
- Lee, L.G. und Whitesides, G.M. (1986).** Preparation of optically active 1,2-diols and α -hydroxy ketones using glycerol dehydrogenases as catalyst: limits to enzyme catalyzed synthesis due to non-competitive and mixed inhibition by product. *J. Org. Chem.*, 51:25-36.
- Leung D.W., Chen E.Y., Goeddel D.V. (1989).** A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique*, 1:11-15.
- Levin, V. und Zehner, L.R. (1990).** Eur. Pat. 397027, *Chem. Abstr.*, 114:242827.
- Lichtenthaler F.W., Immel S., Martin D., Müller V. (1993).** Some disaccharide-derived building blocks of potential industrial utility. In *Carbohydrates as organic raw materials*, ed. Descotes G, 59-98 pp. Verlag Chemie, Weinheim. 59-98 pp.
- Lindqvist, Y. (1989).** Refined structure of spinach glycolate oxidase at 2 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 209:151-166.
- Liss, M.M., Horwitz, S., Kaplan, N. (1962).** D-Mannitol-1-phosphate dehydrogenase and D-sorbitol-6-phosphate dehydrogenase in *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.*, 237:1342-1350.
- Livesey, G. und Brown, J.C. (1995).** Whole body metabolism is not restricted to D-sugars because energy metabolism of L-sugars fits a computational model in rats. *J. Nutr.*, 125(12):3020-3029.
- Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F., Eck, J. (2002).** Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:572-577.
- Lottspeich, F. und Zorbach, H. (1998).** Bioanalytik, 1. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*.

Lütz, S., Rao, N., Wandrey, C. (2006). Membranes in biotechnology. *Chem. Eng. Technol.*, 29:1404-1415.

MacKintosh, R.W. und Fewson, C.A. (1988). Benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase II from *Acinetobacter calcoaceticus*. Substrate specificities and inhibition studies. *Biochem. J.*, 255:653-661.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2001). Brock, Mikrobiologie, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin.

Maeda, N., Kanai, T, Atomi, H., Imanaka, T., (2002). The unique pentagonal structure of an archaeal Rubisco is essential for its high thermostability. *J. Biol. Chem.*, 277:31656-31662.

Mallinder, P.R., Pritchard, A., Moir, A. (1992). Cloning and characterization of a gene from *Bacillus stearothermophilus* var. non-diastaticus encoding a glycerol dehydrogenase. *Gene*, 110(1):9-16.

Manchenko, G.P. (1994). A handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. *CRC Press*, Boca Raton, FL.

Mandler, D. und Willner, I. (1984). Solar light induced formation of chiral 2-butanol in an enzyme-catalyzed chemical system. *J. Am. Chem. Soc.*, 106:5352-5353.

Mandler, D. und 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.

Mano, N. und Kuhn, A. (1999). Immobilized nitro-fluorenone derivatives as electrocatalysts for NADH oxidation. *J. Electroanalytical Chem.*, 477:79-88.

Mano, N. und Kuhn, A. (2001). Electrodes modified with nitrofluorenone derivatives as a basis for new biosensors. *Biosensors and Bioelectronics.*, 16:653-660.

Masuda-Nishimura I., Minamihara T., Koyama Y. (1999). Improvement of thermal stability and reactivity of pyranose-oxidase from *Coriolus versicolor* by random mutagenesis. *Biotechnol. Lett.* 21, 203-207.

Matell, M. (1953). Stereochemical studies on plant growth regulators. VII. Optically active α -(2-methyl-4-chlorophenoxy)propionic acid and α -(2,4-dichlorophenoxy)-n-butyric acid and their steric relations. *Ark. Kemi.*, 6:365-373.

Mathis, J.N., McMillan, D.E., Champion, R.A., Hunt, P.G. (1997). Genetic variation in two cultures of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 differing in their ability to impact drought tolerance to soybean. *Curr. Microbiol.*, 35:363-366.

Mattevi, A., de Kok, A., Perham, R.N. (1992). The pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:877-887.

Mayer, K.M. und Arnold, F.H. (2002). A colorimetric assay to quantify dehydrogenase activity in crude cell lysates. *J. Biomol. Screen.*, 7(2):135-140.

