

# **Konstruktion eines bakteriellen Systems zum Export von Coenzym B<sub>12</sub>**

Dissertation  
zum Erlangen des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
***Caroline Toeche-Mittler***  
aus Hamburg

Göttingen 2002

D7

Referent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Korreferent: Prof. Dr. W. Liebl

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 2002

*Meiner Mutter, Tilli  
und dem kleinen Mops in mir gewidmet*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Organismen und Plasmide</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Nährmedien</b>	<b>8</b>
2.2.1 Mineralmedium mit Hefeextraktzusatz (AVERHOFF, 1988; modifiziert) für <i>C. freundii</i> und <i>E. blattae</i>	8
2.2.2 Hefe-Pepton-Medium für <i>C. freundii</i> (HOLDEMAN <i>et al.</i> , 1977)	10
2.2.3 LB (Luria-Bertani)-Medium (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989)	10
2.2.4 Lysin-Decarboxylase-Medium (EKLUND und LANKFORD, 1967)	10
2.2.5 M9-Minimalmedium (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989, modifiziert)	11
2.2.6 Minimal-Aminosäure-Medium für <i>E. coli</i> DSM 4261 (KRZYCKI and ZEIKUS, 1980, modifiziert)	11
2.2.7 Mineralagar für <i>E. coli</i> DSM 4261 (KRZYCKI and ZEIKUS, 1980, modifiziert)	12
2.2.8 SOB-Medium (HANAHAN <i>et al.</i> , 1983)	12
2.2.9 Synthetisches Medium für <i>Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii</i> (SEIFERT, pers. Mitteilung)	13
<b>2.3 Pufferlösungen</b>	<b>13</b>
2.3.1 Kaliumphosphat-Puffer	13
2.3.2 SSC-Puffer (10-fach)	14
2.3.3 TBS-Puffer (10-fach)	14
2.3.4 TBST-Puffer (5-fach)	14
<b>2.4 Feste Medien</b>	<b>14</b>
2.4.1 Medienzusätze	14
<b>2.5 Zellanzucht</b>	<b>15</b>
2.5.1 Aerobe Anzucht	15
2.5.2 Anaerobe Anzucht	15
2.5.3 Messung der optischen Dichte	15
2.5.4 Bestimmung des pH-Wertes	15
2.5.5 Reinheitskontrolle	16
2.5.6 Stammhaltung	16

---

<b>2.6</b>	<b>Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA</b>	<b>16</b>
2.6.1	Vorbehandlung von Geräten und Lösungen	16
2.6.2	Isolierung von Plasmid-DNA	17
2.6.2.1	Schnellpräparation von Plasmid-DNA (HOLMES & QUICKLEY, 1981; RIGGS & McLACHLAN, 1986)	17
2.6.2.2	Schnelle Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> („Cracking“)	17
2.6.2.3	„Präparative Plasmidisolierung mit dem Wizard Purification Kit“	18
2.6.3	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	18
2.6.3.1	Fällung von DNA	18
2.6.3.2	Mikrodialyse von Nukleinsäuren	19
2.6.3.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	19
2.6.3.4	Reinigung von DNA mit dem „Qiaquick Gelextraction-Kit“	19
2.6.3.5	Reinigung von PCR-Produkten	20
2.6.3.6	Gelfiltration von DNA-Lösungen	20
<b>2.7</b>	<b>Gelelektrophorese von Nukleinsäuren</b>	<b>20</b>
2.7.1	Agarosegel-Elektrophorese	20
2.7.2	Ethidiumbromid-Färbung und Fotografie von Agarosegelen	21
2.7.3	Größenbestimmung von Nukleinsäuren	21
<b>2.8</b>	<b>PCR (Polymerase-Kettenreaktion)</b>	<b>23</b>
<b>2.9</b>	<b>Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren</b>	<b>24</b>
2.9.1	Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	24
2.9.2	Dephosphorylierung von Vektor-DNA	25
2.9.3	Ligierung von DNA-Fragmenten	25
2.9.4	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	26
<b>2.10</b>	<b>Übertragung von DNA und Selektion rekombinanter Klone</b>	<b>27</b>
2.10.1	Übertragung von DNA durch Transformation	27
2.10.1.1	Herstellung kompetenter Zellen (INOUE et al., 1990)	27
2.10.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> (INOUE et al., 1990)	27
2.10.1.3	Übertragung von DNA durch Elektroporation (DOWER et al., 1988)	28
<b>2.11</b>	<b>Übertragung von Nukleinsäuren auf Membranen</b>	<b>29</b>
2.11.1	Herstellung von Filtern für die Koloniehybridisierung (BULUWELA et al., 1989)	29
<b>2.12</b>	<b>Hybridisierungsmethoden</b>	<b>29</b>
2.12.1	DNA-DNA-Hybridisierung	29
2.12.2	Autoradiographie	30
<b>2.13</b>	<b>Sequenzierung von DNA</b>	<b>30</b>
2.13.1	Analyse der Sequenzdaten	30

---

<b>2.14</b>	<b>Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>, <i>E. blattae</i>, <i>C. freundii</i> und <i>S. typhimurium</i> TA100</b>	<b>31</b>
2.14.1	Heterologe Expression mit dem pMPM-T4 $\Omega$ / pMPM-A4 $\Omega$ -System	31
2.14.2	Heterologe Expression mit dem pET-System	33
2.14.3	Heterologe Expression pASK-IBA-System	33
<b>2.15</b>	<b>Zellaufschluß und Extrakterstellung</b>	<b>34</b>
2.15.1	Zellernte	34
2.15.2	Zellaufschluß mit der French Presse	34
2.15.3	Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung	35
2.15.4	Cytoplasma- und Membranpräparation	35
2.15.5	Periplasmapräparationen	35
2.15.5.1	Periplasmapräparation (SAMBROCK et al., 1989)	35
2.15.5.2	Periplasmapräparation (WEIß, pers. Mitteilung)	36
2.15.5.3	Periplasmapräparation (HOSHINO & KAGEYAMA, 1980)	36
2.15.5.4	Periplasmapräparation ( ARMBRECHT, pers. Mitteilung, modif.)	36
2.15.5.5	Periplasmapräparation (IBA Manual, modif.)	37
<b>2.16</b>	<b>Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976)</b>	<b>37</b>
<b>2.17</b>	<b>Einengung von Proteinlösungen</b>	<b>38</b>
2.17.1	Einengung mit Polyethylenglycol	38
2.17.2	Einengung mit Centrisart-Röhrchen	38
2.17.3	Dialyse von Proteinlösungen	39
<b>2.18</b>	<b>Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)</b>	<b>39</b>
2.18.1	SDS-PAGE nach SCHÄGGER und VON JAGOW (1987)	39
<b>2.19</b>	<b>Proteinfärbemethoden in Polyacrylamidgelen</b>	<b>40</b>
2.19.1	Coomassie-Färbung	41
2.19.2	Silberfärbung (BLUM <i>et al.</i> , 1987)	41
<b>2.20</b>	<b>Bestimmung der Molekularmassen von Proteinen</b>	<b>43</b>
<b>2.21</b>	<b>Methoden zur Proteinanreicherung</b>	<b>43</b>
2.21.1	Metall-Chelat-Affinitätschromatographie	43
2.21.1.1	Vorbereitung der Säule	44
2.21.1.2	Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen	44
2.21.1.3	Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen	45
2.21.1.4	Regeneration der Säule	45
2.21.1.5	Ammoniumsulfat-Fällung	45

---

<b>2.22</b>	<b>Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Membranen</b>	<b>46</b>
2.22.1	Western Blot (TOBWIN <i>et al.</i> , 1979; modif.)	46
2.22.2	Protein-, „Dot-Blot“-Verfahren (HAWKES, 1986; modif.)	48
<b>2.23</b>	<b>Immunodetektion von Proteinen auf Blotmembranen</b>	<b>48</b>
2.23.1	Chromogene Methoden	48
2.23.1.1	Ni <sup>2+</sup> -NTA-Konjugat-Färbung	48
2.23.1.2	Färbung mit Substrat für Peroxidase-markierten sekundären Antikörper	50
2.23.2	Chemilumineszente Methode	51
2.23.2.1	Detektion mit ECL Plus Substrate (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, UK) für peroxidase-markierten sekundären Antikörper	51
<b>2.24</b>	<b>Nachweis des „Green Fluorescent Protein“ im Fluoreszenzmikroskop</b>	<b>52</b>
<b>2.25</b>	<b>Einbettung von Zellen für elektronenmikroskopische Dünnschichtdarstellungen</b>	<b>52</b>
2.25.1	Ultramikrotomie	53
<b>2.26</b>	<b>Synthese von <sup>14</sup>C-markiertem Coenzym B<sub>12</sub></b>	<b>54</b>
2.26.1	Synthese von 5,6-Dimethyl (2- <sup>14</sup> C) Benzimidazol (HÖRIG und RENZ, 1980)	54
2.26.2	Synthese von Coenzym B <sub>12</sub> durch <i>Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii</i> (HÖRIG und RENZ, 1980)	55
2.26.3	Nachweis und Isolierung des <sup>14</sup> C-markierten Coenzym B <sub>12</sub> durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	55
<b>2.27</b>	<b>Quantitative Bestimmung von Corrinoiden</b>	<b>57</b>
2.27.1	Quantitative Bestimmung von Corrinoiden mittels Plattentest (KRZYCKI und ZEIKUS, 1980; modif.)	57
2.27.2	Photometrische Methode zu quantitativen Corrinoidbestimmung	58
<b>2.28</b>	<b>Bezugsquellen</b>	<b>59</b>

---

<b>3</b>	<b>Experimente und Ergebnisse</b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>Strategie für die Entwicklung eines B<sub>12</sub>-Exporters</b>	<b>62</b>
3.1.1	Fusion der Signalsequenz mit den B <sub>12</sub> -Bindeproteinen	64
3.1.1.1	Klonierung von sigtorA mit dem <i>if</i> -Gen in den Vektor pMPM-T4Ω	64
3.1.1.2	Klonierung von sigtorA mit mutB in den Vektor pMPM-T4Ω	66
<b>3.2</b>	<b>Experimente zum Nachweis der Expression der sigtorA-<i>if</i>-Genfusion</b>	<b>66</b>
3.2.1	Expressionsstudien unter verschiedenen Bedingungen	68
3.2.2	Experimente zum Nachweis der periplasmatischen Translokation des sigTorA-IF-Hybridproteins	73
3.2.2.1	Nachweis des Intrinsic Faktors im Rohextrakt nach Ni <sup>2+</sup> -NTA-Affinitäts-chromatographie	73
3.2.2.2	Nachweis des Intrinsic Faktors im Periplasma nach Ni <sup>2+</sup> -NTA-Affinitätschromatographie	76
3.2.2.3	Konzentrierung des Intrinsic Faktors unter denaturierenden Bedingungen	76
3.2.3	Variation des Transportweges	80
<b>3.3</b>	<b>Studien zum Nachweis der Bindung von B<sub>12</sub> an den IF</b>	<b>82</b>
3.3.1	Abhängigkeit der Corrinoïdproduktion von verschiedenen <i>C. freundii</i> -Stämmen in An- und Abwesenheit von heterolog produziertem IF	82
<b>3.4</b>	<b>Experimente zum Nachweis der Expression der sigtorA-mutB-Genfusion und des korrespondierenden Genproduktes</b>	<b>83</b>
3.4.1	Expression von sigtorA-mutB in B <sub>12</sub> -produzierenden Enterobakterien	87
3.4.1.1	Expression in <i>C. freundii</i>	88
3.4.1.2	Expression in <i>E. blattae</i>	90
<b>3.5</b>	<b>Experimente zur Lokalisation des Hybridproteins sigTorA-MutB im Periplasma</b>	<b>91</b>
3.5.1	Umklonierung von sigtorA-mutB in den Vektor pASK-IBA3	92
3.5.2	Translokation von sigTorA-MutB in B <sub>12</sub> -produzierenden Enterobakterien	94
<b>3.6</b>	<b>Studien zum Nachweis der Cotranslokation von B<sub>12</sub> und MutB</b>	<b>97</b>
3.6.1	Abhängigkeit der Corrinoïdproduktion von verschiedenen <i>E. blattae</i> -Stämmen in An- und Abwesenheit von heterolog produzierter Methylmalonyl-CoA-Mutase	97
3.6.2	Corrinoïdnachweis im Periplasma verschiedener B <sub>12</sub> -Produzenten	100



---

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>102</b>
4.1	Transport von B <sub>12</sub> über Membranen	102
4.2	Coenzym B <sub>12</sub> -abhängige und Cobalamin-bindende Proteine	103
4.3	Signalsequenz-abhängiger Proteintransport ins Periplasma	108
4.4	Einfluss der Produktion und des Exports der sigTorA-Fusionsproteine auf die Coenzym B <sub>12</sub> -Synthese	117
4.5	Ausblick:	120
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>138</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
Ap <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
bidest.	Zweifach destilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C-	Carboxy
C.	<i>Citrobacter</i>
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
Cm	Chloramphenicol
d	Küvettschichtdicke
Da	Dalton
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
dest.	destilliert
DH	Dehydrogenase
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E.	<i>Escherichia</i>
E	Extinktion
ΔE	Extinktionsänderung
ε	Extinktionskoeffizient
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alteri (und andere)
Fa.	Firma
g	Erdbeschleunigung, Gramm
h	Stunde
Hrsg.	Herausgeber
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
λ	Bakteriophage Lambda
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m	Milli (10 <sup>-3</sup> ), Meter
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
min	Minute
μg	Microgramm
μl	Mikroliter
mg	Milligramm

ml	Milliliter
mM	Millimolar
$\mu$ M	Mikromolar
mol	$6.023 \times 10^{23}$
N-	Amino-
NAD(P) <sup>+</sup>	Nicotinadenindinukleotid(phosphat), oxidiert
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
$\Omega$	Omega
%	Prozent
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Pfu	„plaque forming unit“ (Plaque bildende Einheit)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäuren
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.	<i>Salmonella</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SL	Spurenelementelösung
sp.	Species
t	Zeit
T <sub>4</sub> , T <sub>7</sub>	Bakteriophagen der T-Serie
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
v	Probenvolumen
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

### Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamin	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Threonin
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## 1 Einleitung

Vitamin B<sub>12</sub> ist eine rote wasserlösliche Substanz, die erstmals 1926 von MINOT und MURPHY (1926) als sogenannter Extrinsic Faktor in der Leber des Menschen beschrieben wurde. Erst 20 Jahre später gelang es RICKES *et al* (1948) und parallel SMITH *et al* (1948) das Vitamin zu isolieren, dessen gesamter Aufbau durch die Röntgenstrukturanalyse von HODGKIN *et al.* (1955) aufgeklärt wurde. Vitamin B<sub>12</sub> hat eine Porphyrin-ähnliche Grundstruktur, deren Kernstück aus vier miteinander verknüpften Pyrrol-Ringen mit Cobalt als Zentral-Atom besteht. Zwei dieser Ringe sind nicht wie bei den Porphyrinen üblich über eine Kohlenstoff-Wasserstoff-Brücke, sondern direkt miteinander verbunden. Dies unterscheidet den „Corrinring“ des Vitamin B<sub>12</sub> vom „Porphyrinring“ des Hämoglobins und des Chlorophylls (ZAGALAK, 1982). Neben dem zentralen Ring ist außerdem ein unterer axialer Ligand, eine sogenannte Nukleotid-Schleife, und ein oberer axialer Ligand, ein Cyanid, an der Bildung des Vitamins beteiligt. Vitamin B<sub>12</sub> kann nur durch Austausch des Cyanids gegen einen anderen Liganden seine biologische Funktion ausüben. Dabei ist entweder eine Methylgruppe (Methylcobalamin) oder eine 5-Deoxyadenosyl-Gruppe (Adenosylcobalamin) anstelle des Cyanids an das Cobaltatom gebunden (siehe Abbildung 1).

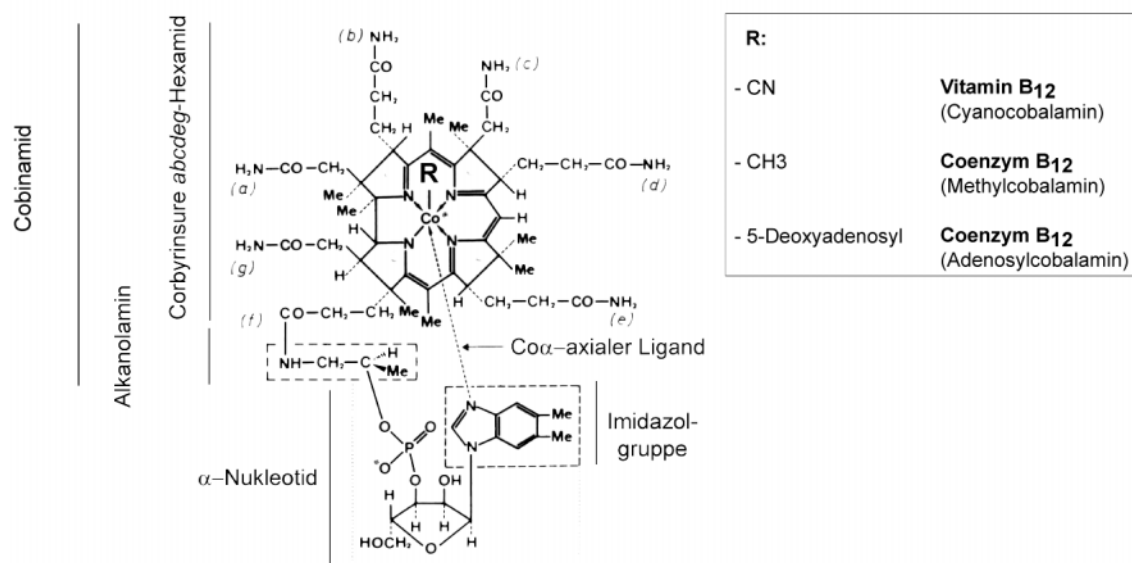


Abbildung 1: Struktur des Cobalamins aus ZAGALAK (1982)

Nach der Aufnahme des Vitamins und seiner Umwandlung zum Coenzym übernimmt es nicht nur in Mikroorganismen, sondern auch in tierischen Zellen wichtige Funktionen. Im Menschen beeinflusst Coenzym B<sub>12</sub> sowohl das Zellwachstum, als auch die Replikation. Adenosylcobalamin wird für die Umsetzung von L-Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA benötigt, was eine wichtige Reaktion beim Abbau von bestimmten Aminosäuren sowie beim Fettstoffwechsel spielt. Methylcobalamin ist an der Synthese von Methionin beteiligt, indem es eine Methylgruppe vom Methyltetrahydrofolat (Folsäure) auf Homocystein überträgt. Dadurch wird Tetrahydrofolat regeneriert, welches für die DNA-Synthese notwendig ist. Wenn das Blutserum vorwiegend Methyltetrahydrofolat enthält, kann bei einem B<sub>12</sub>-Mangel kein Tetrahydrofolat mehr regeneriert werden. Dies führt letztlich zu einer defekten DNA-Synthese und zur megaloblastären (perniziösen) Anämie. Heutzutage liegt ein Vitamin B<sub>12</sub>-Defizit selten an einer zu geringen Zufuhr des Vitamins über die Nahrung, sondern eher an einer unzureichenden Adsorption. Der Intrinsic Faktor (IF) ist eines der drei löslichen Proteine, die an der Aufnahme und dem Transport von B<sub>12</sub> im Menschen beteiligt sind. (BALLAL *et al.*, 1997; NEXØ, 1998; ZAGALAK 1982; MARTENS *et al.*, 2002; KRÄUTLER *et al* 1998).

Coenzym B<sub>12</sub> wird in der Natur ausschließlich von einigen Mikroorganismen wie z. B. *Citrobacter freundii*, *Escherichia blattae*, *Propionibacterium shermanii* und *Salmonella typhimurium de novo* gebildet. Dabei lassen sich grob zwei verschiedene Synthesewege unterscheiden. Während *Pseudomonas denitrificans* B<sub>12</sub> über den aeroben Zweig bildet, verläuft sie Synthese bei *Citrobacter freundii* und *Escherichia blattae* nur unter Ausschluss von Sauerstoff. (ROTH *et al.*, 1996). Etwa 30 enzymkatalysierte Reaktionen werden für die komplette *de novo* Synthese benötigt. B<sub>12</sub> auxotrophe Mikroorganismen, die zu keiner B<sub>12</sub>-Produktion befähigt sind, müssen es wie auch Menschen und Tiere aus dem umgebenden Medium aufnehmen. Die täglich benötigte Menge für den Menschen liegt bei 1-2 µg (RAUX *et al.*, 2000). Bakterien haben einen geringeren Bedarf an B<sub>12</sub>.

Weltweit werden mehr als 10 t B<sub>12</sub> pro Jahr produziert, wobei es wirtschaftlich z. B. als Vitaminpräparat und Kontaktlinsenpflegemittel eingesetzt wird. Die industrielle Herstellung über einen chemischen Weg ist dabei zu teuer und unrentabel, da die äußerst komplizierte Synthese ungefähr 70 verschiedene Reaktionsschritte beinhaltet. Das B<sub>12</sub> wird deshalb nur durch biosynthetische Fermentationsprozesse mit Hilfe von

genetisch optimierten Mikroorganismen produziert und anschließend durch Cyanolyse aus den Zellen gewonnen (MARTENS *et al.*, 2002). Auf diesem Wege fallen große Menge an Biomasse an.

Ein natürliches System für den Export von B<sub>12</sub> aus einer Bakterienzelle ist bislang nicht beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein solches Transportsystem entwickelt werden. Wie bei der B<sub>12</sub>-Aufnahme in die Zelle sollte das B<sub>12</sub> beim Export ebenfalls an ein B<sub>12</sub>-bindendes Protein gekoppelt werden, um anschließend zusammen mit diesem aus der Bakterienzelle transportiert zu werden. Als Bindeproteine wurden der menschliche Intrinsic Faktor und die B<sub>12</sub>-bindende Untereinheit der Methylmalonyl-CoA-Mutase (MutB) aus *Propionibacterium shermanii* eingesetzt. Für den Transport über die Cytoplasmamembran konnte der Signalsequenz-abhängige Tat (twin arginine translocation)-Transportweg genutzt werden, der native Enzyme mit gebundenem Cofaktor wie z. B. die Trimethylamin-N-Oxid-Reduktase (TorA) aus *Escherichia coli* exportiert. Für die Konstruktion des B<sub>12</sub>-Exporters wurde die Tat-Signalsequenz von TorA mit dem B<sub>12</sub>-bindenden IF bzw. MutB fusioniert. Anschließend sollten die Hybridproteine heterolog in B<sub>12</sub>-produzierenden Mikroorganismen gebildet werden mit dem Ziel, B<sub>12</sub> ins Periplasma der Zellen zu transportieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen und Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgelistet. In Tabelle 2 sind die verwendeten Klonierungsvektoren und rekombinanten Plasmide zusammengefaßt. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die verwendeten PCR-Oligonukleotide.

**Tabelle 1: Organismen**

Stamm	relevanter Geno-/ Phänotyp <sup>a</sup>	Referenz / Herkunft
<i>Citrobacter freundii</i>	Wildtyp	DSM 30040
<i>Escherichia blattae</i>	Wildtyp	DSM 4261
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdF</i> , <i>gal</i> ( $\lambda$ clts857 <i>ind1</i> Sam7 <i>nin5</i> <i>lacUV5-T7 gene1</i> ), <i>ompT<sup>r</sup></i> , <i>lon<sup>r</sup></i>	STUDIER & MOFFAT, 1986
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-</i> , <i>relA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ -, $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ), [F <sup>r</sup> <i>traD36 proAB lacI<sup>a</sup> lacZ</i> $\Delta$ M15]	YANISCH-PERRON et al., 1985
<i>Escherichia coli</i>	Corrinoid-abhängige Mutante	DSM 4261
<i>Salmonella typhimurium</i> TA 100	<i>S. typhimurium his-</i> , pKM 101 (Amp <sup>R</sup> )	HELLWIG (Universität Göttingen)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Wildtyp	DSM 4902

**Tabelle 2: Vektoren und rekombinante Plasmide**

Plasmid	Größe (kb)	relevante Merkmale	Referenz/Herkunft
pASK-IBA3	3,2	Amp <sup>r</sup>	IBA, Göttingen
pBAD-GFP <sub>uv</sub>	5,3	Amp <sup>r</sup>	AG BRAUS, Göttingen
pBluescript <sup>®</sup> S K <sup>+</sup> (pSK+)	3,0	Apr, <i>lacPOZ</i> <sup>c</sup>	STRATAGENE, San Diego, USA
pER1	4,8	Tet <sup>r</sup> , <i>sigtorA</i>	DANIEL, persönliche Mitteilung
pET20b(+)	3,7	Amp <sup>r</sup> , <i>lacI</i> , T7-lac-Promotor, <i>pelB</i> , His <sub>6</sub> -Tag, Signal-Peptidase	Fa. CALBIOCHEM- NOVABIOCHEM GmbH, Schwalbach
pET20b(+)	3,7	Amp <sup>r</sup> , <i>lacI</i> , T7-lac-Promotor, <i>pelB</i> , His <sub>6</sub> -Tag, Signal-Peptidase	Fa. CALBIOCHEM- NOVABIOCHEM GmbH, Schwalbach
pHIF	4,1	pBluescriptIIKS(-), IF cDNA Sequenz	ARNOLD (Ludwig Maximilian Universität)
pMB5	6,7	Tet <sup>r</sup>	BOLM, 2000
pMEX2	6,3	Amp <sup>r</sup> , <i>mutA</i> , <i>mutB</i> , pT7-7	LEADLAY
pMPM-A4Ω	6,5	Amp <sup>r</sup>	MAYER, 1995
pMPM-K4Ω	6,4	Kan <sup>r</sup> , <i>Spc</i> , <i>araC</i> , Ω-interposon, <i>rrnBTer</i> , <i>rrfB</i> , ParaBAD, pMB1 <i>ori</i>	MAYER, 1995
pMPM-T4Ω	6,8	Tet <sup>r</sup> , <i>Spc</i> , <i>araC</i> , Ω-interposon, <i>rrnBTer</i> , <i>rrfB</i> , ParaBAD, pMB1 <i>ori</i>	MAYER, 1995
pTM1	5,9	Tet <sup>r</sup>	diese Arbeit
pTM2	6,7	Km <sup>r</sup>	diese Arbeit
pTM3	6,7	Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pTM4	4,7	Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pTM5	6,7	Amp <sup>r</sup> , siehe pTM3 + zusätzlich eingeführte <i>Clal</i> - Schnittstelle an Position 2365 des <i>mutB</i> -Gens	diese Arbeit
pTM6	7,3	Amp <sup>r</sup> siehe pTM3 + zusätzlich eingeführtes <i>gfp</i> -Gen an Position 2365 des <i>mutB</i> -Gens	diese Arbeit
pTM7	5,9	Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit
pTM8	5,4	Amp <sup>r</sup>	diese Arbeit



Tabelle 3: Oligonukleotide

Bezeichnung	Bemerkung/Schnittstelle
Sig1	5'-GGG <b>GAATTC</b> ACCATGAACAATAACGATCTCTTTCAGG CATCACGTCGGCG-3' Klonierung <i>sigTorA</i> in pMPM-T4Ω/ <i>EcoRI</i>
Sig2r	5'-TAAGCCGCCGAGTTGTGCCAGAAAACGCCGACGTGAT GCCTGAAAGAGAT-3' Klonierung <i>sigTorA</i> in pMPM-T4Ω
Sig3	5'-TTTTCTGGCACAACCTCGGCGGCTTAACCGTCGCCGGG ATGCTGGGGCCGT-3' Klonierung <i>sigTorA</i> in pMPM-T4Ω
Sig4r	5'-CCGCAGTCGCACGTGCGGCGTTAACAATGACGGCCCC AGCATCCCGGCG-3' Klonierung <i>sigTorA</i> in pMPM-T4Ω
Sig5	5'-TTAACGCCGCGACGTGCGACTGCGGCGCAAGCGGCGAC TGACGCTGTCTA-3' Klonierung <i>sigTorA</i> in pMPM-T4Ω
Sig6r	5'-CATGGT <b>AAGCTT</b> ATCCCCGAAGCGTTAGACAGCGTCAGTCGCCG CTTGCG-3' Klonierung <i>sigTorA</i> in pMPM-T4Ω/ <i>HindIII</i>
IFMH5'	5'-GATGTCTAATGTATAG <b>GACAATGTC</b> AGTACCCAGACCCAG AGTTCATGCTCCGTTCCCTCA-3' Klonierung des <i>if</i> in pER1/ <i>Tth111I</i>
IFMH3'	5'-GCGCGG <b>AAGCTT</b> ATTAATGGTGATGGTGATGGTGACT GTGTGAQAATTGGCTGTGATGT-3' Klonierung des <i>if</i> in pER1/ <i>HindIII</i>
IF/ <i>EcoRI</i>	5'-CGT <b>GAATTC</b> CAGTACCCAGACCCAGAGTTCATGC-3' Klonierung von <i>if</i> in pET20b/ <i>EcoRI</i>
IF/ <i>HindIII</i> r	5'- GCGG <b>AAGCTT</b> GACTGTGAAATTGGCTGTGATGT-3' Klonierung von <i>if</i> in pET20b/ <i>HindIII</i>
torA5'	5'-GCG <b>TCTAGA</b> gAACAATAACGATCTCTTTCAGGCATCACGTCGGCG TTTTCTGGCACA-3' Klonierung von <i>sigTorA</i> und <i>mutB</i> in pMPM-T4Ω/ <i>XbaI</i>

## Fortsetzung Tabelle 3

Bezeichnung	Bemerkung/Schnittstelle
torA3'r	5'- TCAACTGAATCAAAACGGGGCAGAGTGCTAGTCGCCGCTTGCGC CGCAGTCGCACGTC-3' Klonierung von sig <i>TorA</i> und <i>mutB</i> in pMPM-T4Ω
f-mutB/GFP-ApaI	5'- CGT <u>GGGCCCG</u> GCTGTTCCA-3' Klonierung <i>mutB</i> und <i>gfp</i> in pMPM-A4Ω/ <i>ClaI</i>
r-mutB/GFP-ClaI	5'- CTGAT <u>TCGAT</u> ATGGTGATGGTGATGGTGGG-3' Klonierung <i>mutB</i> und <i>gfp</i> in pMPM-A4Ω/ <i>ApaI</i>
f-GFPuv-ClaI	5'-GCG <u>ATCGAT</u> ATGGCTAGCAAAGGAGAAGAA-3' Klonierung <i>mutB</i> und <i>gfp</i> in pMPM-A4Ω/ <i>ClaI</i>
r-GFPuv-ClaI	5'-CGC <u>ATCGATT</u> CATTATTTGTAGAGCTCATC-3' Klonierung <i>mutB</i> und <i>gfp</i> in pMPM-A4Ω/ <i>ClaI</i>
f-mutB/pET-NotI	5'-CT <u>GCGGCCG</u> CATGAGCACTCTGCCCCGTTTTG-3' Klonierung <i>mutB</i> in pET20b/ <i>NotI</i>
r-mutB/pET-NotI	5'-GAGT <u>GCGGCCG</u> CGGCATCGAGCGAAGCCCG-3' Klonierung <i>mutB</i> in pET20b/ <i>NotI</i>
f-IBA3torA-mutB- BsaI	5'-ATGGTAG <u>GGTCTCA</u> AATGAACAATAACGATCTCTTTCAGGCAT-3' Klonierung sig <i>torA</i> und <i>mutB</i> in pASK-IBA3, <i>BsaI</i>
r-IBA3torA-mutB- BsaI	5'-ATGGTAG <u>GGTCTCA</u> GCGCTGGCATCGAGCGAAGCCCGCA-3' Klonierung sig <i>torA</i> und <i>mutB</i> in pASK-IBA3, <i>BsaI</i>

Die Erkennungssequenz des jeweiligen Restriktionsenzym ist in der Oligonukleotidsequenz **fett** gedruckt und unterstrichen dargestellt. Der His<sub>6</sub>-Tag ist grau unterlegt.