- Mayers-Küntzer, H.M. (1993).** Isolierung und Charakterisierung einer L-Glucit-Dehydrogenase aus einem neu isolierten Bakterium *Pseudomonas spec.* Ac. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.
- Mayers-Küntzer, H., Reichert, A., Schneider, K.H., Giffhorn, F. (1993).** Isolation and characterization of a L-glucitol-dehydrogenase from the newly isolated bacterium *Pseudomonas sp.* Ac. *J. Biotech.*, 36:157-164.
- Meng, X., Wu, X., Wang, Z., Cao, X., Zhang, Z. (2001).** The electrochemical and spectroelectrochemical behaviors of SOD at cysteine modified gold electrode. *Bioelectrochemistry*, 54:125-129.
- Miao, Y., Chia, L.S., Goh, N.K., Tan, S.N. (2001).** Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan matrix crosslinked with glutaraldehyde. *Electroanalysis*, 13(4):347-349.
- Minamisawa, K. und Mitsui, H. (2000).** In: Bollag, J. und Stotzky, G. (eds), *Soil Biochemistry*, Vol. 10., Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 349-377.
- Minister, D.K. und Hecht, S.M. (1978).** Synthesis of L-glucose from glucose via aldose interchange. *J. Org. Chem.*, 43(20):3987-3988.
- Mitra, B., Gerlt, J.A., Babbitt, P.C., Koo, C.W., Kenyon, G.L., Joseph, D., Petsko, G. (1993).** A novel structural basis for membrane association of a protein: construction of a chimeric soluble mutant of (S)-mandelate dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, 32:12959-12967.
- Molinari, F. (2006).** Oxidations with isolated and cell-bound dehydrogenases and oxidases. *Curr. Org. Chem.*, 10:1247-1263.
- Mogk, A., Mayer, M.P., Deuerling, E. (2001).** Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. *Biologie in unserer Zeit*, 31:182-192.
- Moore, M.D. und Kaplan, S. (1992).** Identification of intrinsic high-level resistance to rare-earth oxides and oxyanions in membranes of the class Proteobacteria: characterization of tellurite, selenite and rhodium sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.*, 174:1505-1514.
- Moreira, L.M., Becker, J.D., Puhler, A., Becker, A. (2000).** The *Sinorhizobium meliloti* ExpE1 protein secreted by a type I secretion system involving ExpD1 and ExpD2 is required for biosynthesis or secretion of the exopolysaccharide galactoglucan. *Microbiology*, 146(Pt9):2237-2248.
- Mortlock, R.P. (1976).** Catabolism of unnatural carbohydrates by microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, 13:1-53.
- Mujagic, H., Chabner, B.A., Mujagic, Z. (2002).** Mechanisms of action and potential therapeutic uses of thalidomide. *C. Medical J.*, 43(3):274-285.
- Muniruzzaman, S., Kobayashi, H., Izumori, K. (1994).** Production of D-talitol from D-tagatose by *Aureobasidium pullulans* strain 113B. *J. Ferment. Bioeng.*, 78:346-350.

- Muniruzzaman, S., Tokunaga, H., Izumori, K. (1995).** Conversion of D-spicose to allitol by *Enterobacter agglomerans* strain 221e., *J. Ferment. Bioeng.*, 79:323-327.
- Muniruzzaman, S., Pan, Y.T., Zeng, Y., Atkins, B., Izumori, K., Elbein, A.D. (1996).** Inhibition of glycoprotein processing by L-fructose and L-xylulose. *Glycobiology*, 6(8):795-803.
- Musameh, M., Wang, J., Merkoci, A., Lin, Y. (2002).** Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes. *Electrochem. Commun.*, 4:743-746.
- Nakamura, T., Naito, A., Takahashi, Y., Akanuma, H. (1986).** Oxidation of 1,5-Anhydro-D-glucitol to 1,5-Anhydro-D-fructose catalyzed by an enzyme from bacterial membranes. *J. Biochem. (Tokyo)*, 99:607-613.
- Nathan, C. (1992).** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.*, 6:3051-3064.
- Neidle, E., Hartnett, C., Ornston, L.N., Bairoch, A., Rekik, M., Harayama, S. (1992).** Cis-diol dehydrogenases encoded by the TOL pWW0 plasmid xylL gene and the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal benD gene are members of the short-chain alcohol dehydrogenase superfamily. *Eur. J. Biochem.*, 204(1):113-20.
- Neidhart, D.C., Kenyon, G.L., Gerlt, J.A., Petsko, G.A. (1990).** Restructuring catalysis in the mandelate pathway. *Biochem. Soc. Symp.*, 57:135-141.
- Nidetzky, B., Haltrich, D., Schmidt, K., Schmidt, H., Weber, A., Kulbe, K.D. (1996).** Simultaneous enzymatic synthesis of mannitol and gluconic acid. II. Development of a continuous process for a coupled NAD(H)-dependent enzyme system. *Biocatal. Biotrans.*, 14:47-65.
- Niehaus, K. und Becker, A. (1998).** The role of microbial surface polysaccharides in the *Rhizobium*-legume interaction. *Subcell. Biochem.*, 29:73-116.
- Nishihira, K., Kanemori, M., Kitagawa, M., Yanagi, H., Yura, T. (1998).** Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GroE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:1694-1699.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H., Yura, T. (2000).** Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:884-889.
- Noma, A., Sato, M., Tsuzuki, Y. (1974).** Taste effectiveness of anomers of sugars and glycosides as revealed from hamster taste responses. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 48(2):249-262.
- Novotny, M.J., Reizer, J., Esch, F., Saier, M.H. Jr. (1984).** Purification and properties of D-mannitol-1-phosphate-dehydrogenase and D-glucitol-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 159:986-990.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Grönlund, M., Isolauri, M., Salminen, S.J. (1999).** Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*, 8:725-732.

- Perham, R.N. (1991).** Domains, motifs and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. *Biochemistry*, 30:8501-8512.
- Persson, B und Gorton, L. (1990).** A comparative study of some 3,7-diaminophenoxazine derivates and related compounds for electrocatalytic oxidation of NADH. *J. Electroanal. Chem.*, 292:115-138.
- Peters, J. (1993).** Isolierung und Charakterisierung von Enzymsystemen zur stereoselektiven Reduktion von Ketosäuren/-estern. Dissertation, Universität Düsseldorf.
- 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.*
- Petrovicky, P., Barcal, J., Myselicecek, J. (1999).** Nitric oxide synthase (NADPH-Diaphorase) content in brain neurons of neonatal rats after inhibitory learning and intervention into nitric oxide metabolism. *Neurosci.*, 89:1151-1157.
- Pfennig, N. (1964).** Anreicherungskulturen für rote und grüne Schwefelbakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr., Hyg. Abt. 1*:179-189. Suppl. 1 (Anreicherungskultur und Mutantenauslese).
- Pfennig, N. und Lippert, K.D. (1966).** Über das B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Microbiol.*, 55:245-256.
- Pfennig, N. und 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.
- Pfennig, N. (1974).** *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of *Rhodospirillaceae*. *Arch. Microbiol.*, 100:197-206.
- Philippsen, A., Schirmer, T., Stein, M.A., Giffhorn, F., Stetefeld, J. (2005).** Structure of zinc-independent sorbitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* at 2.4 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D*, 61:374-379.
- Pitz, M. (2007).** Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Expression eukaryontischer Pyranose-2-Oxidase in *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.
- Pogulis, R.J., Vallejo, A.N., Pease, L.R. (1996).** In vitro recombination and mutagenesis by overlap extension PCR. *Methods Mol. Biol.*, 57:167-176.
- Poindexter, J.S. (1981).** Oligotrophy – fast and famine existence. *Adv. Microb. Ecol.*, 5:63-89.
- Portaccio, M., Durante, D., Viggiano, A., Di Martino, S., De Luca, P., Di Tuoro, D., Bencivenga, U., Rossi, S., Canciglia, P., De Luca, B., 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.
- Prentki, P., Tetr, B., Chandler, M. Galas, D.J. (1988).** Functional promoters created by insertion of transposable element IS1. *J. Mol. Biol.*, 191:383-393.