## 2.2 Nährmedien

### 2.2.1 Mineralmedium mit Hefeextraktzusatz (AVERHOFF, 1988; modifiziert) für *C. freundii* und *E. blattae*

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,0 g
MgSO <sub>4</sub> · x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
Hefeextrakt	0,2 g
CoCl <sub>2</sub> (50 mM)	85,0 µl
SL-4	1,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	ad 1000 ml

zusätzlich bei anaeroben Medien:

Cystein-HCl	0,2 g/l
-------------	---------

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

Dem Medium wurde Glycerin oder Glucose in einer Konzentration von 100 mM zugesetzt.

#### Spurenelementelösung SL-4 (PFENNIG und LIPPERT, 1966)

EDTA-Na <sub>2</sub>	5,00 g
FeSO <sub>4</sub> · x 7 H <sub>2</sub> O	2,00 g
ZnSO <sub>4</sub> · x 7 H <sub>2</sub> O	0,10 g
MnCl <sub>2</sub> · x 4 H <sub>2</sub> O	0,03 g
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,30 g
CoCl <sub>2</sub> · x 6 H <sub>2</sub> O	0,20 g
CuCl <sub>2</sub> · x 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g
NiCl <sub>2</sub> · x 6 H <sub>2</sub> O	0,02 g
NaMoO <sub>4</sub> · x 2 H <sub>2</sub> O	0,03 g
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde auf 6,7 eingestellt und die Lösung lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

Zusatz von Aminosäuren:

<b>Aminosäuren</b>	<b>Stammlösung [mg/ ml]</b>	<b>Endkonzentration [µg/ ml]</b>
DL-Alanin	50	100
L-Arginine-HCl	11	22
L-Asparagin	10	100
L-Aspartat	10	100
L-Cystein-HCl	11	22
Glycin	50	100
L-Glutaminsäure	10	100
L-Glutamin	20	100
L-Histidin-HCl	11	22
L-Isoleucin	10	20
L-Leucin	10	20
L-Lysin-HCl	44	88
DL-Methionen	10	20
L-Phenylalanin	10 (in 0,001 N NaOH)	20
L-Prolin	15	30
DL-Serin	10	100
DL-Threonin	40	80
L-Tryptophan	4	20
L-Tyrosin	2 (in 0,01 N NaOH)	20
DL-Valin	20	40
Adenin	2 (in 0,03 N NaOH)	40
Thymidin	10	4
Thymin	5	2
Uracil	2	40

Die Stammlösungen, falls nicht anders angegeben, wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> angesetzt, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

**2.2.2 Hefe-Pepton-Medium für *C. freundii* (HOLDEMAN *et al.*, 1977)**

Pepton aus Casein	5,00 g
Trypton	3,00 g
Hefeextrakt	10,0 g
Salzlösung	40,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	ad 1000 ml
pH	7,0

**Salzlösung:**

CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
NaHCO <sub>3</sub>	10,0 g
NaCl	2,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	ad 1000 ml

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

**2.2.3 LB (Luria-Bertani)-Medium (SAMBROOK *et al.*, 1989)**

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	ad 1000 ml

Zur Herstellung von Agarplatten wurde 1,5 % (w/v) Agar zugefügt.

**2.2.4 Lysin-Decarboxylase-Medium (EKLUND und LANKFORD, 1967)**

Pepton	5,00 g
Hefeextrakt	3,00 g
Glucose	1,00 g
L-Lysin	5,00 g
Bromkresolpurpur	0,02 g
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	ad 1000 ml
pH	6,5

### 2.2.5 M9-Minimalmedium (SAMBROOK *et al.*, 1989, modifiziert)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 972 ml
pH	7,4

Für M9-Platten mußten 15 g Agar und Salze getrennt voneinander autoklaviert und erst nach dem Autoklavieren zusammengegeben werden.

Nach dem Autoklavieren wurden folgende Lösungen steril zugesetzt, die durch Autoklavieren oder im Falle der Thiaminlösung durch Sterilfiltration sterilisiert worden waren:

20 % (w/v) Glucoselösung	25 ml
0,1 M CaCl <sub>2</sub>	1 ml
1,0 M MgSO <sub>4</sub>	1 ml
1 mg/ml Thiamin-HCl	1 ml

### 2.2.6 Minimal-Aminosäure-Medium für *E. coli* DSM 4261 (KRZYCKI and ZEIKUS, 1980, modifiziert)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g
MgSO <sub>4</sub> · x 7 H <sub>2</sub> O	0,2 g
Na <sub>2</sub> -Citrat x 2 H <sub>2</sub> O	1,0 g
L-Asparagin	0,8 g
L-Arginin	0,2 g
L-Glutamat	0,2 g
Glycin	0,2 g
L-Tryptophan	0,2 g
L-Prolin	0,2 g
L-Histidin	0,2 g
Vitamin B <sub>12</sub>	40,0 µg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
pH	6,8-7,2

Kurz vor dem Beimpfen wurde dem Medium noch 50 mM Glucose zugefügt.

### 2.2.7 Mineralagar für *E. coli* DSM 4261 (KRZYCKI and ZEIKUS, 1980, modifiziert)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
Na <sub>2</sub> -Citrat x 2H <sub>2</sub> O	3,0 g
Agar (Oxid Agar Bacteriological No.1)	15,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	ad 1000 ml
pH	6,8-7,2

Nach dem Autoklavieren wurde der Agar unter ständigem Rühren auf 50-60 °C abgekühlt und 0,2 g/l Triphenyltetrazoliumchlorid (sterilfiltriert), 50 mM Glucose (autoklaviert) und *E. coli* DSM 4261 (siehe Tabelle 1) dazugegeben.

### 2.2.8 SOB-Medium (HANAHAN *et al.*, 1983)

Trypton	2,0 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCL	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM

Die Magnesiumsalze wurden aus getrennt autoklavierten, jeweils 1-molaren Stammlösungen zugegeben.

### 2.2.9 Synthetisches Medium für *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (SEIFERT, pers. Mitteilung)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,2 g
Na-Lactat	10,0 g
Na-Dithionit	0,1 g
K-Pantothenat	40,0 mg
Hefeextrakt	4,0 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	40,0 mg
CoSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	12,0 mg
Glucose	10,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	ad 1000 ml
pH	6,8

Die Glucose, MgCl<sub>2</sub> und FeSO<sub>4</sub> wurden getrennt autoklaviert und anschließend beigefügt.

## 2.3 Pufferlösungen

### 2.3.1 Kaliumphosphat-Puffer

0,1 M:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 4,0	13,6 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O, pH 9,0	22,8 g
H <sub>2</sub> O <sub>bide</sub> st	ad 1000 ml
pH	7,0



**2.3.2 SSC-Puffer (10-fach)**SSC-Puffer:

NaCl	1,5 M
Na <sub>3</sub> -Citrat	0,15 M

**2.3.3 TBS-Puffer (10-fach)**

NaCl	1,5 M
Tris-HCl	0,1 M
pH	7,5

**2.3.4 TBST-Puffer (5-fach)**

NaCl	1,5 M
Tris-HCl	0,1 M
Tween-20	0,25 % (v/v)
pH	7,5

**2.4 Feste Medien**

Zur Herstellung fester Medien wurde dem Medium 1,5 % Agar zugesetzt.

**2.4.1 Medienzusätze**

Antibiotika-Stammlösungen sowie IPTG und X-Gal wurden dem autoklavierten und auf mindestens 50 °C abgekühlten Medium zugesetzt.

**Tabelle 4: Medienzusätze**

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Anhydrotetracyclin	2 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	0,1 µl/ml
Ampicillin	100 mg/ml in 50% Ethanol	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml in Ethanol (96 % [v/v])	20 µg/ml
Kanamycin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	70 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	10 µg/ml
IPTG	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	40 µg/ml
X-Gal	40 mg/ml in N,N-Dimethylformamid	40 µg/ml

Die Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

## **2.5 Zellanzucht**

### **2.5.1 Aerobe Anzucht**

Die areobe Anzucht erfolgte in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben. Die Kulturen wurden zur Inkubation wahlweise bei 30 °C oder 37 °C geschüttelt. Angeimpft wurde 1-5 %ig. Zur Überprüfung des Wachstums der Flüssigkulturen wurden regelmäßig Proben entnommen. Die Zunahme der optischen Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch verfolgt (siehe 2.5.3).

### **2.5.2 Anaerobe Anzucht**

Anaerobe Kulturen wurden mit einem 10 %igen (v/v) Inokulum aus einer Stammkultur bzw. Vorkultur beimpft oder aber mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte. Im Falle der Einzelkolonie wurde diese zunächst in 100 µl KP-Puffer (siehe 2.3.1) gelöst. Die Inkubation erfolgt bei 30 °C oder 37 °C. Für Kulturen mit einem Volumen bis zu 10 ml wurden Hungate-Röhrchen (Anaerobe Test Tubes, Hungate Type, 16 × 125 mm, Fa. Bellco Glass Inc., Vineland, New Jersey, USA) und für Anzuchten bis 50 ml 125-ml-Serumflaschen („Hypovials“, Fa. Pierce, Rockford, England) verwendet. Bei einem Kulturvolumen von bis zu 500 ml fanden 1-l-Serumflaschen (Fa. Müller und Krempel AG, Bülach, Schweiz) Verwendung. Für das Überimpfen wurden sterile Einwegspritzen benutzt.

### **2.5.3 Messung der optischen Dichte**

Die optische Dichte von Bakterienkulturen ( $OD_{600}$ ) wurde in 1 ml Plastikkuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 600 nm in einem UV-VIS Spektrophotometer V-550 (Fa. Jasco, Jena) verfolgt. Als Nullwerte diente unbeimpftes Medium. Bei einer  $OD_{600}$  größer 0,3 wurden entsprechende Verdünnungen mit Medium hergestellt.

### **2.5.4 Bestimmung des pH-Wertes**

Der pH-Wert wurde mit einem WTW pH-Meter pH 526 (Fa. WTW GmbH, Weilheim) mit einer Glas-Calomel-Elektrode (Fa. Cahn-Ingold, Frankfurt) bestimmt. Vor den Messungen wurde das Gerät für den entsprechenden Meßbereich mit Eichlösungen (pH 4,0 und pH 7,0 der Fa. Riedel de Haen AG, Hannover) geeicht.

### 2.5.5 Reinheitskontrolle

Die Reinheit der Bakterienkulturen wurden im Phasenkontrastmikroskop (Fa. Carl Zeiss, Oberkochen) anhand ihrer Zellmorphologie überprüft. Zusätzlich war die Koloniemorphologie nach Vereinzlungsausstrichen ein entscheidendes Kriterium für den Nachweis einer Reinkultur.

*C. freundii* wurde zusätzlich in Lysin-Decarboxylase Medium (siehe 2.2.4) angezogen. Dadurch ist eine Unterscheidung zu den meisten anderen Enterobakterien möglich, die ebenfalls anaerob mit Glycerin als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen können. Diese besitzen im Gegensatz zu *C. freundii* eine Lysin-Decarboxylase. Beim aeroben Wachstum können diese Enterobakterien durch die Lysin-Decarboxylase das L-Lysin zum basischen Amin-1,5-Diaminopentan umsetzen. Beim Wachstum in Lysin-Decarboxylase Medium färbt sich das Medium dadurch purpur. Die Anzucht von *C. freundii* in demselben Medium ruft eine Ansäuerung des Mediums hervor, was sich durch eine gelbe Farbreaktion äußert.

### 2.5.6 Stammhaltung

Zur Stammhaltung wurden Kulturen möglichst auf selektiven Nährmedien angezogen. Von diesen Übernachtskulturen wurde 850 µl mit 150 µl sterilem 87 %igem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Zur kurzfristigen Stammhaltung wurden die Stämme in 5 ml Flüssigkulturen oder auf Agarplatten bei -4 °C gelagert und mindestens alle vier Wochen überimpft.

## 2.6 Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA

### 2.6.1 Vorbehandlung von Geräten und Lösungen

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden alle hitzestabilen Geräte und Lösungen für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Hitzeempfindliche Geräte wurden mit 70 % igem Ethanol (v/v) gespült und hitzeempfindliche Lösungen sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm, Schleicher und Schüll, Dassel).

## 2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA

### 2.6.2.1 Schnellpräparation von Plasmid-DNA (HOLMES & QUICKLEY, 1981; RIGGS & McLACHLAN, 1986)

*E. coli* wurde in 5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 30 °C oder 37 °C angezogen, 3 ml des Kulturvolumens in sterile E-Cups überführt, abzentrifugiert (8000 Upm, 3 min; Biofuge 15, Fa. Heraeus Instruments GmbH, Osterode) und das resultierende Pellet in je 350 µl STET-Puffer und 35 µl Lysozym-Lösung resuspendiert.

#### STET-Puffer:

NaCl	100 mM	5,8 g
Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM	121,0 mg
EDTA (pH 8,0)	1 mM	29,2 mg
Triton X-100	5%	5,0 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		ad 100 ml

#### Lysozym-Lösung:

10 mg Lysozym/ml 10 mM TE-Puffer pH 8,0

Es folgte eine Inkubation des Ansatzes für 50 sec bei 100 °C, an die sich ein weiterer Zentrifugationsschritt (14000 Upm, RT, 10 min) anschloss. Während diesem sedimentierten die Proteine und Zelltrümmer, die daraufhin mit einem sterilen Zahnstocher entfernt werden konnten. Die Plasmid-DNA wurden durch Zugabe von 40 µl Na-Acetat (2,5 M; pH 5,2) und 420 µl Isopropanol zum Überstand sowie fünfminütiger Inkubation bei RT gefällt. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (14000 Upm, 5 min) und ein Waschen des Pellets mit 1 ml eiskaltem 70 %iger (v/v) Ethanol. Nachdem das Pellet getrocknet worden war (10-15 min bei RT) konnte es abschließend in 50 µl TE-Puffer mit RNase (20 µg RNase/ml TE-Puffer) oder in sterilem Wasser aufgenommen werden.

### 2.6.2.2 Schnelle Plasmid-Isolierung aus *E. coli* („Cracking“)

Diese Methode bietet die Möglichkeit zur schnellen Überprüfung von *E. coli*-Transformanten, deren Plasmide durch Agarose-Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Größe charakterisiert werden sollten. Aufgrund des geringen Reinheitsgrades eignen sich die nach diesem Protokoll isolierten Plasmide nicht zur Weiterbearbeitung.

Von einer frisch gewachsenen Nährbodenplatte wurde eine Kolonie (Durchmesser mindestens 1 mm) mit einer sterilen gelben Pipettenspitze abgenommen und in 50 µl 10 mM EDTA pH 8,0 resuspendiert. Ein geringer Teil dieser Resuspensionslösung

wurde zur erneuten Anzucht auf eine Selektivplatte gegeben, der Rest mit 25 µl frisch angesetztem Cracking-Puffer versetzt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Nach Abkühlung des Ansatzes auf Eis wurde 1,5 µl 4 M KCl und 0,5 µl 0,4 %ige (w/v) Bromphenolblaulösung zugesetzt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 15000 rpm, 4 °C). wurden 15-20 µl des Überstandes zur Überprüfung direkt für die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt.

„Cracking-Puffer“:

2 N NaOH	100 µl
10 % SDS	50 µl
Sucrose	200 mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 ml

### 2.6.2.3 „Präparative Plasmidisolierung mit dem Wizard Purification Kit“

Für die Sequenzierung und Klonierung ist ein hoher Reinheitsgrad der verwendeten DNA erforderlich. Der Einsatz des „Wizard DNA-Purification Kits“ für die Isolierung der Plasmid-DNA konnte dies gewährleisten. Die verwendeten Lösungen entstammten dem gekauften Kit.

Zellen einer 3 ml Übernachtskultur wurden in sterile E-Cups überführt, abzentrifugiert (8000 Upm, 8 min; Biofuge 15, Fa. Heraeus Instruments GmbH, Osterode) und das Zellpellet in 200 µl „Cell Resuspension Solution“ aufgenommen. Die Zugabe von 200 µl „Cell Lysis Solution“ und anschließendes Schwenken des Ansatzes bis dieser seine Trübung verlor, bewirkte die Lyse der Zellen. Die Ausfällung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 200 µl „Neutralisation Solution“ und erneutem Umschwenken. Nach Zentrifugation (12000 Upm, 5 min) wurde der Überstand mit 1 ml „DNA Purification Resin“ versetzt, gemischt und auf eine Minisäule gegeben, die anschließend mit 2 ml „Wash Solution“ gewaschen wurde. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl TE-Puffer (pH 8,0; 50 °C) oder sterilem Wasser von der Säule eluiert. Nach einminütiger Inkubation bei RT folgte ein letzter Zentrifugationsschritt (12000 Upm, 20 sec) und die Lagerung der DNA bei 4 °C oder -20 °C.

## 2.6.3 Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

### 2.6.3.1 Fällung von DNA

Die Entsalzung oder Konzentrierung von DNA erfolgte durch eine Fällung mit 1 Vol. Ammoniumacetat (7 M), um den Gehalt an monovalenten Kationen zu erhöhen. Durch Zugabe von 2-3 Vol. 96 %igem Ethanol (v/v) oder 0,8 Vol Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und nach Durchmischung entweder für 30 min bei -20 °C (Ethanol-Fällung)

oder für 15 min bei 4 °C (Isopropanol-Fällung) inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (15000 Upm, 4 °C oder RT) zur Sedimentierung der DNA wurde das Pellet zweimal mit eiskaltem 70 %igen Ethanol (v/v) gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> oder TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

### 2.6.3.2 Mikrodialyse von Nukleinsäuren

Für einige Methoden (z.B. Verdau mit Restriktionsenzymen, Ligationsansätze) führte die Entfernung von störenden niedermolekularen Substanzen wie z.B. Salzen aus DNA-Lösungen zur Erzielung besserer Ergebnisse. Hierfür wurden vorsichtig 20-50 µl der DNA-Lösung auf sterile Membranfilter (Porengröße 0,025 µm, Fa. Millipore, Eschborn) pipettiert und gegen steriles Wasser dialysiert. Die Membranfilter waren zuvor mit ihrer glänzenden Seite nach oben auf die Wasseroberfläche gelegt worden. Nach einstündiger Dialyse konnte die DNA-Lösung abgenommen werden.

### 2.6.3.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in 1 ml Quarzküvetten der Schichtdicke von 1 cm bestimmt (Uvikon 810 Photometer, Fa. Kontron AG, Zürich, Schweiz). Die Einstellung des Nullwertes geschah mit derjenigen Lösung, in der auch die DNA aufgenommen worden war.

Folgende Konzentrationen wurden für eine OD<sub>260nm</sub> von 1 angenommen (SAMBROCK et al., 1989):

doppelsträngige DNA 50 µg/ml  
einzelsträngige DNA 40 µg/ml  
Oligonukleotide 31 µg/ml

Zusätzlich wurde noch die Reinheit der DNA durch Absorption bei 280 nm überprüft. Das Verhältnis von OD<sub>260nm</sub> zu OD<sub>280nm</sub> sollte bei reinen DNA-Lösungen 1,8 betragen, geringere Werte weisen auf die Verunreinigungen durch Proteine hin.

Eine weitere Beurteilung der Größe und Reinheit von DNA-Lösungen konnte anhand ihrer Banden im Agarosegel geschehen.

### 2.6.3.4 Reinigung von DNA mit dem „Qiaquick Gelextraction-Kit“

Die Methode beruht auf dem Prinzip der reversiblen Bindung von DNA an eine Silica-Membran in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen. Der Kit kann sowohl zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen, als auch zur Reinigung aus Verdauansätzen eingesetzt werden. Die Aufreinigung erfolgte mit den Lösungen und nach den im Herstellerprotokoll beschriebenen Arbeitsschritten aus dem kommerziell erhältlichen

Kit. Die DNA wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  verwahrt.

### 2.6.3.5 Reinigung von PCR-Produkten

Für die Reinigung von PCR-Produkten kam der „Qiaquick PCR Purification“-Kit (Fa. Qiagen GmbH, Hilden) zum Einsatz. Auch bei dieser Methode wird die DNA bei hohen Salzkonzentrationen reversibel an eine Silica-Membran gebunden. Bei der Durchführung wurde nach Anweisung des Herstellers verfahren. Zur Elution der DNA wurde steriles  $\text{H}_2\text{O}$  genommen und die gereinigte DNA anschließend bei  $4^\circ\text{C}$  oder  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.6.3.6 Gelfiltration von DNA-Lösungen

Die Abtrennung niedermolekularer Bestandteile, wie z.B. einzelner Nukleotide von DNA-Fragmenten, erfolgte durch eine Gelfiltration mit NAP-5-Säulen (Fa. Pharmacia LKB GmbH, Freiburg). Die Säulen wurden mit 10 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  äquilibriert. Danach wurde 0,5 ml DNA-Lösung aufgetragen und mit 1,0 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  eluiert.

## 2.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

### 2.7.1 Agarosegel-Elektrophorese

Elektrophoretische Auftrennungen von DNA-Lösungen erfolgte in Agarosegelen aus 0,8-1,0 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer, der auch als Elektrophoresepuffer diente. Sowohl zur analytischen als auch zur präparativen Auftrennung von DNA-Lösungen wurden horizontale Gelkammern mit Gelen der Maße (Länge x Breite) 11 cm x 6,5 cm oder 14 cm x 12 cm eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben zur Beschwerung mit 0,2 Vol. Stop-Mix versetzt. Die angelegte Spannung betrug 60-80 V und die Laufzeit 1-1,5 h. Zur späteren Größenbestimmung wurden zusätzlich noch 4  $\mu\text{l}$  DNA-Längenstandard aufgetragen (siehe 2.7.3)

50 x TAE-Puffer (SAMBROOK *et al.*, 1989):

Tris	2 M	242 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)	50 mM	100 ml
Essigsäure (konz.)	1 M	57 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$		ad 1000 ml
pH		8,5

Stop-Mix (SAMBROOK *et al.*, 1989):

EDTA	1 mM	19 mg
Harnstoff	7 M	21 g
Saccharose	50 % (w/v)	25 g
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)	50 mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>		ad 50 ml
pH		7,0

Aliquots der autoklavierten Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

**2.7.2 Ethidiumbromid-Färbung und Fotografie von Agarosegelen**

Zur Anfärbung der DNA wurden die Gele nach der Elektrophorese in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml H<sub>2</sub>O) gefärbt und anschließend kurz gewässert. Da sich der interkalierende Farbstoff in die DNA einlagert, können aufgrund seiner Fluoreszenz die DNA-Banden auf einem UV-Transilluminator bei 254 nm (Intas, Fa. Sony, Japan) sichtbar gemacht werden. Zur Auswertung und Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht mit Hilfe einer Polaroidkamera (MP4 Landkamera, Fa. Polaroid, Cambridge, USA) mit Orange- und UV-Filter fotografiert.

Mit einem Thermodrucker (Fa. Intas GmbH, Göttingen), der an die Videokamera gekoppelt ist, konnten die Gele abgebildet werden. Als Filmmaterial wurden Polaroidfilme vom Typ 667 (Fa. Kodak, Stuttgart) bzw. Thermopapier (K75HM, Fa. Mitsubishi, Japan) eingesetzt.

**2.7.3 Größenbestimmung von Nukleinsäuren**

Zur Größenbestimmung von geoelektrophoretisch aufgetrennten linearen DNA-Fragmenten diente der „Ladder-Mix“ (Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot), der als Längenstandard parallel in demselben Agarose-Gel mitaufgetrennt wurde. Durch anschließenden Vergleich der Laufstrecken der DNA-Probe mit der des Längenstandards konnte die Größe der erhaltenen DNA-Fragmente bestimmt werden.

In Tabelle 5 sind die zur Bestimmung herangezogenen Fragmentgrößen angegeben.



**Tabelle 5: DNA-Längenstandard**

Ladder-Mix (kb)
10,0
8,0
6,0
5,0
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,2
1,03
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4

Und drei weitere kleine Fragmente, die meist im Gel nicht sichtbar waren.

Für die Größenbestimmung von RNA in denaturierenden Formaldehydgelen wurde eine RNA-Ladder (Fa. New England Biolabs GmbH, Freiburg) aus *in vitro* synthetisierten Fragmenten mit folgenden Größen (in kb) eingesetzt (Tabelle 6).

**Tabelle 6: RNA-Längenstandard**

Ladder-Mix (kb)
9,0
7,0
5,0
3,0
2,0
1,0
0,5

## 2.8 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

Diese Methode der in vitro-Amplifikation von DNA diente neben der Herstellung von spezifischen DNA-Sonden für Hybridisierungsexperimente auch zur Herstellung spezifischer DNA-Fragmente für Klonierungen.

Als Enzym wurde die TakaraEx-Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, Fa. Takara, Japan, die Amplifikate mit 3'-Überhängen synthetisiert eingesetzt. Um eine möglichst geringe Fehlerrate bei der DNA-Synthese zu gewährleisten, wurden außerdem die Vent-DNA-Polymerase (Fa. New England Biolabs GmbH, Schwalbach), die Pfu-Polymerase und die Tfl-Polymerase (aus *Thermus flavus*, Fa. Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf), die sich durch eine 3'→5'-Korrektur-Aktivität auszeichnen, verwendet. Die eingesetzten Starteroligonukleotide (Primer) hatten eine Länge von 18-60 Basen (Fa. Life Technologies, Eggenstein und Fa. Metabion, Martinsried). Wenn beide eingesetzte Primer in den gleichen Konzentrationen und mit demselben Schmelzpunkt ( $T_m$ ) vorlagen, konnte eine optimale Amplifikation gewährleistet werden. Die Berechnung des Schmelzpunktes erfolgte nach der Formel von CHESTER & MARSHAK (1993):

$$T_m = 69,3 + 0,41 (\% \text{ G+C-Gehalt}) - 650/L$$

% G+C-Gehalt = prozentualer G+C-Gehalt des Primers

L = Länge des Primers

Durch Einsatz hoher Reaktionstemperaturen ist eine Minimierung von unspezifischen Oligonukleotidbindungen und von Synthese-Abbrüchen, die durch Sekundärstrukturen in der DNA-Matrize hervorgerufen werden, möglich. Der Einbau gezielter Fehlpaarungen in den Starteroligonukleotide ermöglichten es, spezifische Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in das PCR-Produkt zu inserieren. Das Volumen der Standard-PCR-Reaktionen betrug 30  $\mu$ l. Ein Verdunstungsschutz war durch den beheizbaren Deckel des PCR-Blockes gegeben. Es wurden folgende Bestandteile auf Eis zusammenpipettiert:

Matrizen-DNA	1,0 $\mu$ g
Primer 1	0,5 $\mu$ M
Primer 2	0,5 $\mu$ M
dNTP-Gemisch (je 2,5 mM)	200 $\mu$ M
10 x Reaktionspuffer	3 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,5-2,5 mM
BSA (20 mg/ml)	0,1 mg/ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 29,5 $\mu$ l
DNA-Polymerase (2U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l

Bei mehreren Ansätzen wurde immer einer Mastermix aus den dNTP's, BSA, Puffer und DNA-Polymerase angesetzt, der anschließend auf die einzelnen PCR-Cups verteilt wurde.

Anschließend wurde der Ansatz durchmischt und die Temperaturzyklen mit einem Primus-Cycler (Fa. MWG AG-Biotech, München) oder einer Gradienten-PCR (Fa. Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst 2,5 min bei 94 °C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der DNA zu gewährleisten. Die Amplifikation erfolgte in 25 bis 30 Zyklen mit folgenden Reaktionsschritten:

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	35 sec
Anlagerung	x °C	45 sec
Polymerisierung	72 °C	y sec

Die Hybridisierung x lag idealerweise 2 bis 3 °C unter der Schmelztemperatur der Oligonukleotide, um eine möglichst hohe Spezifität zu erreichen. Die Polymersisierungszeit y richtete sich nach der verwendeten DNA-Polymerase (siehe Herstellerangaben). Die Spezifität der DNA-Synthese wurde anschließend im Agarosegel überprüft und "Qiaquick PCR Purification"-Kit (siehe 2.6.3.5) gereinigt.