- Quilitz, R. (1999).** Thalidomide in oncology: the peril and the promise. *Cancer Control*, 6:483-495.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Jurkiewicz, E.F., Quistgaard, E.M.H., Albrektsen, A.S., James, E.K., Thirup, S., Stoutgaard, J. (2007).** LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *The EMBO Journal*, 26:3923-3935.
- Ransom, S.C., Gerlt, J.A., Powers, V.M., Kenyon, G.L. (1988).** Cloning, DNA sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the gene for mandelate racemase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, 27(2):540-545.
- Reichert, A. (1994).** Grundlagen zur biotechnischen Synthese der seltenen Zucker L-Glucose und L-Fructose aus L-Glucit und D-xylo-3-Hexulose aus Galactit. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Reichstein, T. und Grüssner, A. (1934).** Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (Vitamin C). *Helv. Chim. Acta*, 17:311-328.
- Reid, M.F. und Fewson, C.A. (1994).** Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.*, 20:13-56.
- Reetz, M.T. und Carballeira, J.D. (2007).** Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nature Protocols*, 2(4):891-903.
- Rehg, J.E. und Torack, R.M. (1977).** Partial purification and characterization of sorbitol-dehydrogenase from rat brain. *J. Neurobiochem.*, 28:655-660.
- Reynolds, A.E., Felton, J., Wright, A. (1981).** Insertion of DNA activates the cryptic *bgl* operon of *E. coli* K-12. *Nature*, 293:625-629.
- Risler, M., Tegoni, M., Gervais, M. (1989).** Nucleotide sequence of the *Hanensula anomala* gene encoding flavocytochrome b₂ (L-lactate:cytochrome c oxidoreductase). *Nucleic Acids Res.*, 17(20):8381.
- Rodriguez-Valera, F. (2002).** Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environ. Microbiol.*, 4:628-633.
- Röper, H. (1991).** Selective oxidation of D-glucose: chiral intermediates for industrial utilization. In *Carbohydrates as organic raw materials*, ed. Lichtenthaler FW, pp. 267-288, Verlag Chemie, Weinheim.
- Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A. et al. (2000).** Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:2541-2547.
- Rosello-Mora, R. und Amann, R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25:39-67.

- Ruppert, R., Herrmann, S., 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.
- Russell, R.J., Hough, D.W., Danson, M.J., Taylor G.L. (1994).** The crystal structure of citrate synthase from the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *Structure*, 2:1157-1167).
- Saidmann, S.B. und Bessone, J.B. (2000).** The influence of electrode material on NAD⁺ oxidation. *Electrochimica Acta*, 45:3151-3156.
- Salimi, A., Izadi, M., Hallaj, R., Soltanian, S., Hadadzadeh, H. (2009).** Electrocatalytic reduction of NAD⁺ at glassy carbon electrode modified with single-walled carbon nanotubes and Ru(III) complexes. *J. Solid State Electrochem.*, 13:485-496.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989).** Molecular cloning: a laboratory manual, 2. Auflage. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, NY.
- Sambrook, J. und Russell, D.W. (2006).** The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Fritsch, E.F., Coulson, A.R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl., Acad., Sci U.S.A.*, 74:5463-5467.
- Sasahara, Y. und Izumori, K. (1999).** Production of D-iditol from D-sorbose by *Rhodotorula rubra* RY10 isolated from miso paste. *J. Biosci. Bioeng.*, 87:548-550.
- Sasahara, Y., Mine, M., Izumori, K. (1998).** Production of D-talitol from D-psicose by *Candida famata* R28. *J. Ferment. Bioeng.*, 85:84-88.
- Sasajima, K.I. und Sinskey, A.J. (1979).** Oxidation of L-glucose by a pseudomonad. *Biochim. Biophys. Acta*, 571(1):120-126.
- Sauer, R.T., Hehir, K., Stearman, R.S., Weiss, M.A., Jeitler-Nilsson, A., Suchanek, E.G., Pabo, C.O. (1986).** An engineered intersubunit disulfide enhances the stability and DNA binding of the N-terminal domain of lambda repressor. *Biochemistry*, 25:5992-5998.
- Schauder, S., Schneider, K.-H. und Giffhorn, F. (1995).** Polyol metabolism of *Rhodobacter sphaeroides*: biochemical characterization of a short-chain sorbitol dehydrogenase. *Microbiology*, 141:1857-1863.
- Schiene, C. und Fischer, G. (2000).** Enzymes that catalyse the restructuring proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10:40-45.
- Schlegel H.G. und Zabororsch, C. (1992).** Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage. *Thieme Verlag*, Stuttgart.
- Schlieker, C., Bukau, B., Mogk, A. (2002).** Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J. Biotechnology*, 96:13-21.
- Schloter, M., Wiehe, W., Assmus, B., Steindl, H., Becke, H., Hoflich, G., Hartmann, A. (1997).** Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium*

leguminosarum bv. *trifolii* R39 studied with monospecific polyclonal antisera. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:2038-2046.

Schmidt, E., Hummel, W., Wandrey, C., 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 Engineering – A challenge for interdisciplinary cooperation*, pp 487-490.

Schmidt, S.K., Alexander M., Shuler, M.L. (1984). Predicting treshold concentrations of organic substrates for bacterial growth. *J. theor. Biol.*, 114:1-8.

Schmitt, J., Hess, H., Stunnenberg, H.G. (1993). Affinity purification of histidine-tagges proteins. *Molecular Biology Reports*, 18:223-230.

Schneider, K.H. und Giffhorn, F. (1989). Purification and properties of a polyol dehydrogenase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur. J. Biochem.*, 184:15-19.

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.

Schoberth, S. und Gottschalk, G. (1969). Considerations on the energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. *Arch. Mikrobiol.*, 65:318-328.

Schröder, I. (2003). Elektrochemische Oxidation von Nukleotidkofaktoren. Charakterisierung und Prozessentwicklung asymmetrischer enzymatischer Katalysesysteme. Dissertation, Universität Bonn.

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 und Lütz, S. (2007). Continuous asymmetric ketone reduction process with recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 132:438-444.

Schütte, H. Flossdorf, J., Sahn, H., Kula, M.R. (1976). Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur. J. Biochem.*, 62:151-160.

Schwab, A.J., Delannoy, I.A.M., Goresky, C.A., Poon, K., Pang, K.S. (1992). Enalaprilat handling by kidney: barrier-limited cell entry. *Am. J. Physiol.*, 263(5):850-861.

Scopes, D.A., Bautista J.M., Naylor C.E. Adams M.J., Mason P.J. (1998). Amino acid substitutions at the dimer interface of human glucose-6-phosphate dehydrogenase that increase thermostability and reduce the stabilising effect of NADP. *Eur. J. Biochem.* 251(1-2):382-8.

Seedorf, H., Fricke, W.F., Veith, B., Brüggemann, H., Liesegang H., Strittmatter, A., Miethke, M., Buckel, W., Hinderberger, J., Li, F., Hagemeyer, C., Thauer, R.K. (2007). The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *PNAS*, 105(6): 2128-2133.

Segovia, L., Pinero, D., Palacios, R., Martinez-Romero, E. (1991). Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:426-433.

- Shallenberger, R.S., Acree, T.E., Lee, C.Y. (1969).** Sweet taste of D- and L-sugars and amino-acids and the steric nature of their chemo-receptor site. *Nature*, 221(5180):555-556.
- Shao Z. und Arnold F.H. (1996).** Engineering new functions and altering existing functions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6(4):513-8.
- Sheldon R. (1999).** Enzymes: picking a winner. *Nature* 399(6737):636-7.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996).** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 68:850-858.
- Shimonishi, T., Okumura, Y., Izumori, K (1995).** Production of L-Tagatose from galactitol by *Klebsiella pneumoniae* strain 40b., *J. Ferment. Bioeng.*, 79(6):620-622.
- Shirakawa, M., Matsuo, H., Kyogoku, Y. (1991).** Intersubunit disulfide-bonded lambda-Cro protein. *Protein Eng.*, 4:545-552.
- Siegel, L.M. und Monty, K.J. (1966).** Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 112(2):346-362.
- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M. (2005).** Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:591-610.
- Snyder, S.H. (1992).** Nitric oxide and neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2:323-327.
- Socolsky de Fenik, I.J. und Recondo, E.F. (1968).** *Chem. Abstr.*, 68:22172.
- Sohling, B. und Gottschalk, G. (1996).** Molecular analysis of the anaerobic succinate degradation pathway in *Clostridium kluyveri*. *J. Bacteriol.*, 178(3):871-880.
- Spadiut O., Leitner C., Tan T.C., Ludwig R., Divine C., Haltrich D. (2008).** Mutations of Thr169 affect substrate specificity of pyranose-2-oxidase from *Trametes multicolor*. *Biocatalysis and Biotransformation* 26(1&2):120-7.
- Spaink, H.P., Wijfjes, A.H.M., Lugtenberg, B.J.J. (1995).** *Rhizobium* NofI und NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *J. Bacteriol.*, 177(21):6276-6281.
- Spessert, R., Wohlgemuth, C., Reuss, S., Layes, E. (1998).** NADPH-diaphorase activity of nitric oxide synthase in olfactory bulb: co-factor specificity and characterization regarding interrelation to NO formation. *J. Histochem., Cytchem.*, 42:569-575.
- Stadtman, E.R. (1953) [1].** The coenzyme A transphorase system in *Clostridium kluyveri*. *J. Biol. Chem.*, 203:501-512.
- Stadtman, E.R. (1953) [2].** Functional group of coenzyme A, its metabolic relations, especially in the fatty acid cycle: discussion. *Fed. Proc.*, 12:692-693.
- Steckhan, E. (1994).** Electroenzymatic synthesis. *Top. Curr. Chem.*, 170:83-111.