Eine Optimierung der PCR wurde durch Variation einzelner Parameter wie z.B. der Anzahl der zu durchlaufenden Zyklen, der Hybridisierungstemperatur oder auch der Konzentration der Matrizen DNA sowie der Oligonukleotide bewirkt. Desweiteren war es möglich durch Verringerung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und durch Zugabe von die Spezifität zu erhöhen.

## 2.9 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

### 2.9.1 Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen lieferte lineare Fragmente mit definierten Enden. Die DNA-Lösungen wurden mit 0,1 Vol. des vom Enzymhersteller empfohlenen, zehnfach konzentrierten Restriktionspuffers gemischt und mit dem gewünschten Restriktionsenzym versetzt. In analytischen Ansätzen betrug das Gesamtvolumen 20 µl, wobei etwa 1-2 µg DNA und 3-5 U Enzym/µg DNA für 3 h bis über Nacht bei den empfohlenen Temperaturen inkubiert wurden. Präparative Ansätze hatten ein Gesamtvolumen von 100 µl und wurden über

Nacht mit bis zu 15 µg DNA verdaut. Das Restriktionsenzym lag im Endvolumen mindestens 1:10 verdünnt vor, um auszuschließen, daß eine Gesamtkonzentration von über 5 % Glycerin sich störend auf die Spaltungsreaktion auswirken könnte (Aufbewahrung der Enzyme in Puffern mit einem Gehalt von 50 % (v/v) Glycerin). Bei Doppelverdauansätzen wurde ein für beide Enzyme geeigneter Puffer gewählt oder zunächst das Enzym mit den niedrigeren Salzansprüchen eingesetzt und nach 3-15 Stunden Inkubation die Ionenstärke des Verdau-puffers für das zweite Enzym erhöht. Als Alternative bei Produkten der Firma Fermentas konnte ein gemeinsamer Verdau in dem Spezialpuffer „Y-Tango<sup>+</sup>“ durchgeführt werden. Falls eine Inaktivierung der Restriktionsenzyme erforderlich war, schloss sich eine Hitzeinaktivierung für 15 min bei 65 °C an. Zur Überprüfung der Spaltprodukte wurden diese in einem Agarose-Gel aufgetrennt.

### 2.9.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Zur Vermeidung von Selbstligation linearisierter Vektor-DNA konnte diese am 5'-Ende mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert werden (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Die Dephosphorylierung erfolgte direkt im Verdauansatz (GREENE & GUARENTE, 1987), nachdem dieser abgestoppt worden war. Hierzu wurde 1 U Phosphatase pro 10 µg DNA zum Restriktionsansatz gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde erneut 1U Enzym zugegeben und die Inkubation wiederholt. Die Abstopfung erfolgte durch 15-minütige Inkubation bei 65 °C. Für die anschließende Ligation wurde die DNA durch Mikrodialyse (siehe 2.6.3.2) gereinigt.

Bei Vektor-DNA, die mit zwei verschiedenen Enzymen verdaut wurde, entfiel die Dephosphorylierung.

### 2.9.3 Ligierung von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden Phosphodiesterbindungen zwischen doppelsträngigen DNA-Fragmenten, die ein freies 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatende aufweisen, verknüpft.

Ligationen von dephosphorylierter Vektor-DNA mit DNA-Fragmenten wurden in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem in 20 µl Ansätzen durchgeführt. Um die Ligationseffizienz zu erhöhen wurde die Vektor-DNA-Konzentration der verfügbaren Menge an Insert-DNA so angepasst, dass das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA etwa 1:4 betrug.

Vektor-DNA (in H <sub>2</sub> O)	0,2-2 µg
Insert-DNA (in H <sub>2</sub> O)	0,8-8 µg
ATP 10 mM	2 µl
10 x T <sub>4</sub> -Ligase-Puffer	2 µl
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl

Der Ansatz wurde für 1 h bei RT oder über Nacht bei oder 16 °C inkubiert und anschließend direkt zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

Bei „Blunt end“-Ligationen wurden die folgenden Komponenten zusammen für 1 h bei RT inkubiert:

Vektor-DNA	0,2-2 µg
DNA-Fragmente	0,2-3 µg
PEG 50 % (w/v)	2 µl
10 x T <sub>4</sub> -Ligase-Puffer	2 µl
T <sub>4</sub> -DNA-Ligase	4 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 µl

#### 2.9.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die als Sonden für Hybridisierungen eingesetzt werden sollten, wurden mit Hilfe des „Random Primed Labeling Kits“ (Fa. Gibco BRL, Eggenstein) und [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP radioaktiv markiert. Zur Denaturierung wurden 25 bis 50 ng DNA in 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel für 10 min bei 95 °C inkubiert und danach schnell auf Eis abgekühlt. Die folgenden Bestandteile des Reaktionsansatzes wurden dann auf Eis zusammenpipettiert:

denaturierte DNA-Lösung (10 min bei 95 °C, 5 min auf Eis)	25 µl
dCTP, dGTP, dTTP	je 2 µl
Reaktionspuffer	15 µl
denaturierte DNA-Lösung (10 min bei 95 °C, 5 min auf Eis)	3 µl

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Klenow-Fragment (2 U/µl) gestartet und für 1 h bei 25 °C inkubiert. Die DNA-Lösung wurde mit 450 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> versetzt und zur

Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide über eine NAP-5-Säule gelchromatographisch gereinigt.

## 2.10 Übertragung von DNA und Selektion rekombinanter Klone

### 2.10.1 Übertragung von DNA durch Transformation

#### 2.10.1.1 Herstellung kompetenter Zellen (INOUE et al., 1990)

250 ml SOB-Medium wurde mit der Übernacht-Vorkultur von *E. coli* 3 %ig angeimpft und in einem Schüttelwasserbad bis zu einer  $OD_{600nm}$  von ca. 0,6 angezogen. Zur Zellernte wurde die Kultur 10 min in einem Eisbad geschwenkt und in vorgekühlten GSA-Zentrifugenbechern zentrifugiert (10 min, 6000 Upm, 4 °C). Das Pellet wurde vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (Transformationspuffer) resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert unter den oben angegebenen Bedingungen abzentrifugiert. Nach erneuter vorsichtiger Resuspendierung des Pellets in 20 ml TB-Medium erfolgte langsam und unter Schwenken die Zugabe von 1,5 ml DMSO (7 % [v/v] Endkonzentration) und eine 10-minütige Inkubation auf Eis. Aliquots von 200 µl wurden zügig in vorgekühlte E-Cups transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so erhaltenen Zellen konnten ohne Verlust der Kompetenz über mehrere Monate bei -70 °C gelagert werden.

#### Transformationspuffer (TB):

PIPES	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
KCl	250 mM
MnCl <sub>2</sub>	55 mM
pH	6,7

Alle Komponenten mit Ausnahme des Mangansalzes wurden zusammengegeben, der pH-Wert mit KOH auf 6,7 eingestellt, eine Stunde gerührt und nachjustiert. Anschließend wurde MnCl<sub>2</sub> dazugefügt, die Lösung sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

#### 2.10.1.2 Transformation von *E. coli* (INOUE et al., 1990)

Die gemäß 2.10.1.1 hergestellten und in 200 µl Aliquots gelagerten, kompetenten Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des gesamten Ligationsansatzes (20 µl) bzw. 1-2 µl Plasmid-DNA und leichtem Mischen wurde der Ansatz 30-45 min auf Eis inkubiert, für 2 min bei 42 °C hitzegeschockt und nach zweiminütiger

Inkubation auf Eis mit 500 µl LB-Medium versetzt. Daran schloss sich eine Inkubation für ca. 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler. Der gesamte Ansatz wurde in 90-100 µl Aliquots auf entsprechenden Selektivagar ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

### 2.10.1.3 Übertragung von DNA durch Elektroporation (DOWER et al., 1988)

Plasmide können alternativ zu der unter 2.10.1.2 beschriebenen Methode auch durch Elektroporation in die Bakterienzelle transferiert werden. Dabei wird eine hohe Spannung angelegt und hierdurch die Membranen kurzzeitig durchlässig für Plasmid-DNA (FIEDLER & Wirth, 1988) gemacht. Wichtig dabei ist, dass sowohl die Zellen, als auch die verwendete DNA möglichst salzfrei vorliegen.

Der gewünschte *E. coli* Stamm wurde über Nacht in einer 5 ml LB-Vorkultur angezogen, die dann in eine 250 ml Kultur überführt und bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5-1,0 inkubiert wurde. Im Anschluß an eine 15-30-minütige Inkubation auf Eis wurden die Zellen geerntet (5000 x g, 4 °C, 10 min, Sorvall Zentrifuge RC-5B, Fa. Du Pont Instruments, Bad Homburg) und danach zweimal mit jeweils 1 Volumen eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 10 ml einer eiskalten 10 %igen Glycerinlösung sowie ein kurzer Zentrifugationsschritt (7000 x g, 4 °C, 5 min, Sorvall Zentrifuge RC-5B, Fa. Du Pont Instruments, Bad Homburg) und schließlich die Aufnahme des Pellets in 500 µl derselben Lösung. Die Zellen konnten sofort verwendet bzw. in Aliquots von 40 µl bei -70 °C gelagert werden.

Zur Elektroporation wurden pro Ansatz 40 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut, in eine sterile vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,2 cm) überführt und mit 1 bis 5 µl dialysierter Plasmid-DNA (siehe 2.6.3.2) versetzt. Die Elektroporation erfolgte in einem Gene Pulser<sup>TM</sup> (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV, wodurch eine Feldstärke von 12,5 kV/cm und eine Zeitkonstante von 3,5-4,5 msec erreicht wurde. Nach dem Stromimpuls wurde 1 ml LB-Medium dazugegeben, 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Selektivagar ausplattiert.

## 2.11 Übertragung von Nukleinsäuren auf Membranen

### 2.11.1 Herstellung von Filtern für die Kolonihybridisierung (BULUWELA *et al.*, 1989)

Zur Analyse einer großen Anzahl rekombinanter Klone in Hybridisierungsexperimenten (siehe 2.12.1) dienten runde Nylonmembranen mit 8,2 cm Durchmesser (Hybond<sup>TM</sup>-N, Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg).

Je 50-100 Klone wurden auf eine LB-Platte (siehe 2.2.3) mit entsprechendem Antibiotikum übertragen. Nach ca. 20 h Inkubation bei 37 °C wurde die Membran aufgelegt, leicht angedrückt und wieder abgezogen, um so das Zellmaterial auf die Membran zu übertragen. Die Inkubation der Platten erfolgte dann für weitere 20 h bei 37°C. Anschließend wurde die Nylonmembran mit den Impfstreichen nach oben für 5 min auf Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt, das mit 2-fachem SSC-Puffer und 5 % SDS (w/v) getränkt war und dann für 2,5 min bei 600 W im Mikrowellenherd gebacken. Die auf diese Weise für die Hybridisierung vorbereitete Membran wurde vor der Prähybridisierung mit 5-fachem SSC-Puffer und 0,1 % SDS (w/v) 1 h gewaschen.

#### SSC-Puffer (10-fach):

NaCl	1,5 M
Na <sub>3</sub> -Citrat	0,15 M

## 2.12 Hybridisierungsmethoden

Die Hybridisierungen erfolgten in Glasröhrchen (Fa. Ochs, Göttingen) in einem Hybridisierungssofen (Hybaid Mini Hybridization Oven; Fa. Biometra, Göttingen) bei den jeweils angegebenen Temperaturen. Die Membranen wurden mit der beladenen Seite nach innen in die Röhrchen plaziert.

### 2.12.1 DNA-DNA-Hybridisierung

Auf Nylonmembranen fixierte DNA wurde mit radioaktiv markierten DNA-Fragmente (siehe 2.9.4) hybridisiert. Vor der eigentlichen Hybridisierung war eine Prähybridisierung notwendig, um unspezifische Bindungsstellen für die DNA-Sonde auf den Nylonmembranen abzusättigen. Hierzu wurden die Membranen in den Hybridisierungsröhrchen mit 10 ml Prähybridisierungsmix versetzt und 1-4 h im Hybridisierungssofen bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde die radioaktiv-markierte Sonde, die zuvor für 10 min bei 95 °C denaturiert und für 5 min auf Eis gehalten wurde,



zu dem Prähybridisierungsmix gegeben (0,5 ml Sonde/Hybridisierungsröhrchen mit drei Filtern). Die Membranen wurden dann für 12-16 h bei 60 °C inkubiert.

Nach erfolgter Hybridisierung schlossen sich folgende Waschschrirte an:

2 x 10 min in 2-fachem SSC-Puffer (siehe 0) bei RT

2 x 30 min in 2-fachem SSC-Puffer mit 1 % (w/v) SDS bei 42-60 °C

2 x 30 min in 0,1-fachem SSC-Puffer bei RT

#### Prähybridisierungsmix:

Dextransulfat (50 % [w/v])	2 ml
0,5 Tris-HCl	1 ml
5 M NaCl	2 ml
SDS-Lösung (10 % [w/v])	2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 10 ml
pH	7,5

### **2.12.2 Autoradiographie**

Die Autoradiographie erfolgte mit Hilfe von Autoradiographiekassetten (Storage Phosphor Screen GP, Fa. Kodak, Stuttgart) und eines Phosphoimagers (Storm 860, Fa. Molecular Dynamics GmbH, Krefeld). Zur Quantifizierung wurde das Programm Image Quant für Macintosh Version 1.2 (Fa. Molecular Dynamics GmbH, Krefeld) verwendet. Über diese Programm erfolgte ebenfalls die Quantifizierung des B<sub>12</sub>-Bindeproteins MutB.

### **2.13 Sequenzierung von DNA**

Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA (siehe 2.6.2.3 präparative Plasmidisolierung) erfolgte im „Göttinger Genomics Laboratory“ (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) am ABI PRISM 337 DNA-Sequencer. Einige der Sequenzierungen wurden auch von der Fa. MWG Biotech, Ebersberg durchgeführt.

#### **2.13.1 Analyse der Sequenzdaten**

Die Sequenzdaten konnten manuell aus den Kurvenverläufen mit dem Programm ABI Edit View 1.0.1 abgeleitet werden.

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte auf Macintosh Computern (Fa. Apple Computer Inc., Cupertino, USA) mit Hilfe des Programms DNA-Strider (MARCK, 1988). Damit

konnten offene Leserahmen ermittelt und Protein-Sequenzen abgeleitet sowie auf hydrophobe bzw. hydrophile Bereiche untersucht werden. Weitergehende Analysen wurden mit dem „Wisconsin Genetics Computer Group Sequence Analysis Software Package“ (GCG Package, Version 8.0; University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, USA) nach DEVEREUX et al. (1984) durchgeführt. Dazu zählte der im Internet angebotene Service der NCBI, der den Sequenzabgleich durch das Programm „Blast“ mit Daten der PIR-, NBRF-, SWISSPROT-, EMBL- und GENBANK-Datenbanken (PEARSON & LIPMAN, 1988) ermöglichte.

## 2.14 Heterologe Genexpression in *E. coli*, *E. blattae*, *C. freundii* und *S. typhimurium* TA100

### 2.14.1 Heterologe Expression mit dem pMPPM-T4 $\Omega$ / pMPPM-A4 $\Omega$ -System

Die Produktion der Hybridproteine sigTorA-IF und sigTorA-MutB wurde mit den Expressionsvektoren pMPPM-A4 $\Omega$  (Cloning Vector Collection, Department of Microbial Genetics, National Institut of Genetics, Yata, Japan) und pMPPM-T4 $\Omega$  (Cloning Vector Collection, Department of Microbial Genetics, National Institut of Genetics, Yata, Japan) in verschiedenen Stämmen (*E. coli* DH5 $\alpha$ , BL21 (DE3), JM109, KS330, *E. blattae*, *C. freundii* und *S. typhimurium* TA100) durchgeführt.

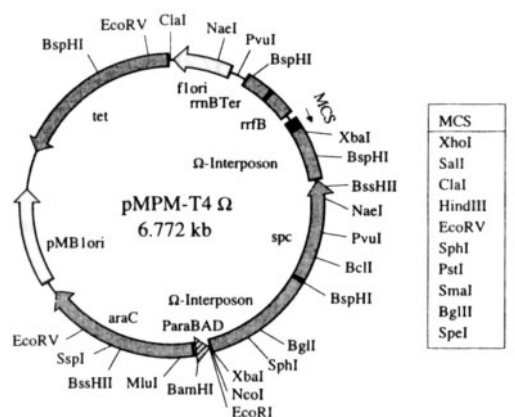
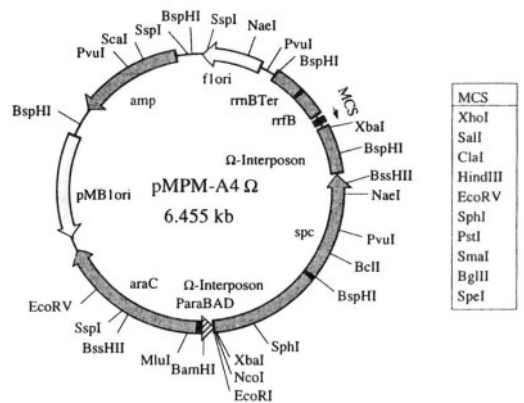


Abbildung 2: Physikalische Karte des Plasmids pMPPM-T4 $\Omega$



**Abbildung 3: Physikalische Karte des Plasmids pMPPM-A4Ω**

#### Aerobe Expression:

Von den geeigneten Transformanten wurde eine Einzelkolonie gepickt und als 5 ml Vorkultur über Nacht bei 37 °C in entsprechendem Selektivmedium angezogen. Eine Hauptkultur von 30 ml, 100 ml oder 500 ml wurde 2-5 %ig angeimpft und bei 30 °C inkubiert. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,3-0,6 wurden die Zellen mit 0,5-1 % Arabinose induziert und mindestens zum Zeitpunkt 0 min und 3 h nach Induktion jeweils 1 ml Proben gezogen bevor sie nach 3 h geerntet wurden.

#### Anaerobe Expression unter $B_{12}$ -produzierenden Bedingungen:

Es wurden je eine Einzelkolonien der Transformanten in 100 µl KP-Puffer (siehe 2.3.1) resuspendiert, eine 5 ml Vorkultur (siehe 2.2.1) mit entsprechendem Selektivmedium damit angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese 5 ml wurden dann in eine weitere Vorkultur von 50 ml überführt und ebenfalls bei 37 °C über Nacht angezogen. Die Anzucht der Hauptkulturen in Mineralmedium mit Glycerin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle (Inokulum 10 %, Kulturvolumen 500 ml) erfolgte bei 23 °C, 30°C oder 37 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von ca. 0,6. Die Zellen wurden mit 0,5-1 % Arabinose induziert und bei den oben angegebenen Temperaturen 8-16 h inkubiert. Während des Versuches wurden Proben mindestens zum Zeitpunkt der Induktion und nach abgeschlossener Induktion genommen. Nach 8-16 h wurde die Kultur geerntet.

Zur Analyse der entnommenen Proben im SDS-Gel wurden diese pelletiert (8000 Upm, 8 min), in 50-100 µl Probenauftragspuffer aufgenommen und je 20 µl für die SDS-PAGE eingesetzt. Durch regelmäßige Messung der optischen Dichte bei 600 nm konnte das Wachstum der Zellen über den ganzen Versuch kontrolliert werden (siehe 2.5.3). Nach 3 h (aerob) bzw. 8-16 h (anaerob) wurde die Kultur geerntet (siehe 2.15.1).

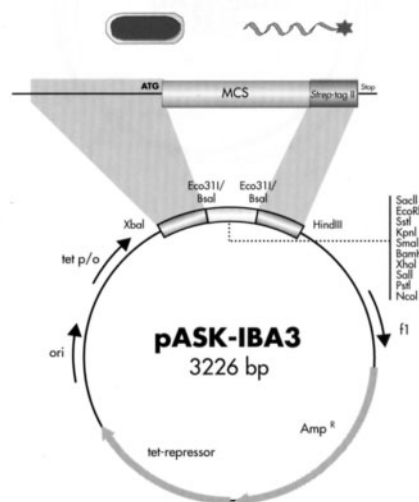
### 2.14.2 Heterologe Expression mit dem pET-System

Um Störungen bei dem Transport des menschlichen Intrinsic Factors ins Periplasma mit dem Tat-System auszuschließen, wurde nur der IF in den Vektor pET20b (Fa. Novagin Inc., Madison, USA) inseriert. Dieser Vektor ist im Besitz der *pelB*-Signalsequenz, die für den Transport des rekombinanten Proteins in das Periplasma verantwortlich ist. Hierbei soll die korrekte Faltung unterstützt und ein proteolytischer Abbau verringert werden. Die Expressionsversuche wurden in *E. coli* BL21(DE3) bei 37 °C durchgeführt. Dieser Stamm enthält den defekten, lysogenen Bakteriophagen DE3 des  $\lambda$ -Phagen. In das *int*-Gen des  $\lambda$ -Phagen wurde das Gen der T7-Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors inseriert. Aufgrund des inaktivierten *int*-Gens benötigt DE3 zur Exzision oder Integration einen Helferphagen (STUDIER *et al.*, 1990). Die Expression der T7-Polymerase lässt sich durch Zugabe von IPTG induzieren. Bei den Plasmiden der pET-Serie handelt es sich um Abkömmlinge des Plasmids pBR322, die als Selektionsmarker das Gen für die  $\beta$ -Lactamase besitzen.

Analog zu dem unter 2.14.1 beschriebenen Vorgehen wurden Einzelkolonien angezogen und in die 100 ml Hauptkultur überführt (LB-Medium, Ampicillin 100  $\mu$ g/ml). Die Induktion erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 mit 0,2 mM IPTG für 3 h. Auch hier wurden während des Wachstums Proben gezogen, um sie auf einem SDS-Gel zu analysieren.

### 2.14.3 Heterologe Expression pASK-IBA-System

Dieses System bietet eine weitere Möglichkeit neben dem His<sub>6</sub>-tag das Zielproteins im Periplasma zu detektieren. Der Vektor pASK-IBA3 (Fa. IBA, Göttingen) weist einen C-terminalen *Strep*-tag II auf. Dieser besteht aus insgesamt acht Aminosäuren (WSHPQFEK), die für gewöhnlich keinen Einfluss auf die Faltung des Proteins haben. Sie müssen nicht entfernt werden, da sie u. a. zu keinen Proteinaggregationen führen. Eine Signalsequenz ist nicht vorhanden.



**Abbildung 4: physikalische Karte des Plasmids pASK-IBA3**

So konnte MutB aus *Propionibacterium shermanii* samt sigTorA Signalsequenz der TMAO-Reduktase in das Plasmid inseriert werden. Expressionsstudien wurden wie unter 2.14.1 beschrieben sowohl aerob als auch anaerob durchgeführt. Die Induktion erfolgte mit 20 µg Anhydrotetracyclin/100 ml Medium. Für die Expression kamen folgende Organismen zum Einsatz:

- *Salmonella typhimurium* TA100
- *E. blattae*

## 2.15 Zellaufschluß und Extrakterstellung

### 2.15.1 Zellernte

Die Zellen des Expressionsversuches wurden bei 4 °C und 6000 Upm (bei anschließender Periplasmapräparation 4000 Upm, 20 min) für 10 min im GSA- oder GS3-Rotor (Sorvall Zentrifuge RC-5B, Fa. Du Pont, Bad Homburg) zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend bei -20 °C eingefroren.

### 2.15.2 Zellaufschluß mit der French Presse

Für die Gewinnung von Rohextrakten wurden die geernteten Zellen aufgetaut und das Pellet in einem angemessenen Volumen von 0,1 M KP-Puffer (siehe 2.3.1) aufgenommen. Mit einer Spatelspitze Lysozym und DNase (Fa. Boehringer, Mannheim) wurde die Suspension für 30 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluß fand in einer vorgekühlte Frenchpresszelle (Fa. SLM Amnico, Urbana, USA) bei einem

Druck von 800 MPa statt. Dieser Vorgang wurde mindestens dreimal wiederholt und die Suspension stellte den Gesamtzellextrakt dar. Zelltrümmer und restliche intakte Zellen wurden abzentrifugiert (8000 Upm, 4 °C, 20 min), der erhaltene Überstand als Rohextrakt bezeichnet und bei -20 °C eingefroren.

### **2.15.3 Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung**

Das Zellpellet wurde in 0,1 M KP-Puffer (siehe 2.3.1) resuspendiert und anschließend mit einer Spatelspitze Lysozym und DNase für 30 min auf Eis inkubiert. Das 2 ml E-Cup mit der Zellsuspension wurde in das Ultraschallgerät (Fa. MSE Baumann, Quickborn) eingespannt und während der gesamten Prozedur im Eisbad gekühlt. Die Ultraschallbehandlung erfolgte für 1-2 min bei einer Amplitude von 60-80 Micron bei einem Zyklus von 0,5 sec bis die Lösung aufklarte. Zwischen den Beschallungen wurde jeweils für 1-2 min pausiert. Alternativ dazu wurde auch ein Ultraschallbad (Sonorex Super 10 P, Bandelin) benutzt und die Proben bei 4 °C 4-5 mal für 1 min beschallt. Die nach der Ultraschallbehandlung Zentrifugation erhaltenen Rohextrakte konnten bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert werden.

### **2.15.4 Cytoplasma- und Membranpräparation**

Um die Membranfraktion zu gewinnen wurde der Rohextrakt hochtourig abzentrifugiert (120000 x g, 4 °C, 1 h, in einer Sorvall OTD-75 Ultrazentrifuge, Fa. Du Pont Bad Homburg) und somit die Cytoplasma- von der Membranfraktion getrennt. Der erhaltene Überstand stellte das Cytoplasma dar und wurde vom Pellet getrennt. Dieses konnte nun in etwa 3 ml 0,1 M KP-Puffer (siehe 2.3.1) resuspendiert, mit einem Homogenisator behandelt und wieder in der Ultrazentrifuge pelletiert werden. Bei der erhaltenen bräunlichen, gelatineartigen Masse handelte es sich um die Membranen, die in ca 1-2 ml Puffer aufgenommen und bei -20 °C eingefroren wurden.

### **2.15.5 Periplasmapräparationen**

#### **2.15.5.1 Periplasmapräparation (SAMBROCK et al., 1989)**

Das eingefrorene Pellet einer 500 ml Kultur wurde zunächst langsam auf Eis aufgetaut, in 20 ml Puffer (30 mM Tris-HCl, 20 % [w/v] Saccharose, pH 8,0) resuspendiert und mit 40 µl EDTA (500 mM, pH 8,0, Endkonzentration 1 mM) versetzt. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei RT auf dem Schüttler. Die Suspension wurde abzentrifugiert (8000 Upm, 4 °C, 10 min), das Pellet in 20 ml eiskaltem 5 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und für 10 min im Eisbad gerührt. Der vorangegangene Zentrifugationsschritt wurde

wiederholt und damit die Protoplasten pelletiert. Der Überstand enthielt die Periplasmafraktion und wurde bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.15.5.2 Periplasmapräparation (WEIß, pers. Mitteilung)**

Das aufgetaute Zellpellet eines Induktionsexperiments wurde in 100 ml (80 g/ g Zelle, Naßgewicht) eiskaltem Puffer aufgenommen (200 mM Tris-HCl, 20 % [w/v] Saccharose, 100 mM EDTA, pH 9,0) und für 20 min bei 4 °C geschüttelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (9000 Upm, 4 °C, 12 min) nachdem das Pellet dann in 100 ml 10 mM Tris-HCl pH 8,8 resuspendiert und erneut für 20 min bei 4 °C geschüttelt wurde. Mit den Proteinen im Überstand wurde nach wiederholter Zentrifugation (siehe oben) eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. 100-130 g Ammoniumsulfat wurde unter ständigem Rühren bei 4 °C langsam zu der Proteinlösung gegeben und anschließend abzentrifugiert (12000 Upm, 4 °C, 20 min). Das Proteinpellet wurde in 10 ml 0,1 M KP-Puffer (siehe 2.3.1) resuspendiert und ungelöstes Material durch einen abschließenden Zentrifugationsschritt (15000 Upm, 4 °C, 10 min) entfernt.

#### **2.15.5.3 Periplasmapräparation (HOSHINO & KAGEYAMA, 1980)**

Bei dieser Methode wird die äußere Membran zusätzlich durch Temperaturschock durchlässig gemacht und so die periplasmatischen Proteine freigesetzt. Die aufgetauten Zellen wurden in 50 mM Tris-HCl, 200 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7,3 resuspendiert (ca. 0,2 g Zellen/ ml Endkonzentration) und für 10 min bei 30 °C inkubiert. Daran schloss sich eine Inkubation auf Eis/NaCl an. Dieser Temperaturschock wurde noch einmal wiederholt und die Suspension anschließend abzentrifugiert (8000 Upm, 4 °C, 10 min). Um restliche Zellen und Trümmer zu entfernen wurde der proteinhaltige Überstand noch mal zentrifugiert (20000 Upm, 4 °C, 10 min).

#### **2.15.5.4 Periplasmapräparation ( ARMBRECHT, pers. Mitteilung, modif.)**

1 g Zellen (Nassgewicht) des zuvor aufgetauten Pellets wurden in 8 ml GET-Puffer resuspendiert, mit 1 mg/ml (Endkonzentration) frischem Lysozym versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 8 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und ein weiterer Inkubationsschritt für 90 min bei RT. Nach der Zentrifugation (11000 x g, 10 min) befindet sich die periplasmatischen Fraktion im Überstand.