- Steckhan, E., Herrmann, S., Ruppert, R., Dietz, E., Frede, M., 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)⁺. *Organomet.*, 10:1568-1577.
- Stein, M.A. (1998).** Das *smo*-Operon aus *Rhodobacter sphaeroides*: Klonierung, Sequenzierung und molekulare Analyse. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Stemmer W.P. (1994).** Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370(6488):389-91.
- Stenberg, K., Clausen, T., Lindqvist, Y., Macheroux, P. (1995).** Involvement of Tyr24 and Trp108 in substrate binding and substrate specificity of glycolate oxidase. *Eur. J. Biochem.*, 228:408-416.
- 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.
- Stolp, H. und Gadkari, D. (1981).** Nonpathogenic members of the genus *Pseudomonas*. Springer Verlag, New York.
- Stoppok E., Matalla K., Buchholz K. (1992).** Microbial modification of sugars as building blocks for chemicals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36(5):604-10.
- Stowers, M.D. (1985).** Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu. Rev. Microbiol.*, 39:89-108.
- Straathof, A.J., Panke, S., Schmid, A. (2002).** The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:548-556.
- Stryer L., Berg, M., Tymoczko, J.L. (2003).** Biochemie, 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- Suami, T und Hough, L. (1992).** Molecular mechanisms of sweet taste, 2: Glucopyranose, fructopyranose and sucrose. *J. Carbohydr. Chem.*, 11:953-967.
- Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W. (1987).** Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Suwanto, A. und 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.
- Suwanto, A. und Kaplan, S. (1992).** Chromosome transfer in *Rhodobacter sphaeroides*: Hfr formation and genetic evidence for two unique circular chromosomes. *J. Bacteriol.*, 174:1135-1145.
- Szabo, C. (1995).** Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz*, 3:2-32.
- Szarek, W.A., Hay, G.W., Vyas, E.R., Ison, E.R., Hronowski, L.J.J. (1984).** L-glucose. A convenient synthesis from D-glucose. *Can. J. Chem.*, 62:617-674.

- Szilagyi, A. und Zavodszky, P. (2000).** Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Struct. Fold. Des.*, 8:493-504.
- Takagi, M., Nishioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., Imanaka, T. (1997).** Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(11):4504-4510.
- Takeshita, K., Suga, A., Takada, G., Izumori, K. (2000).** Mass production of D-psicose from D-fructose by a continuous bioreactor system using immobilized D-tagatose-3-epimerase. *J. Biosci. Bioeng.*, 90:453-455.
- Tamura, A., Kojima, S., Miura, K., Sturtevant, J.M. (1994).** Effect of an intersubunit disulfide bond on the stability of *Streptomyces* subtilisin inhibitor. *Biochemistry*, 33:14512-14520.
- Tanaka, S., Lerner, S.A., Lin, E.C. (1967).** Replacement of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase by a nicotinamide adenine dinucleotide-linked dehydrogenase for the utilization of mannitol. *J. Bacteriol.*, 93:642-648.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Henninger, H., Wenning, J., Decker, K. (1968).** The energy metabolism of *Clostridium kluyveri*. *European J. Biochem.*, 4:173-180.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K. (1977).** Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 41(1):100-180.
- Thoma, R., Hennig, M., Sterner, R., Kirschner, K. (2000).** Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Struct. Fold. Des.*, 8:265-276.
- Thomas, J.G. (1997).** Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotech.*, 66:197-238.
- Thompson, L.W. und Krawiec, S. (1983).** Acquisitive evolution of ribitol-dehydrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 154:1027-1031.
- Tienharra, R. und Meany, J.E. (1973).** Lactate dehydrogenase catalyzed reduction of pyruvate. Active substrate and substrate inhibition. *Biochemistry*, 12(11):2067-2070.
- Torsvik, V.I. und Ovreas, L. (2002).** Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5:240-245.
- Torsvik, V.I., Ovreas, L., Thingstad, T.F. (2002).** Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296:1064-1066.
- Trejo, F., Gelpi, J.L., Ferrer, A., Boronat, A., Busquets, M., Cortes, A. (2001).** Contribution of engineered electrostatic interactions to the stability of cytosolic malate dehydrogenase. *Protein Eng.*, 14:911-917.
- Tse, D.C.S. und Kuwana, T. (1978).** Electrocatalysis of dihydronicotinamide adenosine diphosphate with quinones and modified quinone electrodes. *Analytical Chemistry*, 50(9):1315-1318.

- Tsou, A.Y., Ransom, S.C., Gerlt, J.A., Buechter, D.D., Babbitt, P.C., Kenyon, G.L. (1990).** Mandelate pathway of *Pseudomonas putida*: sequence relationships involving mandelate racemase, (S)-mandelate dehydrogenase, and benzoylformate decarboxylase and expression of benzoylformate decarboxylase in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 29:9856-9862.
- Tsugeki, R., Hara-Nishimura, I., Mori, H., Nishimura, M. (1993).** Cloning and sequencing of cDNA for glycolate oxidase from pumpkin cotyledons and northern blot analysis. *Plant Cell Physiol.*, 34(1):51-57.
- Van den Burg, B. und Eijsink, V.G.H. (2002).** Selection of mutations for increased protein stability. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:333-337.
- 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.
- Vieille, C. und Zeikus, G.J. (2001).** Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65:1-43.
- Vriend, G. (1990).** WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.*, 8:52-56.
- Voget, S., Leggwie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K.E., Streit, W.R. (2003).** Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:6235-6242.
- Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76(2):615-619.
- Voivodov, K.I., Sobolov, S.B., Leonida, M.D., 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.
- Volokita, M. und Somerville, C.R. (1987).** The primary structure of spinach glycolate oxidase deduced from the DNA sequence of a cDNA clone. *J. Biol. Chem.*, 262(33):15825-15828.
- Wallace, R.J., Chaudhary, L.C., Miyagawa, E., McKain, N., Walker, N.D. (2004).** Metabolic properties of *Eubacterium pyruvativorans*, a ruminal "hyper-ammonia-producing" anaerobe with metabolic properties analogous to those of *Clostridium kluyveri*. *Microbiology*, 150:2921-2930.
- Wang, Z., Etienne, M., Kohring, G.W., Walcarius, A. (2010).** Critical effect of polyelectrolytes on the electrochemical response of dehydrogenases entrapped in sol-gel thin films. *Electroanalysis*, 22(17-18):2092-2100.
- Wang Z.Y., Shimonaga M., Muraoka Y., Kobayashi M., Nozawa T. (2001).** Methionine oxidation and its effect on the stability of reconstituted subunit of the light-harvesting complex from *Rhodospirillum rubrum*. *Eur. J. Biochem.* 268(12):3375-82.
- Walden, H., Bell, G.S., Russell, R.J., Siebers, B., Hensel, R., Taylor, G.L. (2001).** Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol.*, 306:745-757.