#### GET-Puffer:

Glukose	500 mM
EDTA	1 mM
Tris-HCl	200 mM
pH	7,4

### 2.15.5.5 Periplasmapräparation (IBA Manual, modif.)

Das aufgetaute Pellet eines 500 ml Induktionsexperiments wurde in 2 ml Puffer P resuspendiert und in 2 ml E-Cups für 20-30 min auf Eis geschüttelt. Hierbei wurde die äußere Membran durchlässig gemacht, um lösliche periplasmatische Komponenten freizulassen. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt (14000 Upm, 4 °C, 5 min), um Spheroplasten zu entfernen. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet erneut in demselben Volumen Puffer P aufgenommen und wie oben für 20-30 min auf Eis geschüttelt. Es folgte eine abschließende Zentrifugation nach der der Überstand vorsichtig abgenommen und wie der erste proteinhaltige bei -20 °C eingefroren wurde.

#### Puffer P:

Tris-HCl	100 mM
Saccharose	20 % (w/v)
EDTA	100 mM
pH	8,0

### 2.16 Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD (1976)

Diese Methode der Konzentrationsbestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffes "Coomassie-Brillant-Blue" an Proteine. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm nach 585 nm. Die Zunahme der Absorption bei 585 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

20 µl Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte in 1 ml Plastikkuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei 585 nm gegen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> mit Bradford-Reagenz als Leerwert. (UV VIS V-550 Spektralphotometer (Fa. Jasco, Jena). Bei der Proteinbestimmung von ganzen Zellen wurden diese vor der Zugabe des Bradford-Reagenzes mit 50 µl 1 N NaOH versetzt. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin in einem Bereich von 0-20 µg Protein aufgenommen.

#### Bradford-Reagenz:

Serva Blau G-250	100 mg
Ethanol (96 % [v/v])	50 ml
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85 % [v/v])	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml



Serva Blau G-250 wurde zunächst in Ethanol gelöst, bevor nacheinander die Phosphorsäure und das Wasser zugegeben wurden. Die rotbraune Lösung wurde filtriert und lichtgeschützt bei RT gelagert.

## **2.17 Einengung von Proteinlösungen**

### **2.17.1 Einengung mit Polyethylenglycol**

Diese Methode der Einengung von Proteinlösungen erfolgte mittels Polyethylenglykol (PEG) 20000, einem Feststoff mit äußerst hydrophilem Charakter. Dazu wurde die Proteinprobe in einen vorbereiteten Dialyseschlauch pipettiert, mit Dialyseklappen luftblasenfrei verschlossen und in ein Gefäß mit PEG überführt. Wenn nötig, wurde das Polyethylenglykol von Zeit zu Zeit erneuert. Nach dem Einengungsprozess wurde der Dialyseschlauch vorsichtig mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  abgewaschen und die Proteinprobe dann in ein neues Gefäß überführt.

### **2.17.2 Einengung mit Centrisart-Röhrchen**

Die Einengung geringvolumiger Proteinlösungen (bis 2,5 ml) lässt sich mit Hilfe von Centrisart-Röhrchen (Fa. Sartorius, Göttingen) durchführen. Hierzu wurden die Proben in das schmalere Innenröhrchen, das an einem Ende mit einer Membran mit einer Ausschlussgrenze von 20 kDa ausgestattet war, gefüllt. Das so beschickte Röhrchen wurde dann in das äußere, breitere Röhrchen überführt und solange bei  $3000 \times g$  bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, bis die Lösung ca. 10fach auf  $200 \mu\text{l}$  aufkonzentriert war. Nach dem Zentrifugationsschritt befand sich das Konzentrat im inneren Röhrchen während Proteine, die kleiner als 20 kDa waren, mittels der Zentrifugalkraft durch die Membran in das äußere Röhrchen diffundierten. Die Lagerung des Konzentrats erfolgte bei  $-70^\circ\text{C}$ . Zur Reinigung wurden die Außenröhrchen mit einer 0,5 M NaOH-Lösung behandelt und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gespült. Zum Schutz der Membran wurden die Innenröhrchen nur mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gesäubert.

### 2.17.3 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse diente zum Entsalzen und zum Pufferwechsel von Proteinlösungen. Die verwendeten Visking-Dialyseschläuche (Fa. Serva, Heidelberg) wurden zur Vorbereitung nacheinander in folgenden Lösungen für jeweils 10 min gekocht:

- 2 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>
- 2 mM EDTA
- 2 x in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Abschließend wurden die Schläuche 1 x in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Die Dialyse wurde unter ständigem Rühren für mehrere Stunden bei 4 °C gegen das 1000-2000-fache Volumen durchgeführt.

## 2.18 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

### 2.18.1 SDS-PAGE nach SCHÄGGER und VON JAGOW (1987)

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen wurden in Minigel-Elektrophorese-Kammern (Fa. Bio-Rad, München) mit 8,5 x 8,0 x 0,1 cm Glasplatten durchgeführt.

Trenn- und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung (Menge für 2 Gele):

		12,5 %ig	15 %ig
<u>Trenngel:</u>	Gelpuffer	3 ml	3 ml
	Acrylamidlösung	2,25 ml	2,7 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,75 ml	3,3 ml
	APS-Lösung	45 µl	45 µl
	TEMED	4,5 µl	4,5 µl
<u>Sammelgel:</u>	Gelpuffer	1,13 ml	1,13 ml
	Acrylamidlösung	375 µl	375 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3 ml	3 ml
	APS-Lösung	45 µl	45 µl
	TEMED	4,5 µl	4,5 µl

Zunächst wurden Acrylamidlösung, Gelpuffer und H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gemischt. Nach der Zugabe von TEMED und APS-Lösung wurde das Gel gegossen und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> überschichtet, um eine ebene Fläche zu erhalten. Nach Polymerisation des Trenngels (ca. 30 min)

konnte das  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  abgenommen und das Sammelgel gegossen werden, in das zur Formung von Geltaschen ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt wurde. Nach 30 min war das Gel vollständig polymerisiert und konnte verwendet werden.

Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 1:3 mit Denaturierungspuffer gemischt. Anschließend wurden die Proben auf das mit Elektrophoresepuffer überschichtete Gel mit Hilfe einer Hamiltonspritze aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei einer Spannung von 100 V, bis die blaue Markerbande das Trenngel erreicht hatte, und wurde dann auf 130 V erhöht. Als Netzgerät diente ein Gene-Power-Supply GPS 200/400 der Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Markerbande das Gelende erreicht hatte.

Acrylamidlösung:

Acrylamid	96 g
Bisacrylamid	3 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 200 ml

Gelpuffer:

Tris	181,7 g
SDS	1,5 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 500 ml
pH	8,4

Kathodenpuffer:

Tris	12,1 g
Tricine	17,9 g
SDS	1 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml
pH	8,5

Anodenpuffer:

Tris	24,2 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml
pH	8,9

Denaturierungspuffer:

Tris	0,2 g
SDS	1,2 g
Serva-Blau G250	3 mg
Glycerin	3 ml
2-Mercaptoethanol	0,5 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 10 ml
pH	6,8

APS-Lösung:

Ammoniumpersulfat	0,1 g
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1 ml

## 2.19 Proteinfärbemethoden in Polyacrylamidgelen

Die Färbung von Proteingelen und Blotmembranen erfolgte unter ständiger Bewegung auf einem Schüttler bei RT.

### 2.19.1 Coomassie-Färbung

Zur unspezifischen Proteinfärbung mit „Coomassie-Brilliant-Blue“ wurden die Gele 30-60 min in der Färbelösung und anschließend bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes in Entfärbelösung geschwenkt. Letztere wurde dabei mehrfach gewechselt. Die gefärbten Gele wurden in Folie eingeschweißt, eingescannt und bei 4 °C aufbewahrt.

<u>Färbelösung:</u>		<u>Entfärbelösung:</u>	
Serva Blau G-250	1,2 g	Methanol	330 ml
Methanol	227 ml	Eisessig	100 ml
Eisessig	46 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	227 ml		

### 2.19.2 Silberfärbung (BLUM *et al.*, 1987)

Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Färbemethode, da selbst geringe Mengen an Protein nachgewiesen werden können. Das Gel wurde dazu nach der Elektrophorese in folgenden Schritten bearbeitet:

1. mindestens 1 h (höchstens 24 h) im Fixierer inkubieren
2. 3 x 5 min in 50 % (v/v) Ethanol waschen
3. 1 min in der Thiosulfatlösung inkubieren
4. 3 x 20 sec in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> waschen
5. 20 min imprägnieren
6. in Entwicklerlösung inkubieren, bis die Banden sichtbar sind (1-20 min)
7. sofort kurz in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> spülen
8. 10-20 min in Stopplösung inkubieren (bis leichte Trübung entsteht)
9. mindestens 15 min in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> waschen

Die Gele wurden in Plastikfolie eingeschweißt und sofort mit Hilfe eines Scanners dokumentiert, da die Gefahr des Nachdunkelns bestand. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Fixierer:

Methanol	50 ml
Eisessig	12 ml
Formaldehyd (37%; v/v)	100 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml

Die Methanol-Eisessiglösung wurde auf Vorrat angesetzt; nur Formaldehyd wurde unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt.

Thiosulfatlösung:

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	2 mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml

Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

Imprägnierlösung:

AgNO <sub>3</sub>	200 mg
Formaldehyd (37%; v/v)	75 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml

Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

Entwicklerlösung:

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x 10 H <sub>2</sub> O	6 g
Thiosulfatlösung (s.o.)	2 ml
Formaldehyd (37%; v/v)	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml

Die Lösung wurde stets frisch angesetzt.

Stopplösung:

EDTA	1,86 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml

Die Lösung wurde mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 titriert und konnte mehrere Wochen gelagert werden.

## 2.20 Bestimmung der Molekularmassen von Proteinen

Um das Molekulargewichtes von Proteinen in SDS-Gelen und auf Blotmembranen bestimmen zu können, wurden gleichzeitig auch entsprechende Standardproteine mitaufgetrennt. Die Zusammensetzung und die molekulare Masse sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7: Molekulare Massen der Standardproteine für die SDS-PAGE**

Standardproteine	„LMW Calibration“-Kit <sup>a</sup> [kDa]	„Prestained Standard Low Range“ <sup>b</sup> [kDa]
Phosphorylase b	94,0	106,0
Rinderserumalbumin	67,0	81,0
Ovalbumin	43,0	47,5
Carboanhydrase	30,0	35,3
Trypsin-Inhibitor	20,1	28,2
Lysozym		20,8
Lactalbumin	14,4	

<sup>a</sup>„LMW Calibration“-Kit (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg)

<sup>b</sup>„Prestained Standard Low Range“ der (Fa. Bio-Rad München)

Abweichende molekulare Massen bei dem „Prestained“ Marker bezüglich der Standardproteine sind auf den kovalent gebundenen Farbstoff zurückzuführen.

Die Bestimmung der Molekularmasse erfolgte nach dem Anfärben. Es wurde die Wanderungsstrecke im Gel mit der der Markerproteine verglichen. Die Molekularmasse der unbekannt Proteine konnten aus der erstellten Eichgeraden, die Auftragung des Logarithmus der Molekularmassen der Standardproteine gegen deren RF-Wert ergab, abgelesen werden.

$$R_f\text{-Wert} = \frac{\text{Wanderungsstrecke des Proteins}}{\text{Wanderungsstrecke des Farbstoffes}}$$

## 2.21 Methoden zur Proteinanreicherung

### 2.21.1 Metall-Chelat-Affinitätschromatographie

Das Prinzip der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie beruht auf der Komplexierung stark chelatierender Aminosäuren (besonders Histidin) eines Proteins an ein Metallkation (meistens Nickel, Zink oder Kupfer). Das Metallkation wiederum ist über

Nitrilotriessigsäure (Chelatgruppe) an ein Trägermaterial (Agarose oder Sepharose) gebunden.

Die Metall-Chelat-Chromatographie besitzt im neutralen pH-Bereich ihre größte Spezifität und Effizienz. Das Protein wird von der Säule eluiert, indem man den pH-Wert in den sauren Bereich verschiebt oder Histidin durch Zugabe von Imidazol kompetitiv verdrängt.

#### **2.21.1.1 Vorbereitung der Säule**

Für die Metall-Chelat-Chromatographie wurde  $\text{Ni}^{2+}$ -Nitrilotriessigsäure-Agarose (NTA-Agarose; Fa. Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Nach dem Einsetzen der unteren Fritte wurden 6 ml  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose in eine PD 10-Säule (Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg) eingefüllt. Nach der Sedimentation des Trägermaterials wurde die Säule mit dem Zellaufschlusspuffer (siehe 2.21.1.2) gespült und bei 4 °C aufbewahrt.

#### **2.21.1.2 Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen**

Zur Reinigung und damit Konzentrierung löslicher Proteine unter nativen Bedingungen wurde der Rohextrakt mit der  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose (äquilibriert mit Zellaufschlusspuffer) gemischt. Die Bindung erfolgte 1-2 h unter Rühren bei 4 °C. Nach dieser Inkubation wurde die Lösung in den Säulenkörper einer PD-10 Säule gefüllt. Nachdem sich die Agarose abgesetzt hatte, wurde der Durchlauf der Säule aufgefangen. Es folgten zwei Waschschritte mit je 4 ml Puffer 1. Eluiert wurde das Protein mit viermal 0,5 ml Puffer 2. Aliquots der einzelnen Fraktionen der Aufreinigung wurden mit Hilfe von SDS-PAGE überprüft.

Nach Gebrauch wurde das Säulenmaterial mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gespült und bei 4 °C mit 30 % Ethanol gelagert.

Vor einer erneuten Verwendung der Säule wurde das Chromatographiematerial mit Puffer 2 gespült und dann mit dem Zellaufschlusspuffer äquilibriert.

#### Zellaufschlusspuffer:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 mM
pH	8,0

<u>Puffer 1:</u>		<u>Puffer 2:</u>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
Tris/HCl	300 mM	NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM	Imidazol	250 mM
pH	8,0	pH	8,0

### 2.21.1.3 Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Die denaturierende Aufreinigung wurde ebenfalls zur Proteinkonzentrierung eingesetzt und erfolgte analog der Beschreibung für die Reinigung unter nativen Bedingungen. Die Puffer enthielten statt Imidazol nun Harnstoff (Puffer B).

Gewaschen wurde zweimal mit 4 ml Puffer C und eluiert viermal mit 0,5 ml Puffer D und zweimal mit 0,5 ml Puffer E.

<u>Puffer B:</u>		<u>Puffer C</u>	
Harnstoff	8 M	Harnstoff	8 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M
Tris/HCl	0,01 M	Tris/HCl	0,01 M
pH	8,0	pH	6,3

<u>Elutionspuffer D:</u>		<u>Elutionspuffer E:</u>	
Harnstoff	8 M	Harnstoff	8 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M
Tris/HCl	0,01 M	Tris/HCl	0,01 M
pH	5,9	pH	4,5

### 2.21.1.4 Regeneration der Säule

Eine Regeneration der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose wurde durchgeführt, wenn eine Farbänderung von grün-blau nach bräunlich-grau auftrat. Durch das chelatierende Agens EDTA erfolgte die Elution des Nickels von der Säule. Nach einer anschließenden Wiederbeladung mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen stand das Säulenmaterial erneut für mehrere Reinigungszyklen zur Verfügung. Die Regeneration erfolgte anhand des Herstellerprotokolls.

### 2.21.1.5 Ammoniumsulfat-Fällung

Bei der Ammoniumsulfat-Fällung ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) nutzt man aus, dass durch die Zugabe des Salzes die Wechselwirkung der Proteine mit den Wassermolekülen verhindert und ihre damit ihre Löslichkeit herabgesetzt wird. Die zum Sättigungsgrad benötigte Menge



wurde Tabelle 8 entnommen und der Proteinlösung langsam unter Rühren bei 4 °C zugegeben. Damit sich das Ammoniumsulfat schneller löste wurde es zuvor in einem Mörser zerkleinert. Nach erfolgter Zugabe ließ man die Lösung noch für 20 min unter Rühren inkubieren. Das ausgefallene Protein wurde dann bei 15000 x g bei 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Proteinpellet in KP-Puffer (siehe 2.3.1) aufgenommen (1/10 des Ausgangsvolumens).

**Tabelle 8: Nomogramm zur Bestimmung der Ammoniumsulfatmenge zur Einstellung einer gewählten Konzentration (in % Sättigung) (modifiziert nach GREEN & HUGHES, 1955)**

Ausgangskonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)	Endkonzentration Ammoniumsulfat (% Sättigung)																	
	10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100	
	zugegebenes Ammoniumsulfat (g/l)																	
0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767	
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694	
20			29	59	78	91	123	155	189	225	263	300	340	382	424	520	619	
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583	
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546	
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522	
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506	
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469	
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431	
50										33	66	101	137	176	214	302	392	
55											33	67	103	141	179	264	353	
60												34	69	106	143	227	314	
65													34	70	107	190	275	
70														35	72	153	237	
75															36	115	198	
80																77	157	
90																	79	

## 2.22 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf Membranen

### 2.22.1 Western Blot (TOBWIN *et al.*, 1979; modif.)

Die Methode des elektrophoretischen Proteintransfers auf Membranen (TOWBIN *et al.*, 1979) wurde sowohl für den spezifischen Nachweis von Proteinen mit der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugatfärbung (siehe 2.23.1.1) als auch für die Färbung mit spezifischen Antikörpern (siehe 2.23.1.2) angewandt. Der Western-Blot wurde in einer Mini-Blot-Apparatur („Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Electrophoretic Transfer Cell“, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Nach der SDS-PAGE wurden das Gel sowie auf Gelgröße zugeschnittene 2 Lagen Whatman Papier (Whatman 3 MM, Schleicher und Schuell GmbH, Dassel) und die gewünschte Membran zusammen mit den beiden Glasfaserpads

10 min in gekühltem Transfer-Puffer getränkt. Anschließend wurde der Blot luftblasenfrei in der Gelhalterungskassette auf der Anodenseite aufgebaut:

Kathode (-)

- Glasfiberpad
- 1 Lage Whatman
- SDS-Polyacrylamidgel
- Membran
- 1 Lage Whatman
- Glasfiberpad

Anode (+)

Die Oberflächen des Whatman-Papiers, des Gels und der PVDF-Membran wurden jeweils mit Transferpuffer abgesättigt und die Kassette durch Andrücken der Anodenseite auf die Kathodenseite fest verschlossen. Zusammen mit der Blot-Elektrodeneinheit wurde die Kassette in die mit Puffer gefüllte Blot-Kammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 120 V und 4 °C für 1 h.

Transfer-Puffer:

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol (20 % [v/v])	200 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
pH	8,1-8,4

Den pH-Wert nicht mit Säure oder Base einstellen; lag der pH außerhalb dieses Bereichs, wurde der Puffer neu angesetzt).

Bei der vor dem Western-Blot durchgeführten SDS-PAGE wurde ein sogenannter „Prestained Marker“ (LMW, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München; siehe 2.20) verwendet.

Anhand dieser bereits gefärbten Banden konnte der Proteintransfer überprüft werden. Dadurch entfiel ein Färbeschritt mit Ponceau S. Die Membran konnte direkt nach dem Western-Blot der gewünschten Färbung unterzogen werden.

Als Alternative zur Benutzung von Nitrocellulosemembranen wurden auch hydrophobe Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF-Membranen, Fa. Millipore, Eschborn) eingesetzt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass diese zunächst in 100 % Methanol voräquilibriert wurden.

### 2.22.2 Protein-„Dot-Blot“-Verfahren (HAWKES, 1986; modif.)

Alternativ zu 2.22.1 konnten Proteine mittels „Dot-Blot“-Verfahrens auf Membranen übertragen werden ohne vorher in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt zu werden. Hierfür wurden nur Nitrocellulose-Membranen verwendet, da diese nicht wie die PVDF-Membranen zuvor in 100 % Methanol quellen mussten. Bei dem Verfahren wurden definierte Konzentrationen bzw. Volumina einer Proteinlösung direkt auf die Membran getropft, die Membran für ca. 10 min bei RT getrocknet und dann verwendet.

## 2.23 Immunodetektion von Proteinen auf Blotmembranen

Gebloottete Antigene bieten die Möglichkeit sie mit Konjugaten oder Antikörpern anzufärben. Bei der Verwendung von Antikörpern hängt die Spezifität der Immunfärbung von der Spezifität des primären und sekundären Antikörpers und deren eingesetzten Konzentrationen ab.

### 2.23.1 Chromogene Methoden

#### 2.23.1.1 Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat-Färbung

Dieses Verfahren dient dem Nachweis von bestimmten Proteinen auf Blotmembranen. Es beruht auf der Affinität des mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugats (Fa. Qiagen GmbH, Hilden) zu mehreren aufeinanderfolgenden Histidinresten (His<sub>6</sub>-Tag) eines Proteins. Ein solcher His<sub>6</sub>-Tag kann mit Hilfe geeigneter Vektoren carboxy- oder aminoterminal an rekombinante Proteine angehängt werden. Histidin fungiert dabei als Elektronendonator an der Proteinoberfläche und bindet so an Metallionen wie z.B. Nickel (HOCHULI, 1988; YIP *et al.*, 1989). Solche Komplexe können durch den Umsatz geeigneter Substrate von der alkalischen Phosphatase anhand der resultierenden Farbänderung sichtbar gemacht werden.

Die Inkubationen und das Waschen der Membran wurden unter Schwenken bei RT nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 2 x 10 min in TBS-Puffer waschen
- 1 h bis über Nacht (dann bei 4 °C) in Blockpuffer inkubieren
- 3 x 10 min in TBST-Puffer waschen
- 1 h in Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat-Stammlösung/TBST-Puffer (1:1000) inkubieren
- 3 x 10 min in TBST-Puffer waschen
- Behandlung mit Färbelösung, bis die Banden deutlich sichtbar sind
- 2 x 10 sec in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> spülen
- zum Abstoppen der Reaktion 5 min in Trichloressigsäure (3 % [v/v]) inkubieren
- 2 x 10 sec in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> spülen

Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt, sofort mit Hilfe eines Scanners dokumentiert und bei RT getrocknet.

TBS-Puffer (10-fach) (siehe 2.3.3)

TBST-Puffer (5-fach) (siehe 2.3.4)

Puffer A:

NaCl	0,1 M
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Tris/HCl	0,1 M
pH	9,5 9,5

Blockpuffer:

3 % (w/v) BSA in TBS-Puffer

Lagerung bei 4 °C, nicht autoklavieren und nach maximal einer Woche frisch ansetzen

NBT-Stammlösung:

4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	5 % [w/v]
N,N'-Dimethylformamid	7 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 10 ml

Lagerung bei -20 °C

BCIP-Stammlösung:

5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat	5 % [w/v]
N,N'-Dimethylformamid	ad 10 ml

Lagerung bei -20 °C

Färbelösung:

NBT-SL	66 µl
BCIP-SL	33 µl
Puffer A	10 ml

Die Lösung wurde direkt vor Gebrauch frisch angesetzt.

**2.23.1.2 Färbung mit Substrat für Peroxidase-markierten sekundären Antikörper**

Dieses Verfahren diente zur Detektion des menschlichen Intrinsic Faktors, MutB, des Strep-TagII, des Chaperons DnaK und des Maltose-bindenden Proteins (MBP). Bei dieser Methode wurde im Gegensatz zu 2.23.1.1 mit zwei verschiedenen Antikörpern (AK) gearbeitet, wodurch das System sensitiver wird: einem primären, für das zu detektierende Antigen-spezifischen-AK und einem sekundären, peroxidasegekoppelten-AK. Bei dem sekundären Antikörper handelte es sich entweder um anti-Kanninchen-AK oder anti-Maus-AK, je nachdem in welchem Organismus der primäre AK produziert worden war. Analog der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat-Färbung kann auch hierbei das entsprechende Protein durch Umsatz geeigneter Substrate von der Peroxidase anhand des Farbumschlags sichtbar gemacht werden.

Die nachfolgenden Schritte zur Inkubation und zum Waschen der Membran wurden unter Schwenken bei RT durchgeführt:

- 2 x 10 min in TBS-Puffer (siehe 2.3.3) waschen
- 1 h bis über Nacht (dann bei 4 °C) in Blockpuffer inkubieren
- 3 x 10 min in TBST-Puffer (siehe 2.3.4) waschen
- 2 h in primären AK /TBST-Puffer (Konz. 1:1000-1:7000) inkubieren
- 3 x 10 min in TBST-Puffer waschen
- 1-2 h in sekundärem AK /TBST-Puffer (Konz. 1:2000) inkubieren
- Detektion mit Substrat für die Peroxidase, Inkubation bis Banden sichtbar werden (5 min-1 h); hierbei nicht mehr Schwenken
- Abstoppen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Die Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und mit Hilfe eines Scanners dokumentiert. Anschließend noch mal für 30 min bis über Nacht in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> bei 4 °C gelagert (verstärkt Bandenintensität) und gegebenenfalls wiederholt eingescannt.

Peroxidase-Substrat:

Color development reagent <sup>a</sup>	15 mg
eiskaltes Methanol	6-7 ml
TBS-Puffer (siehe 2.3.3)	ad 30 ml

a: 4-Chloro-1-Naphthol, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Das Color development reagent wurde in zuerst in Methanol gelöst und anschließend mit TBS-Puffer aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestartet.

Folgende primäre Antikörper kamen zum Einsatz:

- polyklonales IF-spezifisches-Antiserum aus dem Kanninchen
- monoklonaler IF-spezifischer-Antikörper aus der Maus
- monoklonaler Histidin-spezifischer-Antikörper (Penta Histidin) aus der Maus
- polyklonales DnaK-spezifisches Antiserum aus dem Kanninchen
- polyklonales MBP-spezifisches Antiserum aus dem Kanninchen
- polyklonaler Strep-TagII-spezifischer Antikörper aus dem Kanninchen
- polyklonales Strep-TagII-spezifisches Antiserum aus dem Kanninchen

## 2.23.2 Chemilumineszente Methode

### 2.23.2.1 Detektion mit ECL Plus Substrate (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, UK) für peroxidase-markierten sekundären Antikörper

Peroxidase-markierte Antikörper katalysieren die Oxidation von Luminol und lösen damit eine Chemilumineszenz aus. Das dabei entstehende Licht kann mit Autoradiographiekassetten und einem Phosphoimager (siehe 2.12.2) gemessen werden. Die ECL-Reaktion ist etwa 10-mal sensitiver als die Blotentwicklung mit alkalischer Phosphatase (siehe 2.23.1.1) und läuft in Sekunden bis Minuten ab. Wegen der erhöhten Sensitivität sind die Waschschr<sup>itte</sup> nach dem Blocken intensiver als unter 2.23.1.1 beschrieben:

- geblottete Membran 2 x 2 min in Puffer1 waschen

Waschprozeß nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper:

- Membran 2 x mit Puffer 1 spülen
- 15 min in Puffer 1 waschen
- 3 x 5 min mit Puffer 1 spülen

Waschschr<sup>itte</sup> nach der Inkubation mit dem 2. Antikörper:

- Membran 2 x mit Puffer 1 spülen
- 15 min in Puffer 1 waschen
- 3 x 5 min mit Puffer 1 spülen

Für die Detektion wurden Lösung A und B (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, UK) im Verhältnis 40:1 gemischt und auf die Membranoberfläche aufgetragen. Nach 1 min wurde der Blot in Haushaltsfolie eingeschlagen und im Phosphoimager bei 430 nm ausgewertet.

Puffer 1:

entweder TBST (siehe 2.3.4):

oder:

PBST:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16 mM
NaCl	115 mM
Tween 20	0,25-0,1 % [v/v]
pH	7,3

## **2.24 Nachweis des „Green Fluorescent Protein“ im Fluoreszenzmikroskop**

Zum Nachweis der Produktion des „Green Fluorescent Protein“ (GFP) wurden 2-3 µl aus den entsprechenden Zellkulturen auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt, was anschließend gut fixiert wurde. Die Analyse der Zellen erfolgte im Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100 von Zeiss, GFP-Filter: Anregung BP 450-490, Emission BP 500-550.

## **2.25 Einbettung von Zellen für elektronenmikroskopische Dünnschichtdarstellungen**

Für Ultradünnschnitte von Zellen wurden diese nach der Lowicryl (Temperaturmethode) eingebettet. Die Anzucht der Zellen erfolgte dabei aerob in 100 ml LB und anaerob in 500 ml Mineralmedium (siehe 2.2.1, 2.14.1 und 2.14.3). Anschließend wurden die Zellen geerntet und zweimal mit KP-Puffer (siehe 2.3.1) gewaschen (Zentrifugationsschritte bei 4 °C, 10 min, Sorvall Rotor SS34 bzw. GS-3 Becher). Den in 1-2 ml KP-Puffer resuspendierten Zellen wurde 0,2 % Glutaraldehydlösung und 0,3 % p-Formaldehydlösung zugesetzt (pro Ansatz je 3-4 ml Lösung). Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C gelagert, bevor die fixierten Bakterien dreimal in PBS gewaschen wurden (4 °C, 10 min, Sorvall Rotor SS34). Das in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführte Zellpellet wurde daraufhin mit 2% igem auf 40 °C erwärmten Agar (in PBS) sorgfältig gemischt, wobei das Verhältnis

von Pelletvolumen und Agarlösung 1:1 betragen mußte und anschließend für 10 min auf Eis abgekühlt wurde. Um die in Agar eingebetteten Zellen aus dem Reaktionsgefäß zu befreien, wurde die Spitze mit einer Klinge abgeschnitten und der Inhalt auf einen Glasobjektträger geschoben, wo dieser in ca. 2 mm Stücke geschnitten wurde. Diese Stücke mußten, um ein Austrocknen zu vermeiden, sofort in 3,5 ml Präparatengläser (12 x 35 mm, Ochs) weiterverarbeitet werden.