- Weber, K. und Osborn, M. (1969).** Reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244(16):4406.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.*, 173:697-703.
- Werner, D. (1987).** Pflanzliche und mikrobielle Symbiosen. 1st ed., *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart.
- Wheeler, G.L., Jones M.A., Smirnov, N. (1998).** The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393(6683):365-369.
- Whiteside G.M. und Wong C.H. (1985).** Enzyme in der organischen Synthese. *Angewandte Chemie* 97, 617-638.
- Wichmann, R. und Vasic-Racki, D. (2005).** Cofactor regeneration at the lab scale. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 92:225-260.
- Widdel, F., Kohring, G.W., Mayer, F. (1983).** Studies in dissimilatory sulfate-reducing bacteria that compose fatty acids. III. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov., *Arch. Microbiol.*, 134:286-294.
- Wilson, A.R., Sigee, D., Epton, H.A.S. (2005).** Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *J. Appl. Microbiol.*, 99:1516-1522.
- Wöltinger, J., Drauz, K., Bommarius, A.S. (2001).** The membrane reactor in the fine chemical industry. *Appl. Catal. A: Gen.*, 221:171-185.
- Woese, C.R., Magrum, L.J., Gupta, R., Siegel, R.B., Stahl, D.A., Kop, J., Crawford, N., Brosius, J., Gutell, R., Hogan, J.J., Noller, H.F. (1980).** Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucleic Acids Res.*, 8(10):2275-2293.
- Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51:221-271.
- Wong, T.S., Roccatano, D., Zacharias, M., Schwaneberg, U. (2006) [1].** A statistical analysis of random mutagenesis methods used for directed protein evolution. *J. Mol. Biol.*, 355(4):858-871.
- Wong, T.S., Zhurina, D., Schwaneberg, U. (2006) [2].** The diversity challenge in directed protein evolution. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.*, 9(4):271-288.
- Wong, C.H. und Whitesides, G.M. (1994).** Enzymes in the synthesis organic chemistry. *Pergamon, Elsevier Science Inc., New York, USA*.
- 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.
- Xia, Z.-X. und Matthews, F.S. (1990).** Molecular structure of flavocytochrome b_2 at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 212:837-863.

- Xu, Y. und Mitra, B. (1999).** A highly active, soluble mutant of the membrane-associated (S)-mandelate dehydrogenase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, 38:12367-12376.
- Yamada, M., Milton, H., Hatefi, Y. (1995).** Glucitol-specific enzymes of the phosphotransferase-system in *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 262:5444-5463.
- Yip, K.S.P., Stillman, T.J., Britton, K.L., Artymiuk, P.J., Baker, P.J., Sedelnikova S.E., Engel, P.C., Pasquo, A., Chiaraluce R., Consalvi, V. et al. (1995).** The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for ion-pair networks in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure*, 3:1147-1158.
- Yip, K.S., Britton, K.L., Stillman, T.J., Lebbink, J., de Vos, W.M., Robb, F.T. et al. (1998).** Insights into the molecular basis of thermal stability from the analysis of ion-pair networks in the glutamate dehydrogenase family. *Eur. J. Biochem.*, 255:336-346.
- Zachariou, M. und 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.
- Zeyer, J., Lehrbach, P.R., 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.
- Zhao H., Giver L., Shao Z., Affholter J.A., Arnold F.H. (1998).** Molecular evolution by staggered extension process (StEP) in vitro recombination. *Nat. Biotechnol.* 16(3):258-61.
- Zhou, S., Kvikstad, E., Kile, A., Severin, J., Forrest, D., Runnheim, R., Churas, C., Hickman, J.W., MacKenzie, C., Choudhary, M., Donohue, T., Kaplan, S., 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.
- Zhou, Y., Nagaoka, T., Zhu, G. (1999).** Electrochemical studies of cytochrome c disulfide at gold electrodes. *Biophys. Chem.*, 79:55-62.
- 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.

Lebenslauf

Geburtsdatum und -ort	08.09.1980 in 66113 Saarbrücken
08/1987 – 06/1991	Arnold-Rütter-Grundschule, 66399 Erfweiler-Ehlingen, Mandelbachtal
08/1991 – 06/2000 06/2000	Von der Leyen-Gymnasium, 66440 Blieskastel Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
09/2000 – 09/2002	Studium der Biotechnologie, Fachhochschule Bingen am Rhein
10/2002 – 02/2008	Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken
02/2008	Abschluss: Diplom
03/2008 – 06/2011	wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität des Saarlandes, ZHMB, Institut für Angewandte Mikrobiologie
seit 03/2008	Promotion am Institut für Angewandte Mikrobiologie, Universität des Saarlandes, Saarbrücken

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als die 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, Unterschrift