Die anschließende Infiltration der Agarblöckchen mit Methanollösung bzw. Kunstharzlösung verlief nach folgendem Schema:

- 15 min bei 0 °C in 15 % Methanol
- 30 min bei 0 °C in 30 % Methanol
- 50 min bei -20 °C in 50 % Methanol
- 30 min bei -35 °C in 70 % Methanol
- 30 min bei -35 °C in 95 % Methanol
- 2 x 30 min bei -35 °C in 100 % Methanol
- 1 h bei -35 °C in 50 % Methanol + 50 % Lowicryl K4M-Harz
- 2 h bei -35 °C in 33 % Methanol + 66 % Lowicryl K4M-Harz
- 1 x Wechseln und dann übers Wochenende bei -35 °C in 100 % Harz

Die Proben wurden nach dieser Behandlung in Gelatine kapseln überführt, die mit 100 % K4M-Harz gefüllt wurden und folgend für mindestens 24 h bei -35 °C (+ UV-Licht) dann bei RT mit UV-Licht polymerisiert.

#### Zusammensetzung des Kunstharzes (Serva):

- Vinylcyclohexendioxid (ERL 4206)	15,0 g
- DER 732 (oder DER 736 nur 9,0 g)	13,5 g
- Nonenylbernsteinsäureanhydrid (NSA)	39,0 g
- $\alpha$ -Dimethylaminoethanol (S1)	0,6 g

#### **2.25.1 Ultramikrotomie**

Die polymerisierten Proben wurden mit einer Diamantfräse (TM 60, Reichert, Österreich) so angespitzt, daß ein Pyramidenstumpf mit einer quadratischen Spitze von maximal 0,5 mm<sup>2</sup> Oberfläche entsteht. Die Dünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom (Ultrame III, LKB. Bromma, Schweden) unter Verwendung von Glasmessern angefertigt.

Die Messer wurden aus 25 mm breiten und 6,5 mm dicken Glasstreifen (LKB, Bromma, Schweden) mit einem Messerbrecher (Knifemaker LKB 7800) hergestellt und besaßen bei einem Gegenstück von ca. 0,5 mm Dicke einen realen Winkel um 55° an der



Messerkante. Sie wurden mit einem Kunststoffrog zur Aufnahme von filtrierten  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ , auf dem die Schnitte abflottierten, versehen und konnten mehrere Tage ohne Qualitätsverlust gelagert werden.

Die auf der Wasseroberfläche abflottierten Ultradünnschnitte besaßen bei silberner Interferenzfarbe eine Dicke von 50-60 nm. Die Schnitte wurden mit formvarbeschichteten Kupfergrids aufgenommen.

Die Inkubation der Ultradünn-Schnitte auf den Grids erfolgte mit zunächst für 90 min mit primären Strep-TagII Antikörpern (1:100 Verdünnung). Nach den folgenden Waschschritten für 15 s mit PBS + 0,01 % Tween-20, 2 x 5 min mit PBS + 0,01 % Tween-20 und 5 s mit PBS wurden die Ultradünn-Schnitte für 45 min mit den sekundären immunogold-markierten anti-Kaninchen Antikörpern (EM Goat Anti-rabbit IgG; 1:50 Verdünnung) inkubiert. Danach konnten die Grids erneut gewaschen werden (15 s mit PBS + 0,01 % Tween-20, 2 x 5 min mit PBS + 0,01 % Tween-20 und 10 s mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ). Danach mussten sie über Nacht auf Filterpapier getrocknet werden.

## 2.26 Synthese von $^{14}\text{C}$ -markiertem Coenzym $\text{B}_{12}$

Zur Untersuchung von  $\text{B}_{12}$ -Bindungen von Proteinen mittels Dot-Blot-Verfahren (siehe 2.22.2) sollte  $^{14}\text{C}$ -markiertes Coenzym  $\text{B}_{12}$  synthetisiert werden, da dies nicht käuflich zu erwerben ist. Die  $^{14}\text{C}$ -Markierung sollte dabei an der Dimethylbenzimidazol-Einheit des Coenzym  $\text{B}_{12}$  erfolgen.

### 2.26.1 Synthese von 5,6-Dimethyl (2- $^{14}\text{C}$ ) Benzimidazol (HÖRIG und RENZ, 1980)

Die Synthese von 5,6-Dimethyl (2- $^{14}\text{C}$ ) benzimidazol erfolgte durch chemische Umsetzung von 1,2-Diamino-4,5-Dimethylbenzen (136 mg in 0,4 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ) mit Na ( $^{14}\text{C}$ ) Formiat (50  $\mu\text{Ci}$ ). Diese beiden Substanzen wurden zunächst mit 0,1 ml Ameisensäure und 1 ml HCl (2 M) versetzt und für 1,5 h bei 100 °C erhitzt. Nach diesem Hitzeschritt folgte eine Inkubation über Nacht bei RT mit anschließender Fällung durch ca. 10 ml Ammoniak (2 M). Das Präzipitat wurde durch Filtration getrennt und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  gewaschen. Getrocknetes 5,6-Dimethyl (2- $^{14}\text{C}$ ) benzimidazol wurde dann in eine Fermentation mit *Propionibacterium freundenreichii* subsp. *shermanii* eingesetzt (siehe 2.1).

### 2.26.2 Synthese von Coenzym B<sub>12</sub> durch *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (HÖRIG und RENZ, 1980)

Die Biosynthese von Coenzym B<sub>12</sub> in *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* kann in zwei Schritten vollzogen werden. Während des anaeroben Wachstums in Gegenwart von Cobaltsalzen erfolgt die Synthese der Corrin-Einheit. Die anschließende aerobe Inkubation induziert die Biosynthese von 5,6-Dimethylbenzimidazol. Das dann gebildete Cobinamid wird zu Coenzym B<sub>12</sub> umgesetzt. Unter anaeroben Bedingungen synthetisiert *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* nur Coenzym B<sub>12</sub>, wenn 5,6-Dimethylbenzimidazol zugeführt wird.

Die Glucosefermentation von *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* erfolgte in 1-l-Serumflaschen mit dem unter 2.2.9 beschriebenen synthetischen Medium bei 30 °C unter anaeroben Bedingungen. Am 2. und 4. Inkubationstag erfolgte die Zugabe des radioaktiv markierten 5,6-Dimethylbenzimidazols (5 bis 10 mg gelöst in Ethanol [70%; v/v]). Nach 6 bis 8 Tagen hatte sich genug Coenzym B<sub>12</sub> gebildet, und die Zellen wurden durch Zentrifugation (6000 x g, 10 min) geerntet. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch Autoklavieren bei 121 °C für 20 min. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt (15000 x g, 30 min, 4 °C). Nach dem Zellaufschluß mußte wegen der Lichtempfindlichkeit des Coenzym B<sub>12</sub> unter Rotlicht gearbeitet werden.

### 2.26.3 Nachweis und Isolierung des <sup>14</sup>C-markierten Coenzym B<sub>12</sub> durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Das gebildete radioaktiv markierte Coenzym B<sub>12</sub> (siehe 2.26.2) wurde mittels einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an einer µBondapak C18-Säule (19 mm x 15 cm, Fa. Waters GmbH, Eschborn) gereinigt. Anhand der verschiedenen Retentionszeiten können dabei verschiedene Substanzen getrennt werden. Die Zuordnung der Retentionszeiten erfolgt mit Hilfe von Standards, die nur eine Substanz enthalten und die ebenfalls auf die Säule aufgetragen werden. Aus den auftretenden Peakflächen kann auf die Substanzmenge geschlossen werden. Hierzu wurde für die jeweiligen Substanzen eine Eichgerade aufgenommen. Wurden die Säulen längere Zeit nicht genutzt, mußte das ganze System mit 20 % Ethanol gespült werden. Die HPLC-Anlage (Fa. Kontron, Eching) bestand aus folgenden Komponenten: 2 HPLC-Pumpen 42, Mischer M 491, Detektor 43, Multiport und einem AT-Computer mit entsprechender Software (Programm MT2). Als Laufmittel dienten die Lösungen A und B, die vor Gebrauch filtriert (Cellulosenitrat-Filter, Porengröße 0,2 µm, Fa. Sartorius, Göttingen) wurden. Die Fließgeschwindigkeit betrug 5 ml/min, ein Lauf dauerte 44 min. Dabei wurde folgender Gradient eingestellt:

Zeit (min)	Flußrate (ml/min)	Lösung A (%)	Lösung B (%)
0	5,0	100	0
7	5,0	75	25
19	5,0	60	40
23	5,0	0	100
27	5,0	0	100
31	5,0	100	0
33	0,1	100	0

Als Eichsubstanzen wurden Hydroxy-B<sub>12</sub>, Cyano-B<sub>12</sub>, Methyl-B<sub>12</sub> und Coenzym B<sub>12</sub> in einer Konzentration von 0,05 mg/ml verwendet. Von diesen Lösungen wurden 50 µl injiziert. Die Detektion erfolgte am UV-Detektor bei 360 nm. Von den zu untersuchenden Proben wurde 1 ml injiziert. Pro Lauf konnten durch 4-maliges Injizieren 4 ml Probe aufgearbeitet werden.

Lösung A:

Na-Acetat x 3 H <sub>2</sub> O	8,95 g
Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH)	5,88 ml
Lösung B	210,5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 4 l

Lösung B:

Methanol	4 l
Essigsäure	0,4 ml
TBAH	5,88 ml

Der pH von 4,6 wurde mit Essigsäure vor Zugabe von Lösung B eingestellt.

Das so isolierte, radioaktiv markierte Coenzym B<sub>12</sub> lag sehr verdünnt vor und wurde daher mittels einer Vakuumzentrifugation (Vakuumzentrifuge Savant AS160, Fa. Savant Instruments Inc., Holbrook, USA) eingeengt. Die schon erwähnten Eichsubstanzen wiesen folgende Retentionszeiten auf:

Eichsubstanz	Retentionszeit (min)
Cyano-B <sub>12</sub>	17,76
Coenzym B <sub>12</sub>	20,35
Methyl-B <sub>12</sub>	21,79
Hydroxy-B <sub>12</sub>	22,06

## 2.27 Quantitative Bestimmung von Corrinoiden

### 2.27.1 Quantitative Bestimmung von Corrinoiden mittels Plattentest (KRZYCKI und ZEIKUS, 1980; modif.)

Der B<sub>12</sub>-Plattentest ermöglicht es Corrinoiden in Zellextrakten oder Überständen nachzuweisen. Der Test beruht auf der Tatsache, daß *E. coli* DSM 4261 aufgrund einer Punktmutation im *metE*-Gen, welches für eine B<sub>12</sub>-unabhängige Methionin-Synthase kodiert, auf seine alternative B<sub>12</sub>-abhängige Methionin-Synthase, kodiert durch *metH*, angewiesen ist. Daher ist dieser Stamm in Methionin-freiem Medium auf die B<sub>12</sub>-abhängige Methionin-Synthase und damit auch auf das Vorhandensein von B<sub>12</sub> angewiesen.

Der Durchmesser dieser Zonen ist proportional zum Wachstum der *E. coli* Mutante und damit auch proportional zur B<sub>12</sub>-Konzentration in der Probe.

Die B<sub>12</sub>-auxotrophe *E. coli*-Mutante wurde in die Testplatten (siehe 2.2.7) eingegossen. Dazu wurde eine 50 ml Hauptkultur mit Minimal-Aminosäure Medium (siehe 2.2.6) mit einer 5 ml über Nacht Vorkultur angeimpft. Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 2,0 wurde die Zellen geerntet, dreimal mit 20 ml 0,9 % NaCl gewaschen und anschließend indemselben Volumen NaCl resuspendiert. 0,7 ml dieser gewaschenen Zellsuspension diente als Inokulum für 500 ml auf 50 °C abgekühlten Mineralagar (siehe 2.2.7). Außerdem wurde dem Agar noch das Reduktionsmittel Triphenyltetrazoliumchlorid beigelegt. Auf die Platten wurden je 4 sterile Filterplättchen (Ø 0,9 cm, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) gelegt und mit 10-15 µl Probe und demselben Volumen B<sub>12</sub>-Eichlösungen zentral beladen. Die Eichkurve wurde mit Coenzym B<sub>12</sub> und/oder Vitamin B<sub>12</sub> der Konzentrationen 0 / 0,05 / 0,25 / 0,1 / 5,0 µg/ml aufgenommen. Sowohl von den Proben als auch von den Eichlösungen wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Inkubation der Platten erfolgte für 16-24 h bei 37 °C. Enthielten die Proben B<sub>12</sub>, ließen sich nach Inkubation der Platten rote Zonen um die Plättchen erkennen. Das Wachstum der Mutante im Medium bewirkt die Reduktion des Triphenyltetrazoliumchlorids im Agar, was sich durch eine rote Färbung auszeichnet. Um die B<sub>12</sub>-Konzentrationen zu bestimmen, wurden die Durchmesser der roten Zonen um die Filterplättchen ausgemessen. Das Wachstum und damit der Durchmesser der roten Zone ist proportional zu der B<sub>12</sub>-Konzentration in der aufgetragenen Lösung.

Die Zellen aus den Induktionsversuchen wurden nach der Ernte dreimal mit 0,1 M KP-Puffer (siehe 2.3.1) gewaschen, um mögliche B<sub>12</sub>- und Methionin-Verunreinigungen aus dem Medium zu entfernen.

Als Proben wurden Periplasma, Cytoplasma und Rohextrakte aus verschiedenen Expressionstudien eingesetzt.

### 2.27.2 Photometrische Methode zu quantitativen Corrinoidbestimmung

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, alle in der Probe enthaltenen Corrinoiden in die lösliche Dicyano-Form umzusetzen und störende Komponenten wie Proteine und Lipide auszufällen und abzuzentrifugieren. Zur Bestimmung der Corrinoiden wurde ein Spektrum der zuvor aufgearbeiteten Proben zwischen 350 und 650 nm aufgenommen (Plastikküvette  $d = 1$  cm, Messung gegen Luft) und der B<sub>12</sub>-Gehalt dann durch Bestimmung der Absorptionsunterschiede bei 580 und 650 nm mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten des Dicyanocobalamins ( $\Delta\epsilon_{580-640} = 7,3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) berechnet. Alternativ wurde der B<sub>12</sub>-Gehalt auch mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für Dicyanocobalamin bei 580 nm und 367 nm ( $\epsilon_{540} = 7800 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{367} = 23800 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) berechnet und der Mittelwert bestimmt. Der Wert bei 376 nm sollte dabei etwa 3–4 mal so hoch wie der bei 580 nm sein. Als Standard wurde sowohl Hydroxy- als auch Cyano-B<sub>12</sub> eingesetzt.

Für die Umsetzung der Corrinoiden aus einer Probe in die Dicyanoform wurden nachfolgende Schritte durchgeführt:

- 1 ml Probe mit 0,2 % (w/v) NaCN oder KCN für 30 min bei RT im dunkeln inkubieren
- Lösung mit Eisessig auf pH 4 ansäuern
- Proben für 20 min bei 100 °C kochen
- abkühlen und mit 10 N KOH auf pH 11 titrieren
- erneut Zugabe von 4-5 mg NaCN oder KCN
- 30 min bei 13000 Upm und RT zentrifugieren, um ausgefallene Proteine zu entfernen
- vom Überstand ein Spektrum zwischen 350 und 650 nm fahren

Bei den eingesetzten Proben handelte es sich sowohl um Periplasma, als auch um Cytoplasma und Rohextrakt. Um die Proben der einzelnen Fraktionen untereinander vergleichen zu können wurden die Proteingehalte einander angeglichen.

## 2.28 Bezugsquellen

Standardchemikalien wurden, soweit nicht anders im Text angegeben, mit dem Reinheitsgrad „pro analysis“ oder „reinst“ von den Firmen Boehringer (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Hannover), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) verwendet. Die Bezugsquellen weiterer Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Kits sind nachfolgend aufgeführt:

### ALDRICH-CHEMIE, Steinheim

TEMED

### Amersham Pharmacia, Freiburg:

NAP-5-Säulen, PD 10-Säulen, „HMW Calibration-Kit“, „LMW-Calibration“-Kit, Nylonmembranen

### BIOTREND, Köln

Mouse Anti-Intrinsic Factor IgG1

### BIORAD, München

Peroxidase-konjugierter Goat Anti-Rabbit IgG

### Biozym GmbH, Hess. Oldendorf:

Tfl DNA Polymerase

### Dianova, Hamburg:

Peroxidase-konjugierter Goat Anti-Mouse IgG (H+L)

### DSM-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH:

*E. coli* DSM 4261, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* 4902

### Eurogentec, Seraing, Belgien:

Agarose

### Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg:

IPTG, X-Gal, Ampicillin, Acrylamid, Bisacrylamid, Mops, SDS 4x, Tween 20

Gibco BRL, Eggenstein:

Hefeextrakt, Random Primed Labeling Kit

Hartmann Analytic, Braunschweig:

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP

IBA GmbH, Göttingen:

*Strep*-Tag II Antikörper

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot:

Ladder-Mix, Nukleotide; Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Taq-Polymerase

Millipore, Eschborn:

Mikrodialyse-Filter

New-England Biolabs GmbH, Freiburg:

Restriktionsendonukleasen, RNA-Leiter, Vent-Polymerase, Anti-MBP Antiserum

Oxoid, Basingstone, England:

Agar, Trypton, Hefeextrakt

Promega, Deutschland GmbH, Mannheim:

Wizard<sup>TM</sup> *Plus* Minipreps DNA Purification System, BCIP, NBT

Qiagen GmbH, Hilden:

„RNeasy<sup>TM</sup> Total RNA“-Kit, Ni<sup>2+</sup>-Nitrilotriessigsäure-Agarose, „Qiaquick PCR Purification“-Kit, „Qiaquick Gel Extraction“-Kit, RNA/DNA Maxi Kit, Ni<sup>2+</sup>-NTA-AP-Konjugat, Penta-His-Antikörper

Sartorius AG, Göttingen:

Sterilfilter

Schleicher & Schuell, Dassel

Antibiotika-Filterplättchen

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Cyano-B<sub>12</sub>, Hydroxy-B<sub>12</sub>

Takara, Japan:

TakaraEx Taq-Polymerase

Whatman, Maidstone, England:

Whatman-Filterpapier 3MM

Die verwendeten Gase (N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> mit einem Reinheitsgrad von 99,99 %) wurden von der Firma Messer Griesheim GmbH (Kassel) bezogen.



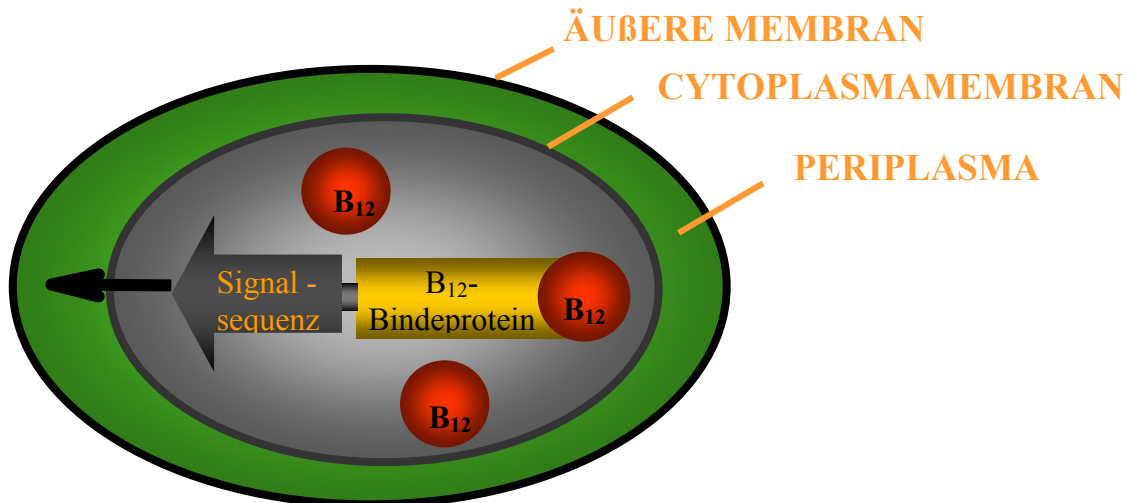
### 3 Experimente und Ergebnisse

Vitamin B<sub>12</sub> (Cyano-B<sub>12</sub>) ist ein wasserlösliches Vitamin, welches als exogene Vorstufe zur Synthese von Coenzym B<sub>12</sub> verwendet werden kann. Nach der Aufnahme kann Cyano-B<sub>12</sub> in biologisch aktive Formen (Adenosyl- oder Methyl-B<sub>12</sub>) umgewandelt werden (ZAGALAK, 1982). In der Natur wird B<sub>12</sub> als Coenzym nur von Mikroorganismen gebildet (ROTH *et al.*, 1996). Einen essentiellen Bedarf an B<sub>12</sub> haben sowohl Menschen, Tiere als auch Mikroorganismen. Pflanzen und Pilze hingegen benötigen es nicht (DUDA *et al.*, 1967). Produziert wird B<sub>12</sub> z. B. von Propionsäurebakterien, Pseudomonaden, Streptomycceten oder Salmonellen. Andere Bakterien, die nicht in der Lage sind das B<sub>12</sub> selbst zu bilden, müssen es aus dem umgebenden Milieu aufnehmen. Somit existieren zwar Aufnahmesysteme für B<sub>12</sub>, ein natürliches Exportsystem ist bislang aber nicht bekannt.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht nun die Entwicklung eines Systems mit dessen Hilfe Coenzym B<sub>12</sub> aus einer B<sub>12</sub>-produzierenden Bakterienzelle exportiert werden kann.

#### 3.1 Strategie für die Entwicklung eines B<sub>12</sub>-Exporters

Es wurde ein System angestrebt, in dem B<sub>12</sub> im Cytoplasma einer Bakterienzelle an ein B<sub>12</sub>-bindendes Protein gekoppelt und zusammen mit diesem ins Periplasma exportiert wird (siehe Abbildung 5). Entscheidend dabei ist, dass das Bindeprotein in seiner nativen Form vorliegt, um zusammen mit dem Cofaktor über die Cytoplasmamembran transportiert werden zu können. Ungeeignet sind signalsequenzabhängige Transportsysteme bei denen die Proteine ungefaltet exportiert und erst im Periplasma gefaltet werden (z.B. Sec-System; WICKNER *et al.*, 1991). Das vor einigen Jahren entdeckte Tat-(Twin-Arginine-Translocation) Transportsystem hingegen ermöglicht den Transport nativer Proteine mit gebundenen Cofaktoren z. B. Molybdopterin, Flavin. Dieser generelle zweite Protein-Export-Weg ist weit verbreitet unter Bakterien beispielsweise in *E. coli*, *Zymomonas mobilis* oder *Wolinella succinogenes* zu finden (RODRIGUE *et al.*, 1999). Signalpeptide dieses Transportweges weisen alle das Twin-Arginin-Motiv S/T-R-R-x-F-L-K auf (BERKS, 1996, BOGSCH *et al.*; 1998; SARGENT *et al.*, 1998; MORI und CLINE, 1998; SANTINI *et al.*, 1998; WEINER *et al.*, 1998).



**Abbildung 5: Modell für den Export von B<sub>12</sub> aus einer Gram-negativen Bakterienzelle**

Ein gut untersuchtes Protein, welches über den Tat-Weg transportiert wird, ist die Trimethylamin-N-Oxid-Reduktase (TorA) aus *E. coli*. Dieses periplasmatische Enzym enthält Molybdopterin als Cofaktor. Die Reduktion von Trimethylamin-N-Oxid zu Trimethylamin ermöglicht es, *E. coli* anaerob auf nicht-fermentativen C-Quellen wie z.B. Glycerin zu wachsen (MÉJEAN *et al.*, 1994). Für diese TorA-Signalsequenz (sigTorA) ist außerdem bereits der Export eines heterologen Proteins über den Tat-Weg gelungen, welches normalerweise über den Sec-Weg transportiert wird (CHRISTÓBAL *et al.*, 1999). Das TorA-Signalpeptid sollte im Rahmen dieser Arbeit den Export des B<sub>12</sub>-bindenden Proteins ermöglichen. Als Linker zwischen Signalsequenz und B<sub>12</sub>-Bindeprotein wurden die ersten fünf Aminosäuren des reifen TorA Proteins genommen (AQAAT).

Bei der Auswahl des Intrinsic Factors (IF) aus dem Menschen und der Methylmalonyl-CoA-Mutase (MMCoAM) aus *Propionibacterium shermanii* als B<sub>12</sub>-Bindeproteine war neben der hohen Bindekapazität (KRÄUTLER, 1998)) für B<sub>12</sub> (IF: 10<sup>12</sup> l/mol), auch die bereits vorhandene Kristallstruktur ausschlaggebend (EVANS und MANCIA, 1998; NEXØ, 1998).

Der menschliche IF ist einer von drei löslichen B<sub>12</sub>-bindenden Proteinen, die an der Aufnahme und dem Transport von B<sub>12</sub> beteiligt sind. Der IF wird im Magen produziert, bindet B<sub>12</sub> und transportiert es zu den intestinalen Zellen (KRÄUTLER, 1998). Cyano-, Hydroxy-, Methyl-, Adenosyl-B<sub>12</sub> werden dabei gleich gut gebunden. Der IF hat eine Größe von etwa 55 kDa, schrumpft aber nach der Bindung von B<sub>12</sub>. Weiterhin ist er stark glykosyliert, was aber von geringer Bedeutung für die Erkennung und Bindung des Cobalamins ist, dafür aber die Degradation des IF im intestinalen Kanal zu

verhindern scheint. Fehlen 12 % des C-terminalen Endes des IF so ist er nicht mehr in der Lage, B<sub>12</sub> zu binden (NEXØ, 1998).

Die MMC<sub>o</sub>AM ist ein  $\alpha\beta$ -Heterodimer mit einer Größe von 150 kDa. Sie katalysiert die Adenosyl B<sub>12</sub>-abhängige reversible Umwandlung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA. Die von *mutB* kodierte  $\alpha$ -Kette beinhaltet sowohl die N-terminale Substrat-Bindedomäne als auch die C-terminale B<sub>12</sub>-Bindedomäne (MANCIA *et al.*, 1996; MANCIA und EVANS, 1998). Deshalb wurde nur die  $\alpha$ -Untereinheit, kodiert durch *mutB*, für die Konstruktion eines Transporterproteins ausgewählt.

Für die Auswahl des Vektors zur Expression der Gene für die Signalsequenz und das B<sub>12</sub>- Bindeprotein musste zunächst berücksichtigt werden, dass viele Gram-negative B<sub>12</sub>-Produzenten wie *C. freundii* Ampicillin-resistent sind. Aus diesem Grunde wurden zunächst zwei verschiedene Expressionsvektoren ausgewählt, die alle die gleiche Expressionskassette enthalten (pMPPM-T4 $\Omega$ , pMPPM-A4 $\Omega$ ). Der erste Vektor kodiert für eine Tetracyclin-, und der zweite für eine Ampicillin-Resistenz. Da der B<sub>12</sub>-Produzent *E. blattae* nicht Ampicillin-resistent ist, wurde auch der Vektor mit Ampicillin-Resistenz ausgewählt. Beide Plasmide besitzen eine höhere Kopienzahl und einen Arabinose Promotor, der bei geeigneter Klonierung die Induktion der Proteinsynthese ermöglicht. Dabei werden *ara*-negative Stämme mit etwa 0,001 % und *ara*-positive Stämme mit ca. 1 % Arabinose induziert.

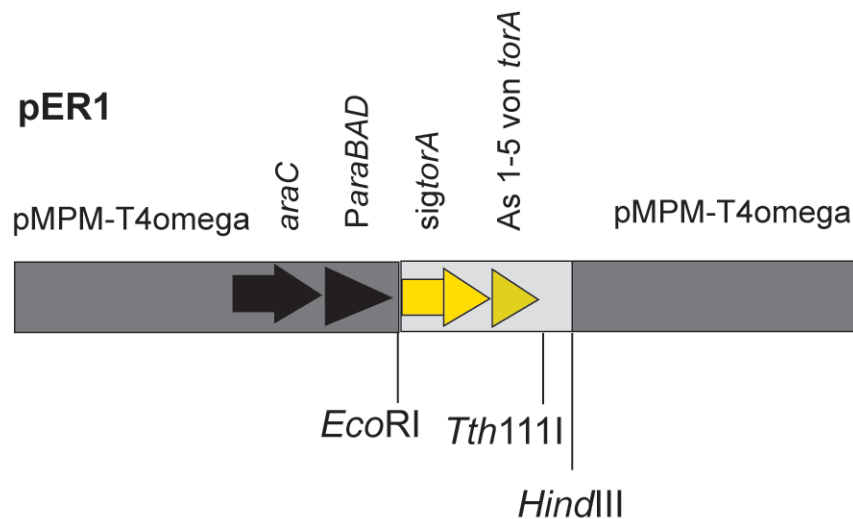
Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde noch auf andere Expressionsvektoren zurückgegriffen, die an entsprechender Stelle im Text erwähnt sind.

### 3.1.1 Fusion der Signalsequenz mit den B<sub>12</sub>-Bindeproteinen

#### 3.1.1.1 Klonierung von *sigtorA* mit dem *if*-Gen in den Vektor pMPPM-T4 $\Omega$

Um die Expression des gewünschten Gens in dem Vektor pMPPM-T4 $\Omega$  zu gewährleisten, musste die *torA*-Signalsequenz in die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors kloniert werden. Diese Vorarbeiten waren bereits von E. RÜNGELING durchgeführt worden. Dabei wurde die Sequenz, die für das Signalpeptid der TMAO-Reduktase (*torA*) kodiert mit sechs Oligopeptiden (siehe Tabelle 3) mittels PCR generiert (siehe 2.8). Die Anlagerung der Oligonukleotide erfolgte für jeweils 20 s bei 55 °C. Danach schloss sich die Polymerisation der DNA bei 72 °C für 20 s an, wobei 20 Zyklen durchlaufen wurden. Durch die geeignete Wahl der Oligopeptide wurde am 5'-terminalen Ende des Gens eine *EcoRI*-Schnittstelle inseriert und am 3'-terminalen Ende ein Linker angehängt, welcher der Sequenz für die ersten fünf Aminosäuren des reifen TorA-Proteins entsprach und eine *Th1111I*-Schnittstelle enthielt, über die die Sequenz des IF angehängt wurde. Außerdem enthält das PCR-Produkt am 3'-Ende eine

Erkennungssequenz für *HindIII*, die für die Klonierung in den pMPM-T4 $\Omega$  Vektor diente (siehe Tabelle 2). Das gereinigte 180 bp PCR-Produkt (siehe 2.6.3.5) wurde ebenso wie der Vektor mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut (siehe 2.9.1). Um eine Religation des Vektors zu verhindern wurde dieser zusätzlich einem *PstI*-Verdau unterzogen. Die beiden Komponenten wurden vor dem Einsatz in der Ligation gereinigt (siehe 2.6.3.4). Bei der anschließenden Klonierung wurde das auf dem pMPM-T4 $\Omega$  Plasmid vorliegende 2200 bp große  $\Omega$ -Interposon herausgeschnitten. Die korrekte Insertion wurde durch Sequenzierung bestätigt. Das resultierende Konstrukt wurde als pER1 bezeichnet und wies eine Größe von 4,8 kb auf (persönliche Mitteilung E. RÜNGELING).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Vektors pER1

In den Expressionsvektor pER1 konnte die Sequenz des IF über die *HindIII*- und *Tth111I*-Schnittstelle kloniert werden. Die dafür notwendigen Erkennungssequenzen des IF und die Sequenz für den C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag wurden über PCR mit den Oligonukleotiden IFMH5' und IFMH3' sowie dem Plasmid pHIF (siehe Tabelle 3 und Tabelle 2) als Matrize amplifiziert. Die Oligonukleotidanlagerung erfolgte für 40 s bei 62 °C und die Kettenverlängerung für 80 s bei 72 °C. Dabei wurden 25 Zyklen durchlaufen. Nach der Klonierung des 1,2 kb PCR-Fragmentes in den Vektor pER1 über die Restriktionsschnittstellen *Tth111I* und *HindIII* konnte die korrekte Insertion durch Sequenzierung bestätigt werden. Das entsprechende Konstrukt pTM1 umfasste eine Größe von 5,9 kb. Der C-terminale His<sub>6</sub>-Tag ermöglichte eine Detektion des Hybridproteins mit Hilfe von Western-Blot-Analysen (siehe 2.22.1).

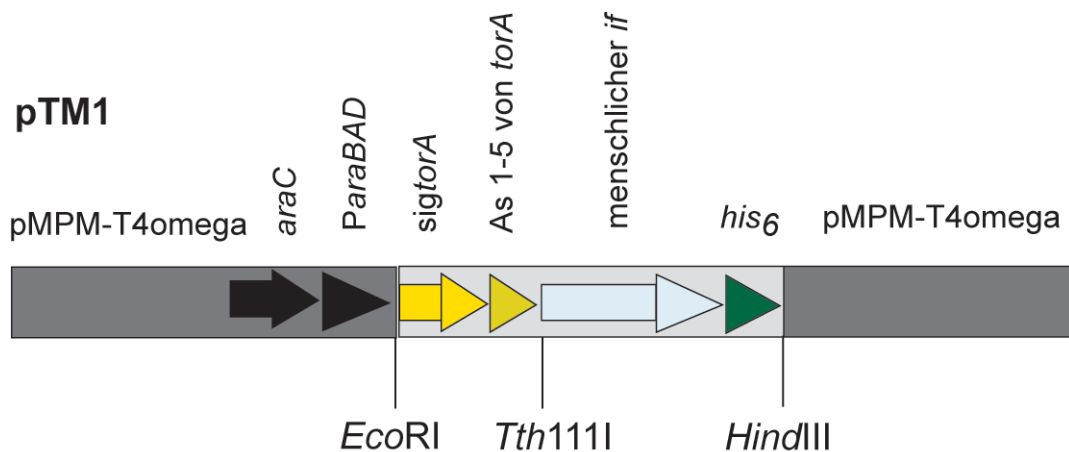


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Vektors pTM1

### 3.1.1.2 Klonierung von sigtorA mit mutB in den Vektor pMPPM-T4Ω

Die Fusion der *torA*-Signalsequenz mit dem *mutB*-Gen erfolgte, wie von BOLM 2000 beschrieben, ebenfalls über PCR. Der resultierende Vektor mit dem Namen pMB5 hatte eine Größe von 6,7 kb (siehe Tabelle 2).

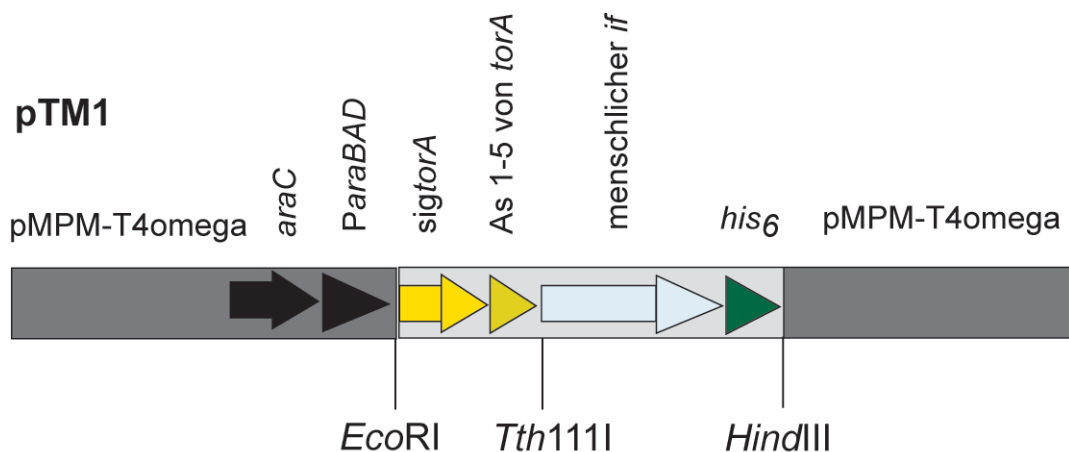


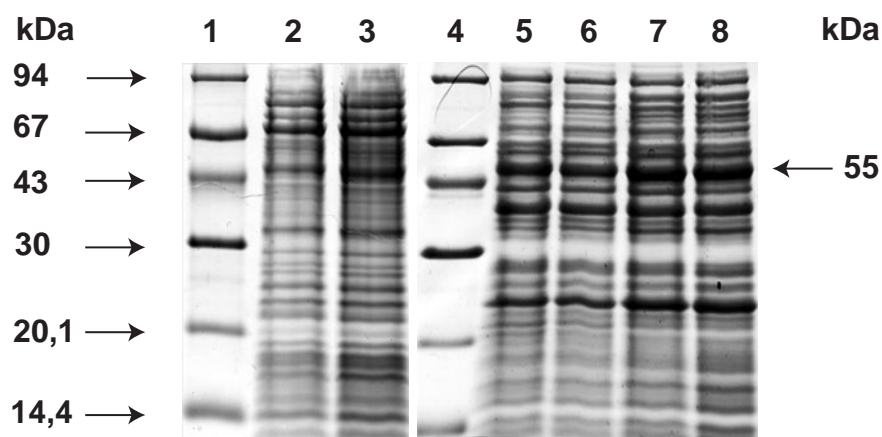
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vektors pMB5

## 3.2 Experimente zum Nachweis der Expression der sigtorA-if-Genfusion

Die einleitenden Studien zum Nachweis des heterolog produzierten sig-TorA-IF Proteins wurden mit dem Konstrukt pTM1 aerob in den *E. coli*-Stämmen DH5α, BL21(DE3) und JM109 durchgeführt. Als Expressionsvektor lag das Plasmid pMPPM-T4Ω zugrunde. Kontrollexperimente wurden mit dem Plasmid pER1

durchgeführt, welches nur für die Signalsequenz *sigtorA* und nicht für das *if*-Gen kodiert.

Die Anzucht der Hauptkulturen erfolgte wie unter 2.14.1 beschrieben in 100 ml LB-Medium. Die Induktion der Genexpression wurde bei einer  $OD_{600}$  von 0,4 durchgeführt. Die während des Wachstums gezogenen Proben wurden zur Analyse des Proteinmusters auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe 2.18.1). Dabei ließ sich in *E. coli* BL21 (DE3)/pTM3 im Verlauf des Experiments keine Veränderung im Proteinmuster erkennen, und eine zusätzliche Bande im Molekularmassenbereich von 55 kDa, welche dem sigTorA-IF-Hybridprotein entspricht, trat nicht auf. Auch durch den Stammwechsel fand keine Änderung statt (Daten nicht gezeigt). Somit erfolgte keine signifikante Produktion von IF, die mit Hilfe dieser Methode detektiert werden konnte. Zum Nachweis der Produktion des sigTorA-IF in geringen Mengen wurde daher eine sensitivere immunochemische Methode durchgeführt.



**Abbildung 9: Vergleich der SDS-PAGE-Analyse der Produktion von sigTorA und sigTorA-IF in *E. coli* BL21(DE3)**

Dargestellt ist ein 12 %iges SDS-Gel. Der Induktor ist in Klammern angegeben.

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: *E. coli* BL21(DE3)/pER1 (0,5 % Arabinose) direkt nach Induktion

Spur 3: *E. coli* BL21(DE3)/pER1 (0,5 % Arabinose) 2 h nach Induktion

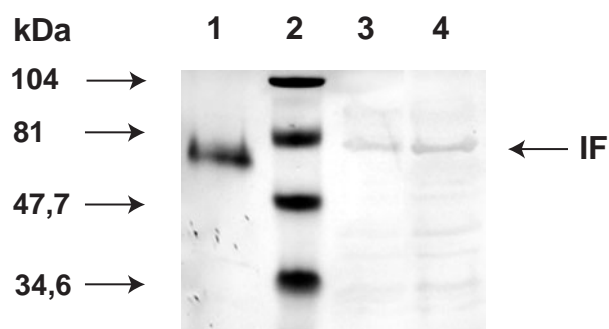
Spur 4: *E. coli* BL21(DE3) pTM1 (0,5 % Arabinose) direkt nach Induktion

Spur 5: *E. coli* BL21(DE3) pTM1 (0,5 % Arabinose) 1 h nach Induktion

Spur 6: *E. coli* BL21(DE3) pTM1 (0,5 % Arabinose) 2 h nach Induktion

Spur 7: *E. coli* BL21(DE3) pTM1 (0,5 % Arabinose) 3 h nach Induktion

Hierzu wurde Gesamtzellextrakt der Stämme DH5 $\alpha$  und BL21(DE3) aus den induzierten Kulturen gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte durch Western-Blot-Analyse mit polyklonalen gegen IF-gerichteten Antikörpern (siehe 2.22.1 und 2.23.1.2).



**Abbildung 10: Western-Blot mit Gesamtzellextrakten nach Expression von *sigtorA-if* in *E. coli* BL21(DE3) und DH5 $\alpha$**

Dargestellt ist eine mit IF-spezifischen Antikörpern behandelte und mit Peroxidase Substrat gefärbte Nitrocellulose-Membran nach Transfer der Proteine aus einem 12 %igen SDS-Gel.

Spur 1: nativer IF aus dem Schwein

Spur 2: prestained Proteinstandard

Spur 3: *E. coli* BL21(DE3)/pTM1 (0,5 % Arabinose)

Spur 4: *E. coli* DH5 $\alpha$ /pTM1 (0,5 % Arabinose)

Dabei zeigte sich, dass das Fusionsprotein in geringen Mengen gebildet worden war. In den Western-Blot-Analysen traten in den Kulturen der Stämme DH5 $\alpha$  und BL21(DE3) Signale im erwarteten Molekularmassenbereich auf (siehe Abbildung 10, Spuren 3 und 4). Diese Experimente belegten, dass prinzipiell eine heterologe Produktion des Intrinsic Faktors in *E. coli* erfolgte.

### 3.2.1 Expressionsstudien unter verschiedenen Bedingungen

Da nur wenig IF während der Expression gebildet worden war, sollten im Folgenden die Bedingungen während der Expressionsexperimente variiert und dadurch eine Optimierung der Produktion erwirkt werden.

Zunächst wurde die Konzentration des Induktors Arabinose variiert. Die Gene für *sigtorA-if* stehen unter der Kontrolle des *ParaBAD* Promotors, welcher durch Arabinose induzierbar ist. Die verwendeten Expressionsstämme von *E. coli* zählen zu den *ara*-positiven Stämmen, da sie im Besitz eines chromosomalen *ara*-Operons sind und somit auf Arabinose wachsen können. Gene, die unter der Kontrolle des *ParaBAD* Promotors stehen, erreichen bei *ara*-positiven Mikroorganismen eine maximale Induktion nach der Zugabe von 1 % Arabinose. Bei *ara*-negativen Organismen genügt schon eine Konzentration von 0,001 % an Arabinose (MAYER, 1995). Um die optimale Konzentration für die Induktion der *sigtorA-if* Expression zu bestimmen, wurde diese mit unterschiedlichen Arabinose-Konzentrationen von 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % und 1 % induziert.

Die 100 ml-Hauptkulturen wurden wie unter 2.14.1 beschrieben in LB-Medien angezogen. Es wurden jeweils bei 0 min, 1 h und 3 h nach Induktion mit verschiedenen Konzentrationen an Arabinose Proben entnommen und das Proteinmuster durch SDS-PAGE analysiert. Die SDS-PAGE-Analyse ließ erkennen, dass bei keiner der Proben aus den Expressionsversuchen mit verschiedenen Arabinosekonzentrationen eine zusätzliche Bande im erwarteten Molekularmassenbereich von IF auftrat. Unterschiede im Proteinmuster der verschiedenen Proben waren unabhängig von der eingesetzten Arabinosekonzentration nicht zu verzeichnen. Die entsprechenden Western-Immunoblots zeigten keine Signale bei Arabinosekonzentrationen unter 0,5 % und keine stärkeren Signale bei Konzentrationen von 0,5 % und 1 % im Vergleich zu der in Abbildung 10 gezeigten Signalstärke (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde in weiteren Studien mit diesem Expressionssystem bei *ara*-positiven Stämmen eine Arabinosekonzentration von 1 % eingesetzt.

Als nächstes wurden Experimente mit und ohne Zusatz von B<sub>12</sub> durchgeführt. *E. coli* gehört zu den Mikroorganismen, die nicht in der Lage sind B<sub>12</sub> selbst zu synthetisieren und muss es deshalb aus dem umgebenden Milieu aufnehmen. In den Experimenten zur Expression des *sigtorA-if* Hybridgens in *E. coli*-Stämmen fand die Anzucht der Hauptkultur in LB-Medium (siehe 2.2.3) statt. In dem zur Herstellung des LB-Mediums verwendeten Hefeextrakts befinden sich grundsätzlich auch geringe Mengen an B<sub>12</sub>. Die Sättigung von IF mit B<sub>12</sub> half, das Protein gegen Protease-Aktivitäten zu stabilisieren (GORDON, *et al.*, 1997). Um auszuschließen, dass die geringe Produktion des IF an einer zu niedrigen Konzentration von B<sub>12</sub> im Medium lag, wurden Expressionsexperimente in Gegenwart von zugesetztem B<sub>12</sub> (2-4 µg/ml Medium) durchgeführt. Es wurden drei 500 ml-Kulturen verwendet, wobei die erste kein zusätzliches B<sub>12</sub> erhielt, den beiden anderen Kulturen aber 1 bzw. 2 mg B<sub>12</sub> zugefügt wurde. Die Probenentnahme erfolgte direkt vor der Induktion der *sigtorA-if* Expression und 3 h danach. Beim Vergleich der Proben im SDS-Polyacrylamidgel wies keine der 3 h nach Induktion entnommenen Proben aus den unterschiedlichen Kulturen eine zusätzliche oder stärker hervortretende Bande im Molekularmassenbereich des Proteins auf (Daten nicht gezeigt). Der korrespondierende Western-Blot wies keinen Unterschied bei der produzierten Menge an IF in Abhängigkeit von zugeführtem B<sub>12</sub> auf. Die erhöhte B<sub>12</sub>-Konzentration im Medium führte also zu keiner verbesserten heterologen Produktion des Hybridproteins sigTorA-IF in *E. coli*.

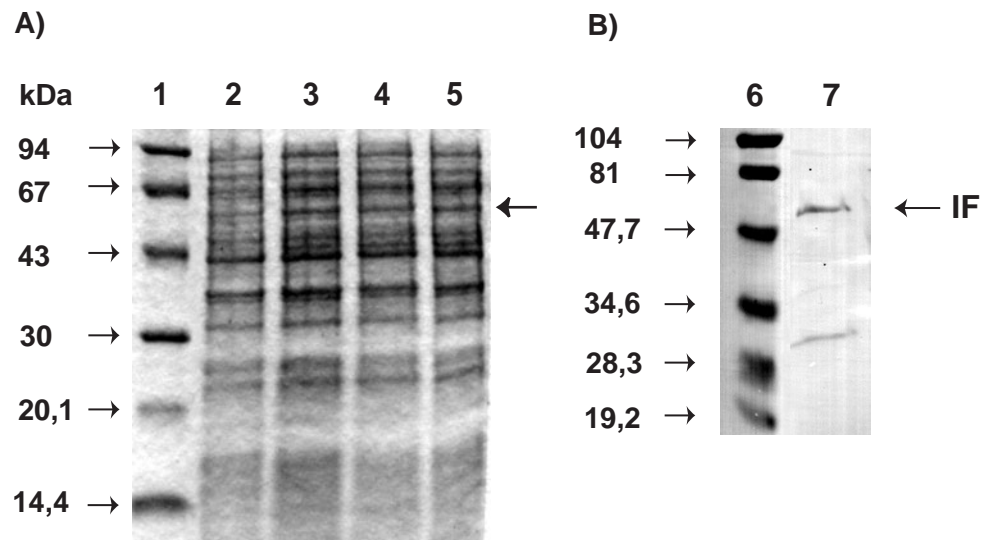
Weiterhin erfolgten Studien bei geringerer Wachstumstemperatur. Die heterologe Expression fremder Gene stellt eine hohe und zusätzliche Belastung für die Zelle dar. Die Verringerung der Wachstumstemperatur hat zu Folge, dass die Zellen langsamer wachsen und somit auch die Produktion des sigTorA-Proteins verlangsamt wird. Ein mögliches zeitliches Problem bei der Produktion, korrekten Faltung, B<sub>12</sub>-Bindung und



anschließenden Translokation des Intrinsic Faktors könnte durch eine geringere Wachstumstemperatur umgangen werden. Die 500 ml-Kulturen von *E. coli* DH5 $\alpha$  /pTM1 in LB-Medium wurden bei 30 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 angezogen und nach der Induktion mit Arabinose für 5 h bis zu einer OD<sub>600</sub> von 2,3 bei 28 °C inkubiert. Bei der anschließenden SDS-PAGE-Analyse der Proben, ließ sich allerdings wie bei den zuvor bei 37 °C angezogenen Kulturen keine zusätzliche Bande im Molekularmassenbereich von IF nachweisen. Die Analyse der Proben durch Western-Immunoblot war ebenfalls negativ. Die Expressionsstudien wurden deshalb im weiteren bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt.

Da die bisherigen Bedingungsänderungen während der Expression in *E. coli* zu keiner gesteigerten Produktion von IF geführt hatten, sollte die Expression von *sigtorA-if* in dem B<sub>12</sub>-Produzenten *C. freundii* überprüft werden. Dabei fanden die Expressionstudien sowohl aerob (nicht B<sub>12</sub>-produzierende Bedingungen) als auch anaerob mit Glycerin als einziger C-Quelle (B<sub>12</sub>-produzierende Bedingungen) statt. *Citrobacter freundii* gehört zu den Organismen, die anaerob ohne externe Elektronenakzeptoren mit Glycerin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen können. Glycerin unterliegt dabei einer Disproportionierung. Die Enzyme des oxidativen Zweigs setzen Glycerin zu Dihydroxyacetonphosphat um. Die dabei anfallenden Reduktionsäquivalente werden im reduktiven Zweig verbraucht. Die Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängige Glycerin-Dehydratase bildet dabei aus Glycerin 3-Hydroxypropionaldehyd, der anschließend weiter zu 1,3-Propandiol reduziert wird (DANIEL *et al.*, 1995 a und b, ABELES *et al.*, 1961). Durch die B<sub>12</sub>-Abhängigkeit der Glycerin-Dehydratase ist nur dann ein anaerobes Wachstum von *C. freundii* in B<sub>12</sub>-freiem Mineralmedium mit Glycerin als einziger Kohlenstoff-Quelle möglich, wenn der Organismus das benötigte B<sub>12</sub> *de novo* synthetisiert.

Die aeroben Expressionsstudien in *C. freundii* mit dem Plasmid pTM1 fanden in 50 ml Hefe-Pepton-Medium (siehe 2.2.2) statt. Die anaerobe heterologe Expression von *sigtorA-if* in *C. freundii* wurde in 5 ml Hungate-Röhrchen in Mineralmedium (siehe 2.2.1) vorgenommen. Da der Organismus unter anaeroben Bedingungen eine geringere Wachstumsrate hatte, wurde die Genexpression von *sigtorA-if* über 24 h verfolgt. Die Induktion der Transkription erfolgte ebenfalls mit Arabinose. Die während des Wachstums gezogenen Proben wurden zur näheren Untersuchung auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe Abbildung 11 und Abbildung 9).



**Abbildung 11: Analyse der aeroben Produktion des Fusionsproteins sigTorA-IF in *C. freundii* durch SDS-PAGE (A) und Western-Immunoblot (B)**

(A) Gesamtzellextrakte (je 7  $\mu$ l) wurden im 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt (siehe 2.17.1), das mit Coomassie-Blau gefärbt wurde. Die Pfeile kennzeichnen das produzierte Protein.

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: *C. freundii*/pTM1 vor Induktion

Spur 3: *C. freundii*/pTM1 1 h nach Induktion

Spur 4: *C. freundii*/pTM1 2 h nach Induktion

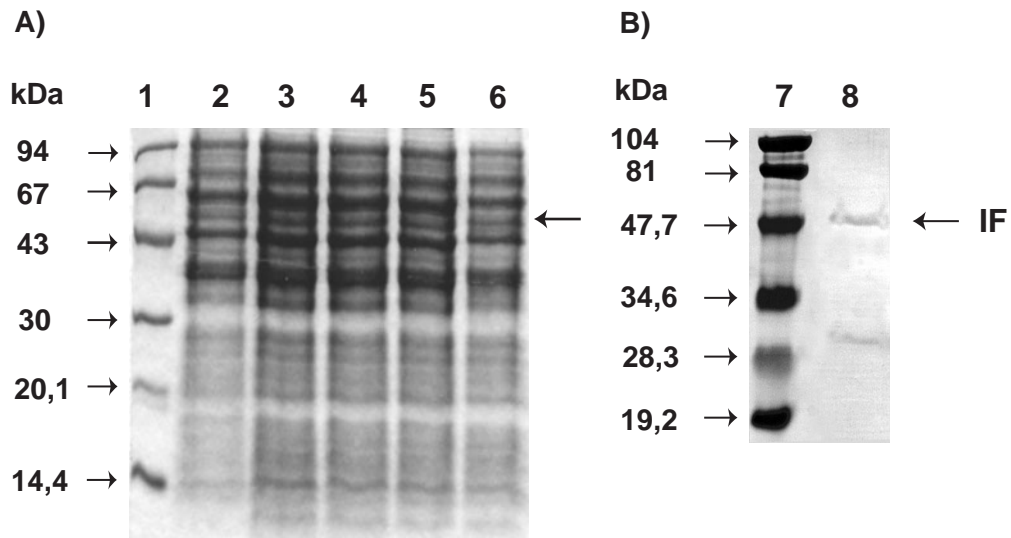
Spur 5: *C. freundii*/pTM1 3 h nach Induktion

(B) Nachweis des N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags von sigTorA-IF mit Hilfe der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Färbung (siehe 2.23.1.1).

Spur 6: Proteinstandard

Spur 7: Gesamtzellextrakt von *C. freundii*/pTM1 3 h nach Induktion

Bei der aeroben heterologen Produktion von sigTorA-IF zeigte die SDS-PAGE-Analyse im erwarteten Bereich von 55 kDa eine Bande, die im Verlauf des dreistündigen Induktionsexperiments stärker hervortrat (siehe Abbildung 11 A). Dass es sich dabei um das Hybridprotein sigTorA-IF handelte, wurde anschließend im Western-Blot durch Detektion des His<sub>6</sub>-Tags mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat nachgewiesen (siehe 2.22.1 und 2.23.1.1). Neben der gefärbten Bande des sigTorA-IF Proteins trat noch eine weitere bei etwa 30 kDa auf. Bei dieser handelt es sich vermutlich um ein wirtseigenes, histidinreiches Protein, das im Zuge der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugatbehandlung mitangefärbt wurde.



**Abbildung 12: Analyse der anaeroben Produktion von sigTorA-IF durch SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B)**

(A) Je 7  $\mu$ l Gesamtzellextrakt wurden im 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt (siehe 2.18.1), das anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt wurde. Die Pfeile kennzeichnen das produzierte Protein.

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: *C. freundii*/pTM1 vor Induktion

Spur 3: *C. freundii*/pTM1 2 h nach Induktion

Spur 4: *C. freundii*/pTM1 4 h nach Induktion

Spur 5: *C. freundii*/pTM1 6 h nach Induktion

Spur 6: *C. freundii*/pTM1 24 h nach Induktion

(B) Nachweis des N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags von sigTorA-IF mit Hilfe der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Färbung (siehe 2.23.1.1)

Spur 7: Proteinstandard

Spur 8: Gesamtzellextrakt von *C. freundii* pTM1 24 h nach Induktion

Bei der SDS-PAGE Analyse, der während des anaeroben Wachstums gezogenen Proben, ließ sich allerdings keine stärker hervortretende Bande im Bereich von 55 kDa nachweisen (siehe Abbildung 12 A). Die Untersuchung des Gesamtzellextraktes (Probe 24 h nach Induktion) aus der anaerob induzierten Kultur von *C. freundii*/pTM1 zeigte im Western-Blot (siehe 2.22.1), dass auch unter anaeroben B<sub>12</sub>-produzierenden Bedingungen das Hybridprotein sigTorA-IF gebildet worden war (siehe Abbildung 12 B). Der Nachweis des His<sub>6</sub>-Tags erfolgte mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat. Auch in diesem Fall wurde ein histidinhaltiges Wirtsprotein aus *C. freundii* bei der Behandlung mitangefärbt. Damit konnte ebenfalls in dem B<sub>12</sub>-Produzenten *C. freundii* die heterologe Produktion von sigTorA-IF nachgewiesen werden.

Das B<sub>12</sub> im Cytoplasma einer Bakterienzelle soll nach dem entwickelten Modell zusammen mit dem Intrinsic Faktor ins Periplasma transloziert werden. Nachdem gezeigt worden ist, dass der Intrinsic Faktors sowohl in nicht B<sub>12</sub>-produzierenden *E. coli*-Stämmen (DH5 $\alpha$  und JM109) als auch in dem B<sub>12</sub>-Produzenten *C. freundii*

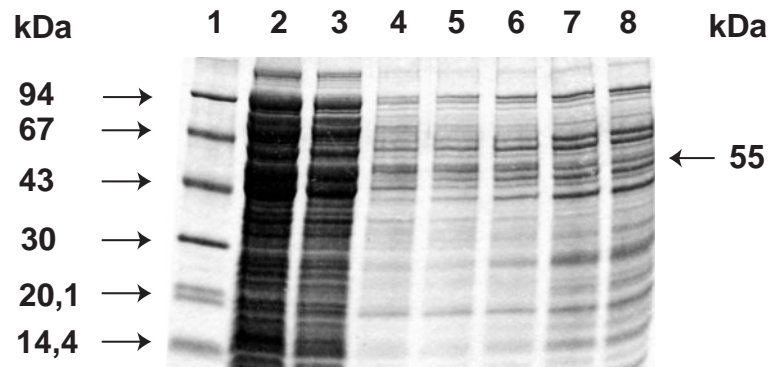
heterolog gebildet wurde, war es notwendig den Transport von IF ins Periplasma nachzuweisen. Da das sigTorA-IF sowohl in den Gesamtzellextrakten von *E. coli*/pTM1, als auch von *C. freundii*/pTM1 nur in geringen Mengen detektiert wurde, konnte von einer noch geringeren Konzentration des Hybridproteins im Periplasma ausgegangen werden. Daher erschien eine Konzentrierung vor der Western-Blot-Analyse notwendig.

### **3.2.2 Experimente zum Nachweis der periplasmatischen Translokation des sigTorA-IF-Hybridproteins**

Der C-terminale klonierte His<sub>6</sub>-Tag des *sigtorA-if*-Gens ermöglicht nicht nur die Detektion des Zielproteins im Western-Blot, sondern bietet auch die Möglichkeit das sigTorA-IF Protein über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose zu reinigen. Mit dieser Reinigung ist gleichzeitig auch die Konzentrierung des Proteins verbunden. Um zu überprüfen, ob die Reinigungsmethode über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose für dieses Hybridprotein auch zu einer Konzentrierung von sigTorA-IF führt, wurde die Reinigung mittels Metall-Chelat-Affinitätschromatographie zunächst an Rohextrakten und erst später an periplasmatischen Fraktionen vorgenommen.

#### **3.2.2.1 Nachweis des Intrinsic Faktors im Rohextrakt nach Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie**

Nach der Produktion des sigTorA-IF Proteins mit Hilfe des Plasmids pTM1 in *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden die Zellen aufgeschlossen und der Rohextrakt daraus präpariert (siehe 2.15.2). Das Enzym konnte dann aus dem Rohextrakt über den C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag durch eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographie mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose unter nativen Bedingungen konzentriert werden (siehe 2.21.1.2).



**Abbildung 13: SDS-PAGE-Analyse der Konzentrierung des sigTorA-IF Proteins aus dem Rohextrakt über Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose unter nativen Bedingungen**

Das 12 % ige SDS-Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Spur 1: Proteinstandard

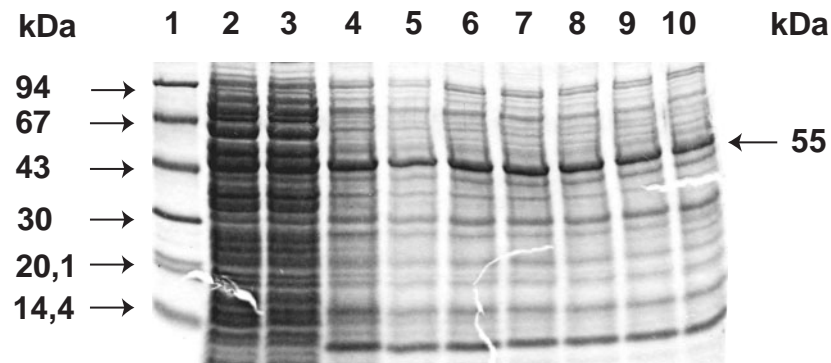
Spur 2: Durchlauf

Spur 3-4: Waschfraktion 1 und 2

Spur 5-8: Eluat 1-4

Wie man aus Abbildung 13 entnehmen kann, konnte das Protein durch Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose nicht erfolgreich gereinigt und konzentriert werden. Trotz der geringen Konzentration an Imidazol während der Bindung und der Waschschrte, konnte eine Bindung von kontaminierenden Proteinen an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix nicht verhindert werden. Die Eluate (siehe Abbildung 13, Spuren 5-8) beinhaltenen trotz der beiden Waschschrte noch große Mengen an Fremdprotein. In den vier Spuren der Eluate war zwar eine schwache Bande bei 55 kDa zu erkennen, die in den letzten beiden Schritten noch stärker hervortrat, aber parallel dazu wurde eine Vielzahl von Fremdproteinen ebenfalls eluiert.

Die Konzentrierung von sigTorA-IF aus dem Rohextrakt mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose nach der Expression der korrespondierenden Gene in *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde anschließend unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (siehe 2.21.1.3), da die native Konzentrierung zu keinem Reinigungserfolg geführt hatte. Die denaturierende Methode ermöglicht es, sowohl unlösliche als auch Proteine, bei denen der His<sub>6</sub>-Tag aufgrund der Proteinstruktur nicht frei zugänglich ist, einzusetzen. Der His<sub>6</sub>-Tag wird dabei vollständig entfaltet, so dass die Bindung an die Ni-NTA-Matrix verbessert und somit die Effizienz der Konzentrierung erhöht wird (WINGFIELD, 1995). Der Rohextrakt wurde ebenfalls, wie bei der Konzentrierung unter nativen Voraussetzungen beschrieben, präpariert und anschließend zur Konzentrierung auf eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarosesäule aufgetragen.



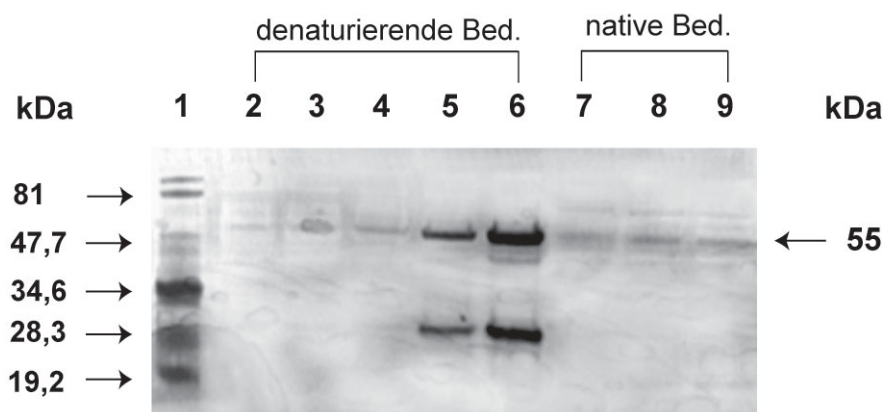
**Abbildung 14: SDS-PAGE-Analyse der Konzentrierung des sigTorA-IF Proteins aus dem Rohextrakt über Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen**

Das 12% ige SDS-Gel wurde mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt.

- Spur 1: Proteinstandard
- Spur 2: Durchlauf
- Spur 3-4: Waschfraktion 1 und 2
- Spur 5-8: Eluat 1-4
- Spur 9-10: Eluat 5-6

Aus Abbildung 14 wird deutlich, dass neben dem sigTorA-IF noch eine Reihe weiterer Proteine unspezifisch an das Säulenmaterial gebunden hatten. Die insgesamt vier Waschschrte reichten nicht aus, um die zusätzlich an die Säule gebundenen Fremdproteine abzutrennen. Dennoch ist im Vergleich zur Konzentrierung unter nativen Bedingungen zu erkennen, dass insgesamt zwei Banden, eine bei 55 kDa und eine kleinere Bande bei 10 kDa (siehe Abbildung 14, Spur 5-10), eine deutlich höhere Intensität im Vergleich zu den restlichen Proteinen aufwiesen. Die Methode unter denaturierenden Bedingungen führte demnach zu einer Verbesserung der Konzentrierungseffizienz des sigTorA-IF Hybridproteins.

Anschließend wurden die Proben aus den beiden Konzentrierungsprozeduren im Western-Blot analysiert. Mit Hilfe der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugatfärbung konnte die Identität der 55 kDa sigTorA-IF Bande nachgewiesen werden. Die größte Menge an Protein enthielten zwei Eluate aus der denaturierenden Aufreinigung. Da das sigTorA-IF Protein nach der Produktion nicht in unlöslichen Aggregaten vorliegt, kann davon ausgegangen werden, dass der His<sub>6</sub>-Tag ohne Zusatz von denaturierenden Agenzien nicht vollständig zugänglich ist. Es ließ sich also festhalten, dass eine Konzentrierung über Metall-Chelat-Affinitätschromatographie möglich ist. In weiteren Experimenten sollte eine Konzentrierung des sigTorA-IF aus dem Periplasma deshalb nach der Methode unter denaturierenden Bedingungen erfolgen.



**Abbildung 15: Nachweis des C-terminalen His<sub>6</sub>-Tags des konzentrierten Proteins sigTorA-IF mit Hilfe der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat-Färbung**

Dargestellt ist eine mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat gefärbte Nitrocellulose-Membran (siehe 2.23.1.1) nach Transfer der Proteine aus einem 12 %igen SDS-Gel.

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Waschschrift 2 aus der Konzentrierung unter denaturierenden Bedingungen

Spur 3-6: Eluate 3-6 aus der Konzentrierung unter denaturierenden Bedingungen

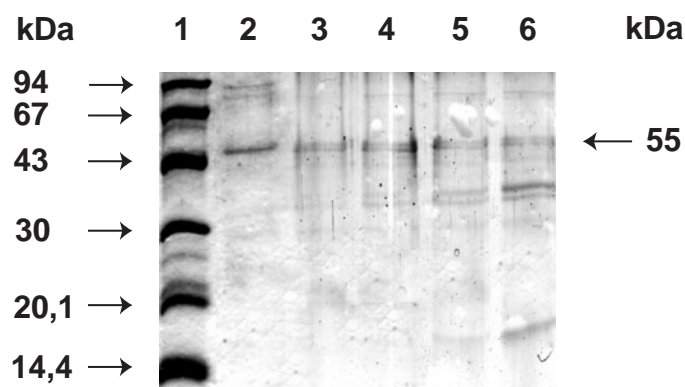
Spur 7-9: Eluate 2-4 aus der Konzentrierung unter nativen Bedingungen

### 3.2.2.2 Nachweis des Intrinsic Faktors im Periplasma nach Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie

Voraussetzung für einen B<sub>12</sub>-Exporter ist die Translokation des Bindeproteins ins Periplasma. Im Folgenden sollte der Transport des sigTorA-IF Proteins aus dem Cytoplasma ins Periplasma nachgewiesen werden. Dazu wurden Induktionsexperimente in *E. coli* und *C. freundii* durchgeführt und das Periplasma zunächst nach dem Protokoll von SAMBROCK *et al.*, 1989 präpariert (siehe 2.15.5.1).

### 3.2.2.3 Konzentrierung des Intrinsic Faktors unter denaturierenden Bedingungen

Es wurde eine Konzentrierung von sigTorA-IF im Periplasma angestrebt, um die Detektion des Hybridproteins in dieser Fraktion zu erleichtern. Die Anzucht der *E. coli*/pTM1-Kulturen erfolgte wie unter 2.14.1 beschrieben in einem Volumen von 500 ml. Drei Stunden nach Induktion der Kultur mit Arabinose wurden die Zellen geerntet und anschließend das Periplasma präpariert (siehe 2.15.5.1). Das sigTorA-IF Protein der periplasmatischen Fraktion konnte anschließend mit Hilfe des His<sub>6</sub>-Tags über die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie konzentriert werden (siehe 2.21.1.3).



**Abbildung 16: SDS-PAGE-Analyse der Konzentrierung des sigTorA-IF Proteins aus dem Periplasma über Affinitätschromatographie an  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen**

Die Färbung des SDS-Gels erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

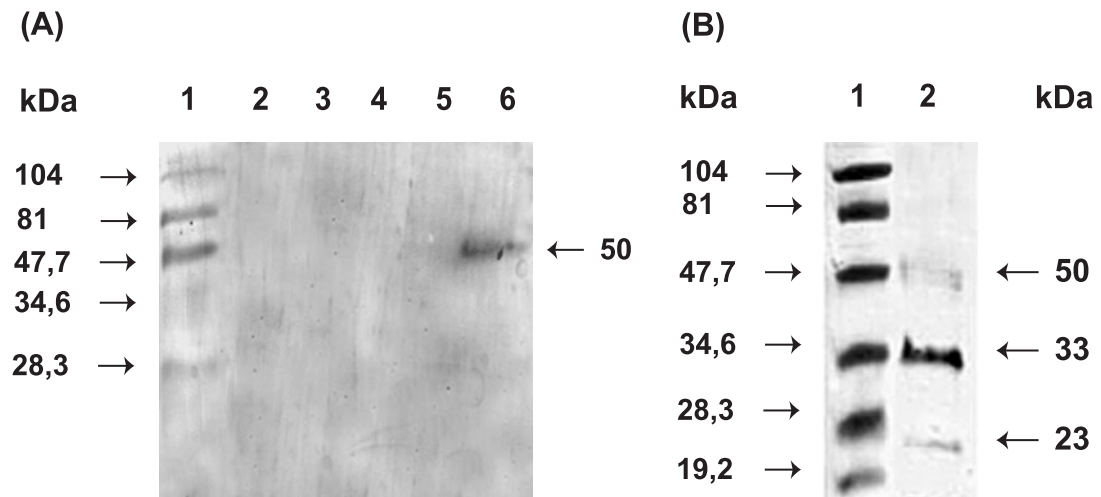
Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Waschfraktion der Konzentrierung unter denaturierenden Bedingungen

Spur 3-6: Eluate 1-4 aus der Konzentrierung unter denaturierenden Bedingungen

Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass bereits im Waschschriff eine Bande im Bereich von 55 kDa des sigTorA-IF auftrat (siehe Abbildung 16, Spur 2), die sich auch in den Eluaten wiederfand (siehe Abbildung 16, Spuren 3-6). Zusätzlich wurden in der letzten Elutionsfraktion noch zwei kleinere Proteine (36 kDa und 16 kDa) von der Säule abgelöst, wobei es sich vermutlich um die unspezifische Bindung eines Wirtsproteins mit Histidin-Resten handelte. Die Identität des SigTorA-IF Proteins konnte in dem korrespondierenden Western-Blot in Eluatfraktion 2 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17 A, Spur 6). In allen anderen Fraktionen der Konzentrierung des Periplasmas wurde kein Signal erhalten. Die Proben aus der Eluaten 1-4 wurden anschließend zusammen über Ausschlusschromatographie mit Hilfe von Centrisart-Röhrchen (siehe 2.17.2) weiter konzentriert und erneut einer Western-Blot-Analyse unterzogen (siehe 2.22.1). Wie in Abbildung 17 zu erkennen, konnte in der Eluatfraktion eine schwache Bande bei etwa 50 kDa und zwei weitere bei 33 kDa und 23 kDa (siehe Abbildung 17, Spur 2) detektiert werden. Bei diesen zusätzlichen Banden könnte es sich wiederum um histidinhaltige *E. coli* Wirtsproteine handeln oder aber um Degradationsprodukte des sigTorA-IF-Fusionsproteins.





**Abbildung 17: Western-Blot-Analysen zum Nachweis von sigTorA-IF im Periplasma nach Konzentrierung über Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (A) und Einengung über Centrisart-Röhrchen (B)**

**(A)** Über Affinitätschromatographie konzentriertes sigTorA-IF wurde mit Hilfe des C-terminalen His<sub>6</sub>-Tags nachgewiesen.

Dargestellt ist eine PVDF-Membran nach Transfer der Proteine aus einem 12 %igen SDS-PAGE (siehe 2.18.1).

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Waschfraktion der Konzentrierung des Periplasmas unter denaturierenden Bedingungen

Spur 3 und 4: Eluat 3 und 4 der Konzentrierung des Periplasmas unter denaturierenden Bedingungen

Spur 5 und 6: Eluat 1 und 2 der Konzentrierung des Periplasmas unter denaturierenden Bedingungen

**(B)** Nachweis des über Ausschlusschromatographie weiter konzentrierten sigtorA-IF im Western-Blot.

Dargestellt ist eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat gefärbte PVDF Membran (siehe 2.23.1.1) nach Transfer der Proteine aus einem 12 %igen SDS-Gel (siehe 2.18.1).

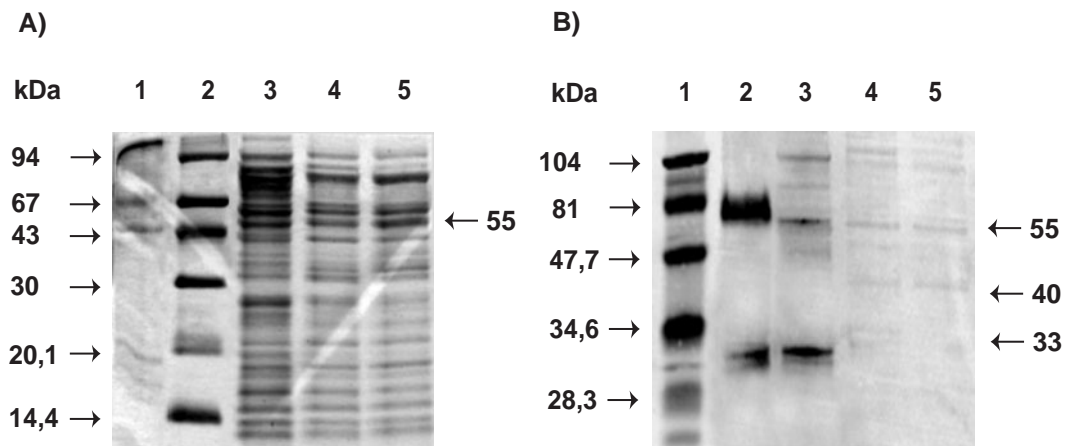
Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Eluatfraktionen 1-4 aus (A) weiter eingengt

Die Konzentrierung des sigTorA-IF über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie und die anschließende weitere Einengung der erhaltenen Eluate mit Hilfe der Centrisart-Röhrchen ermöglichten es, dass Hybridprotein im Periplasma nachzuweisen. Dennoch konnte nur ein geringer Konzentrierungserfolg verzeichnet werden. Aus diesem Grund sollte nach einer alternativen Methode gesucht werden, um die Menge von sigTorA-IF im Periplasma signifikant zu erhöhen und damit die Detektion des Proteins im Western-Blot zu verbessern.

Im weiteren wurde an Stelle von Affinitäts- und Ausschlusschromatographie die fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung zur Konzentrierung von sigTorA-IF aus der periplasmatischen Fraktion eingesetzt. Die Anzucht von *E. coli*/pTM1 erfolgte in 500 ml LB-Medium. Anschließend wurde das Periplasma, wie unter 2.15.5.2 beschrieben, präpariert. Die Fällung der Proteine erfolgte in 10 % Schritten (siehe

2.21.1.5). Daraufhin wurden Proben aus den einzelnen Fraktionen durch SDS-PAGE aufgetrennt und einem Western-Immunoblot unterzogen (siehe 2.22.1).



**Abbildung 18: Analyse der Anreicherung von sigTorA-IF im Periplasma mittels Ammoniumsulfatfällung durch SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B)**

**(A)** SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie-Blau wurden wie unter 2.18.1 und 2.19.1 durchgeführt.

Spur 1: nativer IF aus dem Schwein

Spur 2: Proteinstandard

Spur 3: Periplasma-Probe aus der Sättigung mit 60 % Ammoniumsulfat

Spur 4: Periplasma-Probe aus der Sättigung mit 70 % Ammoniumsulfat

Spur 5: Periplasma-Probe aus der Sättigung mit 80 % Ammoniumsulfat

**(B)** Dargestellt ist eine mit polyklonalen IF-spezifischen Antikörpern behandelte PVDF-Membran.

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: nativer IF aus dem Schwein

Spur 3: Periplasma-Probe aus der Sättigung mit 60 % Ammoniumsulfat

Spur 4: Periplasma-Probe aus der Sättigung mit 70 % Ammoniumsulfat

Spur 5: Periplasma-Probe aus der Sättigung mit 80 % Ammoniumsulfat

Dabei zeigte sich, dass nur die periplasmatischen Proben aus der Sättigung mit 60-80 % Ammoniumsulfat auch im Western-Blot ein Signal für das sigTorA-IF Hybridprotein bei etwa 55 kDa lieferten. Diese Proben enthielten noch zwei weitere kleinere Banden, eine bei 40 kDa und eine bei 33 kDa. Das stärkste Signal bei 55 kDa enthielt die Fraktion aus der Sättigung mit 60 % Ammoniumsulfat. Allerdings führte auch diese Methode nicht zu einer signifikant höheren Konzentration des sigTorA-IF Hybridproteins im Periplasma. Diese Methode wurde ebenfalls unter B<sub>12</sub>-produzierenden Bedingungen in *C. freundii*/pTM1 durchgeführt. Dies ergab hinsichtlich der Menge an transloziertem sigTorA-IF im Periplasma ein vergleichbares Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

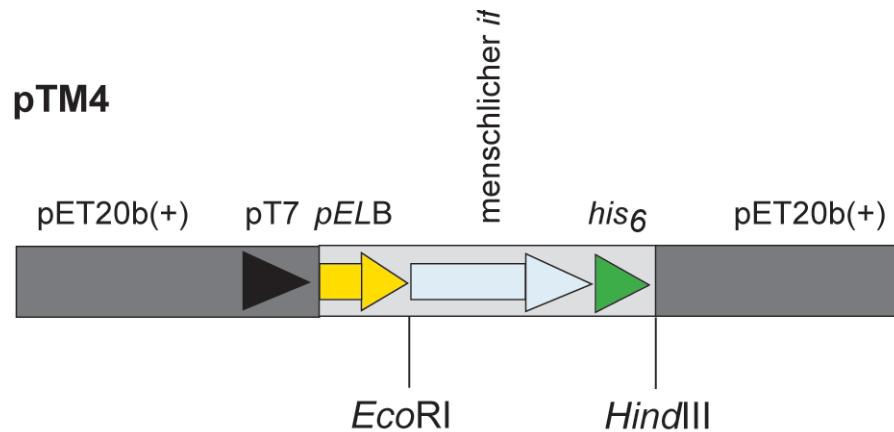
Ferner wurden verschiedene Methoden zur Präparation des Periplasma ausprobiert. Keine der unter 2.15.5 beschriebenen Methoden führte zu einer gesteigerten Menge an detektierbarem sigTorA-IF-Fusionsprotein im Periplasma.

Trotz der geringen Menge an Intrinsic Faktor, der im Periplasma nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob es durch den Einsatz des B<sub>12</sub>-Exporters zu einem Transport des Coenzym B<sub>12</sub> ins Periplasma kommt. Mit Hilfe des B<sub>12</sub>-Plattentests (KRZYCKI und ZEIKUS, 1980; modifiziert) ist es möglich, Corrinioide quantitativ nachzuweisen (siehe 2.27.1). Im folgenden sollte der Gehalt an B<sub>12</sub> in der periplasmatischen Fraktion verschiedener Stämme von *C. freundii* bestimmt werden. Die Anzucht von *C. freundii*/pTM1, *C. freundii*/pER1 und dem Wildtyp von *C. freundii* erfolgte anaerob in 500 ml Mineralmedium (siehe 2.2.1) und die Expression von *sigtorA-if* in pTM1 wurde mit Arabinose induziert. Um einen gemeinsamen Bezugspunkt zu haben, wurden die präparierten periplasmatischen Proben (siehe 2.15.5.4) anschließend alle auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt (0,6 mg/ml). Die Auswertung der Platten zeigte, dass im Periplasma von *C. freundii*/pTM1 im Vergleich zu *C. freundii*/pER1 und dem Wildtyp kein B<sub>12</sub> nachgewiesen werden konnte.

### 3.2.3 Variation des Transportweges

Der Transport des Intrinsic Faktors ins Periplasma wurde mit Hilfe der Signalsequenz der periplasmatischen TMAO-Reduktase durchgeführt. Der Transport erfolgte dabei über den Tat-Weg. Der Austausch dieser Signalsequenz sollte klären, ob durch die Nutzung eines anderen Transportweges mehr IF ins Periplasma transloziert wird. Deshalb wurde die *torA*- gegen die *pelB*-Signalsequenz ersetzt. Das *pelB*-Gen kodiert für die periplasmatisch lokalisierte Pektat-Lyase B aus *Erwinia caratovora* (LEI *et al.*, 1987). Diese Signalsequenz ermöglicht den Transport des rekombinanten Proteins ins Periplasma über den sogenannten Sec-Weg.

Der eingesetzte Vektor pET20b(+) gehört zu den Vektoren der pET-Serie und besitzt eine *pelB*-Signalsequenz. Das pET-System ist ein häufig verwendetes System zur Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*. Es basiert auf dem T7-RNA-Polymerase/Promotor-System, das durch IPTG induzierbar ist. Der verwendete Wirtstamm ist *E. coli* BL21(DE3), der das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors auf dem Chromosom trägt (STUDIER *et al.*, 1990).



**Abbildung 19: Schematische Darstellung des Vektors pTM4**

Für die Klonierung in den Vektor pET20b(+) wurde das *if*-Gen über PCR mit den Oligonukleotiden IF/*EcoRI* und IF/*HindIII*r sowie dem Plasmid pHIF als Matrize amplifiziert (siehe Tabelle 3 und Tabelle 2). Die Anlagerung der Oligonukleotide erfolgte bei 60 °C für 1 min. Es schloss sich eine Polymerisation der DNA bei 72 °C für 1:15 min an, wobei 25 Zyklen durchlaufen wurden. Das amplifizierte *if*-Gen wies am 5'-Ende eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI* und am 3'-Ende eine Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *HindIII* auf. Das gereinigte PCR-Produkt wurde ebenso wie der Vektor mit den Enzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut in den Vektor pET20b(+) ligiert. Die korrekte Insertion wurde durch Sequenzierung bestätigt. Das entsprechende Konstrukt wurde als pTM4 bezeichnet (siehe Tabelle 2).

Für die Produktion des IF wurde eine 100 ml-Kultur von *E. coli* BL21 (DE3)/pTM4, wie unter 2.14.2 beschrieben, angezogen. Anschließend erfolgte die Präparation des Periplasmas (siehe 2.15.5.2). Es wurden Gesamtzellextrakt- und Periplasma-Proben nach der Auftrennung im SDS-Gel auf eine PVDF-Membranen übertragen und zum einen mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat und zum anderen mit polyklonalen gegen IF gerichteten Antikörpern behandelt (siehe 2.23.1.2). Dabei erbrachte die Färbung mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat weder im Gesamtzellextrakt noch im Periplasma ein Signal im erwarteten Molekularmassenbereich von 55 kDa. Die Behandlung mit den polyklonalen Antikörpern zeigte hingegen nur im Gesamtzellextrakt eine schwache 55 kDa Bande von sigTorA-IF (Daten nicht gezeigt). Dies ließ die Vermutung zu, dass zwar eine Expression stattgefunden hatte, aber nur geringe Mengen an rekombinantem IF Protein vorlagen. Ein Transport dieses Proteins ins Periplasma konnte nicht nachgewiesen werden. Somit führte die Variation des Transportweges zu keiner verbesserten Translokation von IF ins Periplasma.

### 3.3 Studien zum Nachweis der Bindung von B<sub>12</sub> an den IF

Für die Analyse der B<sub>12</sub>-Bindung während der Translokation wurde zur Erhöhung der Detektionseffizienz <sup>14</sup>C -radioaktiv markiertes Coenzym B<sub>12</sub> hergestellt (siehe 2.26). *E. coli* DH5α/pTM1 wurde wie unter 2.14.1 beschrieben in 100 ml LB-Medium angezogen. Zeitgleich zur Induktion erfolgte die Zugabe von <sup>14</sup>C-Coenzym B<sub>12</sub>. Die Radioaktivität der eingesetzten Coenzym B<sub>12</sub> Menge pro Experiment betrug 91-181,7 Becquerel. Zusätzlich fand ein weiteres Experimente mit Kulturen von *E. coli*/pTM1 und als Kontrolle *E. coli*/pER1 in Medien mit einem Überschuss von Coenzym B<sub>12</sub> statt (10 mg bzw. 100 mg/l). Eine Bindung von B<sub>12</sub> zeichnet sich dabei durch eine rote Bande im nativen Gel aus. Die anschließend präparierten Rohextrakte (siehe 2.15.2) wurden in einer nativen Gradienten-PAGE, bei dem der Cofaktor nicht von seinem Bindeprotein abgelöst wird, aufgetrennt. Bei keinem der beiden Experimente konnte eine Bindung des B<sub>12</sub> an den Intrinsic Faktor nachgewiesen werden. Da sich bereits in den Rohextrakten keine Radioaktivität mehr bestimmen ließ, wurde daraus gefolgert, dass die Radioaktivität des hergestellten <sup>14</sup>C-Coenzym B<sub>12</sub> für dieses Experiment zu gering war. Nicht außer acht zu lassen ist außerdem die Tatsache, dass insgesamt nur geringe Mengen an IF-Bindeprotein in den Zellen detektiert werden konnten, so dass letztlich zu wenig IF für den Nachweis der B<sub>12</sub>-Bindung mit radioaktivem Coenzym-B<sub>12</sub> zur Verfügung standen.

#### 3.3.1 Abhängigkeit der Corrinoïdproduktion von verschiedenen *C. freundii*-Stämmen in An- und Abwesenheit von heterolog produziertem IF

Durch quantitative Bestimmung des Corrinoïdgehaltes wurde der Einfluss der heterologen Produktion des Intrinsic Faktors auf die Produktion von B<sub>12</sub> in vier verschiedenen *C. freundii*-Stämmen untersucht. Dabei sollte analysiert werden, ob die Bindung von B<sub>12</sub> an IF und der geringe Export aus der Zelle durch Abfall der internen B<sub>12</sub>-Konzentration zu einer verstärkten Produktion von B<sub>12</sub> führt. Hierzu wurden *C. freundii*-Kulturen mit den IF-Plasmiden pTM1 und pHIF und die Negativkontrollen *C. freundii*/pSK und *C. freundii*/pMPM-T4 (siehe Tabelle 2) anaerob in 500 ml Mineralmedium (siehe 2.2.1) mit den entsprechenden Antibiotika inkubiert und die Genexpression induziert. Die Anzucht erfolgte unter B<sub>12</sub>-produzierenden Bedingungen (siehe 3.2.1 und 2.14.1). Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden die in den präparierten Rohextrakten (siehe 2.15.2) enthaltenen Corrinoïde in die lösliche Dicyano-Form umgesetzt und störende Komponenten wie Proteine und Lipide ausgefällt. Zur Bestimmung der Corrinoïde wurde ein Spektrum der zuvor aufgearbeiteten Proben zwischen 350 und 650 nm aufgenommen (siehe 2.27.2).

**Tabelle 9: Mittelwerte der B<sub>12</sub>-Konzentrationen im Rohextrakt aus der verschiedenen *C. freundii*-Kulturen**

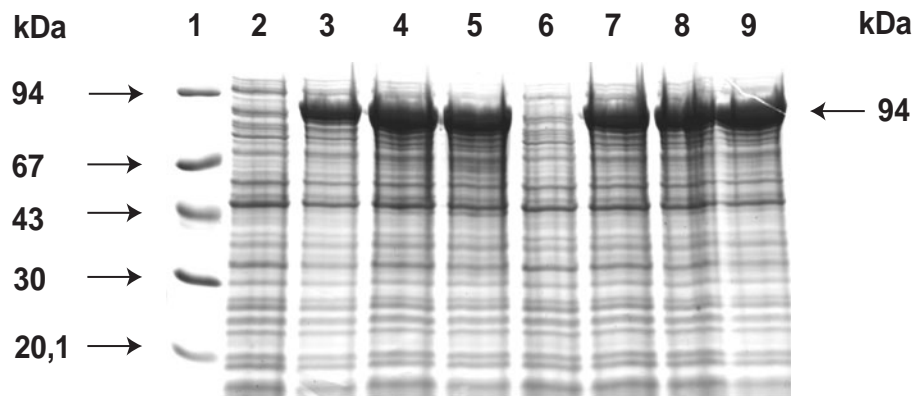
Organismus	Mittelwert B <sub>12</sub> -Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein]
<i>C. freundii</i> /pTM1	0,47
<i>C. freundii</i> /pHIF	0,63
<i>C. freundii</i> /pMPM-T4 $\Omega$	0,40
<i>C. freundii</i> /pSK+	0,48

Es konnte gezeigt werden, dass die geringe Bildung von IF in *C. freundii*/pTM1 gegenüber der Kontrolle *C. freundii*/pMPM-T4 $\Omega$  eine um 17 % gesteigerte Produktion von B<sub>12</sub> aufwies. Im Vergleich zum Experiment mit *C. freundii*/pSK konnte keine Steigerung festgestellt werden. Dagegen enthielten die Rohextrakte der Kulturen, die mit dem Plasmid pHIF angezogen worden waren, die größte Menge an B<sub>12</sub>. Somit kann festgehalten werden, dass die geringe Produktion von IF wahrscheinlich mit einer Steigerung der B<sub>12</sub>-Produktion verbunden ist.

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass der Einsatz des IF als B<sub>12</sub>-Bindeprotein in dem Exporter-Modell zu keiner detektierbaren Menge an B<sub>12</sub> im Periplasma geführt hatte. Das wiederum könnte damit zusammenhängen, dass nur sehr wenig IF im Periplasma nachgewiesen werden konnte. Damit schien der IF ungeeignet für den Einsatz im B<sub>12</sub>-Exporter-Modell. Weitere Studien wurden deshalb mit dem alternativen B<sub>12</sub>-Bindeprotein MutB durchgeführt.

### 3.4 Experimente zum Nachweis der Expression der *sigtorA-mutB*-Genfusion und des korrespondierenden Genproduktes

Anfänglich sollte die heterologe Expression des Fusionsgens *sigtorA-mutB* aus dem Konstrukt pMB5 (siehe 3.1.1.2; BOLM, 2000) in verschiedenen *E. coli*-Stämmen bestätigt werden. Erste Experimente wurden in *E. coli* BL21 (DE3)/pMB5 und JM109/pMB5 durchgeführt. Die Anzucht in 50 ml LB-Medium erfolgte wie unter 2.13.1 beschrieben und die Expression der Gene wurde mit Arabinose induziert. Die SDS-PAGE-Analyse, der vor und nach Induktion der Genexpression genommenen Proben zeigte, dass im Laufe des Experiments eine zusätzliche Proteinbande mit einer Molekularmasse von 94 kDa auftrat (siehe Abbildung 20). Diese entsprach der aus der Sequenz von *torA-mutB* abgeleiteten Molekularmasse. Damit konnte die heterologe Expression von *sigtorA-mutB* in den beiden *E. coli*-Stämmen bestätigt werden.



**Abbildung 20: SDS-PAGE-Analyse der Produktion des Fusionsproteins sigTorA-MutB in *E. coli* BL21(DE3) und JM109**

Dargestellt ist ein 12 %iges SDS-Gel, das mit Coomassie-Blau gefärbt wurde (siehe 2.18.1 und 2.19.1).

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Gesamtzellextrakt *E. coli* JM109/pMB5 direkt nach Induktion

Spur 3: Gesamtzellextrakt *E. coli* JM109/pMB5 1 h nach Induktion

Spur 4: Gesamtzellextrakt *E. coli* JM109/pMB5 2 h nach Induktion

Spur 5: Gesamtzellextrakt *E. coli* JM109/pMB5 3 h nach Induktion

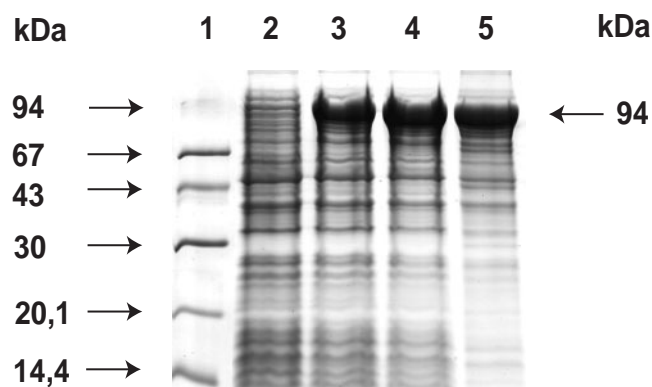
Spur 6: Gesamtzellextrakt *E. coli* BL21 (DE3)/pMB5 direkt nach Induktion

Spur 7: Gesamtzellextrakt *E. coli* BL21 (DE3)/pMB5 1 h nach Induktion

Spur 8: Gesamtzellextrakt *E. coli* BL21 (DE3)/pMB5 2 h nach Induktion

Spur 9: Gesamtzellextrakt *E. coli* BL21 (DE3)/pMB5 3 h nach Induktion

Im weiteren erfolgten Expressionsstudien in den beiden B<sub>12</sub>-Produzenten *C. freundii* und *S. typhimurium* TA100, die zunächst aerob unter nicht B<sub>12</sub>-produzierenden Bedingungen durchgeführt wurden (siehe 3.2.1). Dabei wurden die *C. freundii*-Kulturen in Hefe-Pepton-Medium (siehe 2.2.2) und die *S. typhimurium*-Kulturen in LB-Medium angezogen (siehe 2.14.1). Bei der SDS-PAGE-Analyse des Verlaufs des Expressionsversuches ließ sich ebenfalls nach Induktion mit Arabinose eine zusätzliche Bande im Molekularmassenbereich von sigTorA-MutB nachweisen (94 kDa; siehe Abbildung 21 und Abbildung 22). Die größte Proteinmenge von sigTorA-MutB wies *C. freundii*/pMB5 1 h nach Induktion auf (siehe Abbildung 21, Spur 4).



**Abbildung 21: Analyse der Produktion von sigTorA-MutB in *C. freundii* im SDS-Gel**

Dargestellt ist ein 12 %iges SDS-Gel, das mit Coomassie-Blau gefärbt wurde (siehe 2.18.1 und 2.19.1).

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Gesamtzellextrakt *C. freundii*/pMB5 direkt nach Induktion

Spur 3: Gesamtzellextrakt *C. freundii*/pMB5 1 h nach Induktion

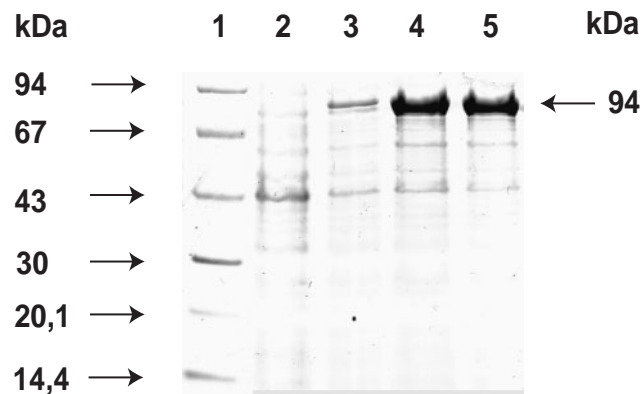
Spur 4: Gesamtzellextrakt *C. freundii*/pMB5 2,5 h nach Induktion

Spur 5: Gesamtzellextrakt *C. freundii*/pMB5 3,5 h nach Induktion

Die Analyse des Proteinmusters der Proben aus der Expression der *sigtorA-mutB*-Genfusion in *S. typhimurium* zeigte im SDS-PAGE, dass bereits nach 30 min eine zusätzliche sigTorA-MutB Bande auftrat und 2 h nach Induktion die maximale Produktionsmenge des Fusionsproteins erreicht war (siehe Abbildung 22, Spur 4). Die Identität der SigTorA-MutB-Fusionsproteine aus den beiden Experimenten wurde anschließend durch Western-Blot-Analysen mit Antikörpern bestätigt, die gegen den His<sub>6</sub>-Tag gerichtet waren (Daten nicht gezeigt).

Für die Expression von *sigtorA-mutB* in dem B<sub>12</sub>-Produzenten *E. blattae* war zunächst die Umklonierung des Fusionsgens in einen Vektor mit anderem Selektionsmarker notwendig, da der Wildtyp von *E. blattae* bereits eine natürliche Resistenz gegen Tetracyclin aufweist. Aus diesem Grunde wurde als Expressionsvektor das Plasmid pMPM-A4Ω mit Ampicillin-Resistenz ausgewählt (siehe Abbildung 3). Es gehört zur gleichen Gruppe wie der Vektor pMPM-T4Ω (siehe Abbildung 2). Für die Umklonierung von *sigtorA-mutB* aus dem Vektor pMPM-T4Ω wurde die entscheidende Sequenz mit Hilfe des Restriktionsenzym *Xba*I herausgeschnitten und über diese Schnittstelle in pMPM-A4Ω kloniert. Dabei wurde auch ein 2 kb-Stück aus dem Vektor eliminiert und damit das Ω-Interposon entfernt. Durch Sequenzierung konnte die korrekte Insertion von *sigtorA-mutB* bestätigt werden. Das Konstrukt wurde als pTM3 bezeichnet.





**Abbildung 22: SDS-PAGE-Analyse der Produktion von sigTorA-MutB in *S. typhimurium* TA100**

Das 12 %ige SDS-Gel war anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt worden (siehe. 2.18.1 und 2.19.1).

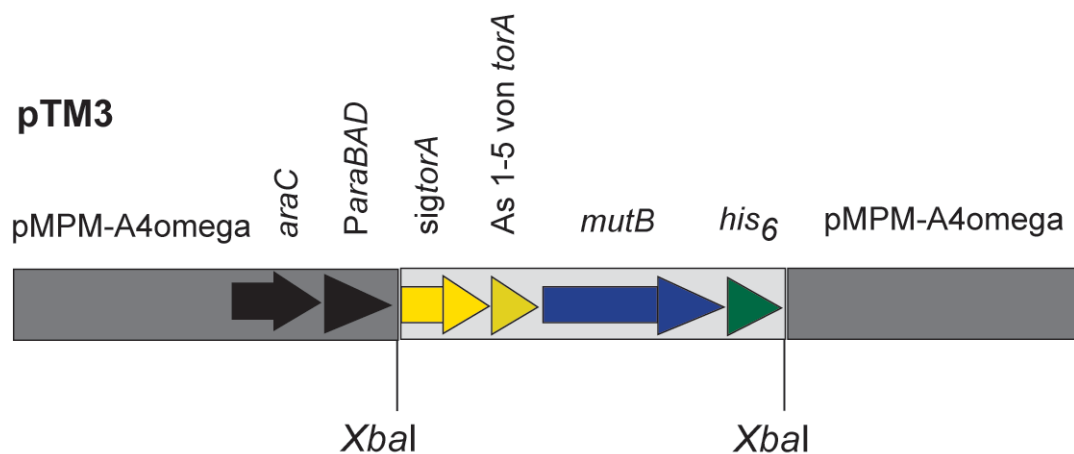
Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Gesamtzellextrakt *S. typhimurium* TA100/pMB5 direkt nach Induktion

Spur 3: Gesamtzellextrakt *S. typhimurium* TA100/pMB5 0,5 h nach Induktion

Spur 4: Gesamtzellextrakt *S. typhimurium* TA100/pMB5 2 h nach Induktion

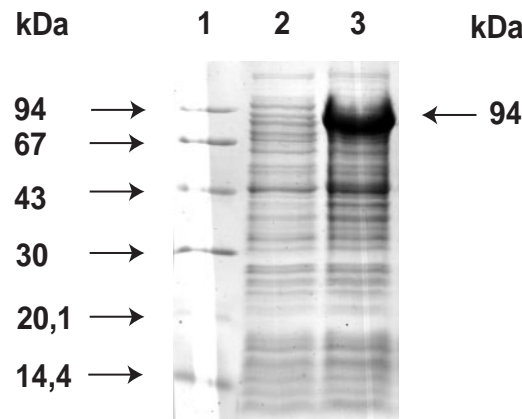
Spur 5: Gesamtzellextrakt *S. typhimurium* TA100/pMB5 3 h nach Induktion



**Abbildung 23: Schematische Darstellung des Vektors pTM3**

Zunächst wurde wie bei *C. freundii* die aerobe Expression des Fusionsproteins in *E. blattae*/pTM3 im 100 ml-Maßstab untersucht (siehe 2.14.1). Die SDS-PAGE-Analyse der während des Wachstums gezogenen Proben ließ eindeutig eine zusätzliche Proteinbande im Molekularmassenbereich des Hybridproteins sigTorA-MutB nach Induktion der Genexpression erkennen (94 kDa; siehe Abbildung 24, Spur 3). Im Vergleich dazu ließ sich in der Negativ-Kontrolle (*E. blattae* Wildtyp), die unter den gleichen Bedingungen angezogen worden war, keine zusätzliche Proteinbande in

diesem Bereich erkennen (Daten nicht gezeigt). Eine Expression der *sigtorA-mutB*-Genfusion und die Bildung des korrespondierenden Genproduktes konnte mit Hilfe des Konstruktes pTM3 in *E. blattae* erfolgen.



**Abbildung 24: Analyse der Produktion von sigTorA-MutB in *E. blattae* im SDS-PAGE**

Das 12 %ige SDS-Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt (siehe 2.18.1 und 2.19.1).

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Gesamtzellextrakt *E. blattae*/pTM3 direkt vor Induktion mit 0,5 % Arabinose

Spur 3: Gesamtzellextrakt *E. blattae*/pTM3 3 h nach Induktion mit 0,5 % Arabinose

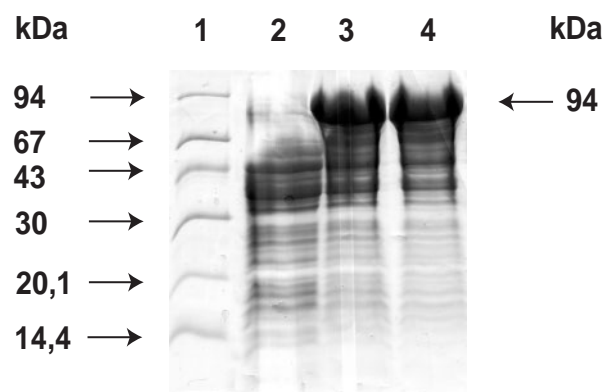
Damit war belegt, dass eine starke heterologe Produktion des sigTorA-MutB-Fusionsproteins in *C. freundii*, *S. typhimurium* TA100 und *E. blattae* stattfand.

### 3.4.1 Expression von *sigtorA-mutB* in B<sub>12</sub>-produzierenden Enterobakterien

Die Funktion des B<sub>12</sub>-Exporters setzt die Produktion der TorA-Signalsequenz mit dem MutB-Bindeprotein in einem B<sub>12</sub>-produzierenden Organismus voraus. Aus diesem Grunde wurde im folgenden die Expression der *sigtorA-mutB*-Genfusion unter Bedingungen durchgeführt, die eine B<sub>12</sub>-Produktion der Wirtsstämme *C. freundii* und *E. blattae* ermöglichen. Nicht nur *C. freundii* (siehe 3.2.1) sondern auch *E. blattae* ist in der Lage Cobalamin *de novo* bei anaerobem Wachstum mit Glycerin als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle zu synthetisieren. Die Glycerin-Dehydratase ist ein B<sub>12</sub>-abhängiges Enzym und setzt Glycerin zu  $\beta$ -Hydroxypropionaldehyd um, das zu 1,3-Propandiol reduziert werden kann. Durch diese Reaktion kommt es zu einem Ausgleich der Reduktionsäquivalente, die durch die Oxidation von Glycerin zu Dihydroxyacetonphosphat mit Hilfe der Glycerin-Dehydrogenase angefallen sind. Enthält das Kulturmedium also kein zusätzliches B<sub>12</sub>, so muß *E. blattae* wie auch *C. freundii* für ein anaerobes Wachstum mit Glycerin das Coenzym selbst synthetisieren. (LAWRENCE *et al.*, 1996; ROTH *et al.*, 1996).

### 3.4.1.1 Expression in *C. freundii*

Hierzu wurde *C. freundii*/pMB5 in 500 ml-Maßstab unter anaeroben Bedingungen mit Glycerin als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert (siehe 2.14.1). Da das eingesetzte Mineralmedium kein B<sub>12</sub> enthielt, war ein Wachstum des Organismus mit dieser Kohlenstoff-Quelle nur bei gleichzeitiger Produktion von B<sub>12</sub> möglich (siehe 3.2.1). Nach Induktion der Zellen mit Arabinose wurden diese noch für weitere 18 h inkubiert und die Produktion des Fusionsproteins durch Probennahme zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgt. Die Analyse des Proteinmusters der Proben im SDS-PAGE ließ erkennen, dass im Verlauf des Wachstums der Zellen nach Induktion eine zusätzliche Bande bei etwa 94 kDa hervortrat, die aufgrund der Molekularmasse dem Fusionsprotein zuzuordnen war (siehe Abbildung 25, Spur 3 und 4). Die Expression der *sigtorA-mutB*-Genfusion unter B<sub>12</sub>-synthetisierenden Voraussetzungen (siehe 2.14.1) konnte damit belegt werden.



**Abbildung 25: Heterologe Produktion von sigTorA-MutB in *C. freundii* bei gleichzeitiger Bildung von B<sub>12</sub>**

Die Färbung des 12 %igen SDS-Gels erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue (siehe 2.18.1 und 2.19.1).

Spur 1: Proteinstandard

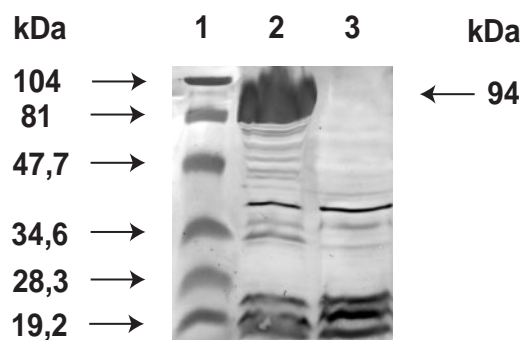
Spur 2: Gesamtzellextrakt *C. freundii* direkt nach Induktion

Spur 3: Gesamtzellextrakt *C. freundii* 2,5 h nach Induktion

Spur 4: Gesamtzellextrakt *C. freundii* 18 h nach Induktion

Der Nachweis der Produktion des Hybridproteins sigTorA-MutB in den B<sub>12</sub>-Produzenten sollte anschließend durch Western-Blot-Analysen bestätigt werden. Dazu wurde Gesamtzellextrakt von *C. freundii*/pMB5-Kulturen, die anaerob in Mineralmedium mit Glycerin gewachsenen waren, gelelektrophoretisch im SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Als Negativ-Kontrolle wurden auch Gesamtzellextrakte von *C. freundii*/pER1, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert worden waren, mitgeführt. Die dann folgende Immunopräzipitation wurde mit monoklonalen gegen den His<sub>6</sub>-Tag gerichteten

Antikörpern durchgeführt. Die Färbung erfolgte wie unter 2.23.1.2 beschrieben. Dabei trat ein starkes Signal bei 94 kDa auf, welches aufgrund der Molekularmasse dem sigTorA-MutB Fusionsprotein zugeordnet werden konnte. (siehe Abbildung 26, Spur 2). Der Vergleich mit dem Gesamtzellextrakt von *C. freundii*/pER1, der nur das Gen für die *torA*-Signalsequenz auf dem Plasmid trägt, zeigte dagegen kein Signal dieser Größe (siehe Abbildung 26, Spur 3). Auf diese Weise konnte die Produktion des sigTorA-MutB Fusionsproteins bei gleichzeitiger Bildung von B<sub>12</sub> bestätigt werden.



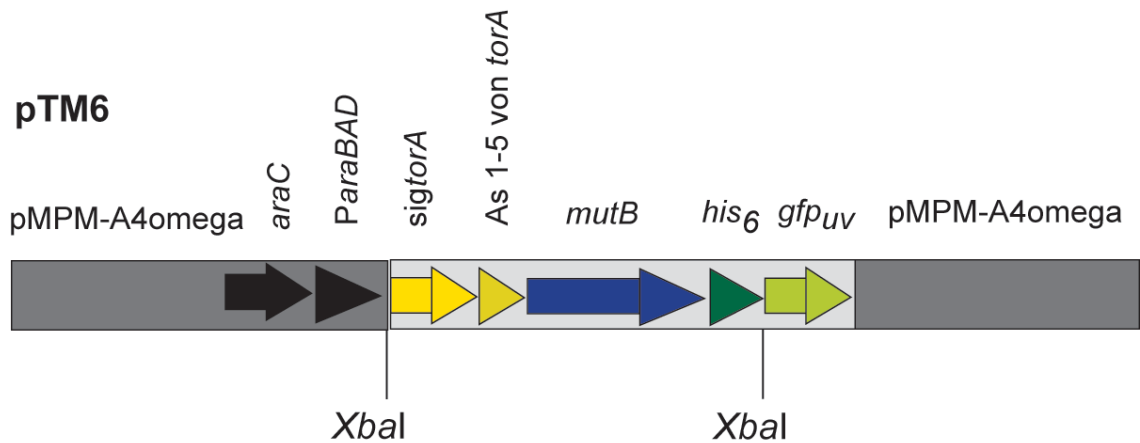
**Abbildung 26: Nachweis der anaeroben Produktion des Fusionsproteins sigTorA-MutB durch Western-Blot-Analysen**

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Gesamtzellextrakt *C. freundii*/pMB5

Spur 3: Gesamtzellextrakt *C. freundii*/pER1

Die Detektion des sigTorA-MutB Fusionsproteins erfolgte bislang mit Hilfe des His<sub>6</sub>-Tags. Da die Verwendung von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Konjugat oder Penta-His-Antikörpern bei der Immunodetektion oft zu einem starken Hintergrund führten, sollte als weitere Detektionsmöglichkeit das fluoreszierende „Green Fluorescent Protein“ (GFP<sub>uv</sub>) eingesetzt werden. Das GFP der Qualle *Aequorea victoria* ist ein häufig genutztes Markerprotein, um die Expression und Regulation von Genen zu untersuchen. Korrekt gefaltetes GFP bildet ein stark fluoreszierendes internes Chromophor. Es wird ohne Export-Signal synthetisiert (MARGOLIN, 2000). CRAMERI *et al.*, 1996 konstruierten ein synthetisches *gfp*-Gen, welches sich durch eine stärkere Fluoreszenz auszeichnete und zudem im Gegensatz zum Wildtyp *gfp*-Gen besonders in *E. coli* kaum noch in Einschlusskörpern aggregierte.



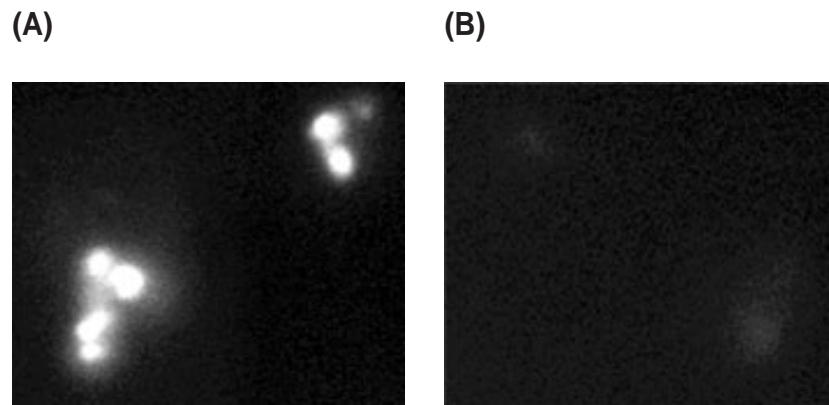
**Abbildung 27: Schematische Darstellung des Vektors pTM6**

Diese *gfp<sub>uv</sub>* Sequenz wurde C-terminal an die Sequenz für die sechs Histidinreste kloniert. Für die Klonierung wurde das *gfp<sub>uv</sub>*-Gen über PCR (siehe 2.8) mit den Primern f-GFP<sub>uv</sub>-ClaI und r-GFP<sub>uv</sub>-ClaI sowie dem Plasmid pBAD-GFP<sub>uv</sub> als Matrize amplifiziert (siehe Tabelle 3 und Tabelle 2). Die Anlagerung der degenerierten Primer wurde zunächst für jeweils 45 s bei 53 °C gefolgt von der Kettenverlängerung bei 72 °C für 1:35 min durchgeführt, wobei 3 Zyklen durchlaufen wurden. Während der folgenden 27 Zyklen lagerten sich die Primer bei 62 °C für 45 s an die DNA an. Die Bedingungen der Polymerisation wurden nicht verändert. Mit Hilfe der Oligonukleotide wurde sowohl 5'- als auch 3'-terminal die Erkennungssequenz für das Enzym *ClaI* eingeführt. Das erhaltene Fragment hatte eine Größe von 760 bp. Weiterhin musste für die Klonierung von *gfp<sub>uv</sub>* über PCR eine *ClaI*-Schnittstelle hinter die Sequenz für den His<sub>6</sub>-Tag in den Vektor pTM3 eingeführt werden. Dabei kamen die Oligonukleotide f-mutB/ GFP-ApaI und r-mutB/ GFP-ClaI und als Matrize das Plasmid pTM3 zum Einsatz (siehe Tabelle 3 und 2). In den ersten drei Zyklen konnten sich die degenerierten Oligonukleotide für 45 s bei 54 °C an die DNA anlagern und die Kettenverlängerung erfolgte bei 72 °C für 45 s. In den direkt anschließenden 27 Zyklen erfolgte die Anlagerung an das Matrize bei 58 °C für 45 s und die Kettenverlängerung wie in den zuvor abgelaufenen 3 Zyklen. Die Größe des erhaltenen PCR Produkts betrug 313 bp. Nachdem die notwendige *ClaI*-Schnittstelle mit Hilfe des *mutB*-PCR-Produkt in den Vektor pTM3 eingeführt worden war, konnte die Klonierung des *gfp*-PCR-Produkt über diese *ClaI*-Schnittstelle in den Vektor pTM3 erfolgen. Die korrekte Insertion wurde durch Sequenzierung bestätigt und das Konstrukt als pTM6 bezeichnet (siehe Tabelle 2 und Abbildung 27).

### 3.4.1.2 Expression in *E. blattae*

Für die heterologe Expression der *sigtorA-mutB-gfp*-Genfusion in *E. blattae* wurde zunächst der Vektor pTM6 durch Elektroporation übertragen (siehe 2.10.1.3). Nach erfolgreicher Expression unter aeroben Wachstumsbedingungen (Daten nicht gezeigt) sollte im Folgenden die *sigtorA-mutB*-Genfusion unter B<sub>12</sub>-produzierenden Voraussetzungen exprimiert und die Produktion des korrespondierenden Genproduktes durch Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Der Expressionsversuch erfolgte deshalb anaerob unter B<sub>12</sub>-synthetisierenden Voraussetzungen, im 500 ml-Maßstab (siehe 2.14.1). Dabei wurden sowohl Zellen aus induzierten, als auch nicht induzierten Kulturen sowie als Kontrolle der Wildtyp von *E. blattae* unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Während bei den induzierten Kulturen von

*E. blattae*/pTM6 nahezu alle Zellen fluoreszierten (siehe Abbildung 28 A), leuchteten bei den nicht induzierten Kulturen nur vereinzelt einige Zellen sehr schwach (siehe Abbildung 28 B). Bei den Wildtyp-Zellen war nach Induktion keine Fluoreszenz zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis bestätigte die heterologe Produktion des sigTorA-MutB-GFP Fusionsproteins in *E. blattae* unter B<sub>12</sub>-produzierenden Voraussetzungen.



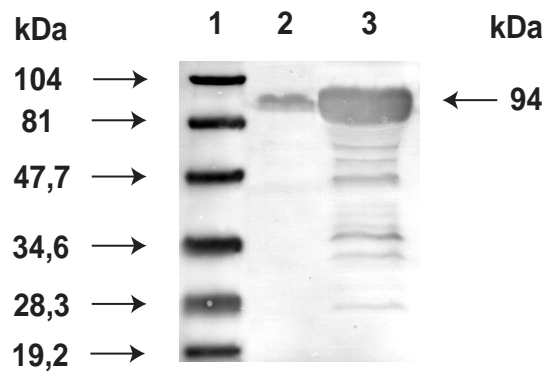
**Abbildung 28: Nachweis der Produktion von sigTorA-MutB mit dem Konstrukt pTM6 in *E. blattae* durch Fluoreszenz**

(A): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen aus induzierten Kulturen von *E. blattae*/pTM6  
(B): Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen aus nicht induzierten Kulturen von *E. blattae*/pTM6

### 3.5 Experimente zur Lokalisation des Hybridproteins sigTorA-MutB im Periplasma

Nachdem die Expression von *sigtorA-mutB* und damit auch die heterologe Produktion des Fusionsproteins in verschiedenen Stämmen gezeigt werden konnte, war im weiteren die Translokation des B<sub>12</sub>-Bindeproteins ins Periplasma entscheidend. Vorerst wurde der Transport bei aerober Anzucht der Zellen untersucht, da im Vergleich zu anaerob gewachsenen Kulturen aufgrund der höheren Energieausbeute höhere Zelldichten erreicht werden und somit mehr B<sub>12</sub>-Bindeprotein transloziert werden kann. Die Inkubation der 100 ml-Kulturen von *E. coli* BL21 (DE3)/pMB5 geschah wie unter 2.14.1 beschrieben in LB-Medium. Anschließend wurden sowohl die präparierte periplasmatische Probe (siehe 2.15.5.4) als auch das restliche Zellpellet einer Analyse im Western-Blot unterzogen (siehe 2.22.1). Die Immunodetektion zeigte, dass die periplasmatische Probe eine sigTorA-MutB-Bande im Bereich von 94 kDa aufwies (siehe Abbildung 29, Spur 2), somit also eine Translokation des Fusionsproteins aus dem Cytoplasma stattgefunden hatte. Bei dem Vergleich mit dem Rohextrakt (siehe

Abbildung 29, Spur 3) war allerdings zu erkennen, dass sich ein großer Teil des sigTorA-MutB-Hybridproteins noch im Cytoplasma oder der Membranfraktion befand. Dies wurde auch durch die Untersuchungen nach Trennung in Cytoplasma- und Membranfraktion bestätigt (siehe 2.15.4).



**Abbildung 29: Nachweis der Translokation von sigTorA-MutB ins Periplasma von *E. coli* BL21 (DE3) im Western-Immunoblot**

Dargestellt ist eine mit monoklonalen gegen den His<sub>6</sub>-Tag-gerichteten Antikörpern behandelte PVDF-Membran.

Spur 1: Proteinstandard

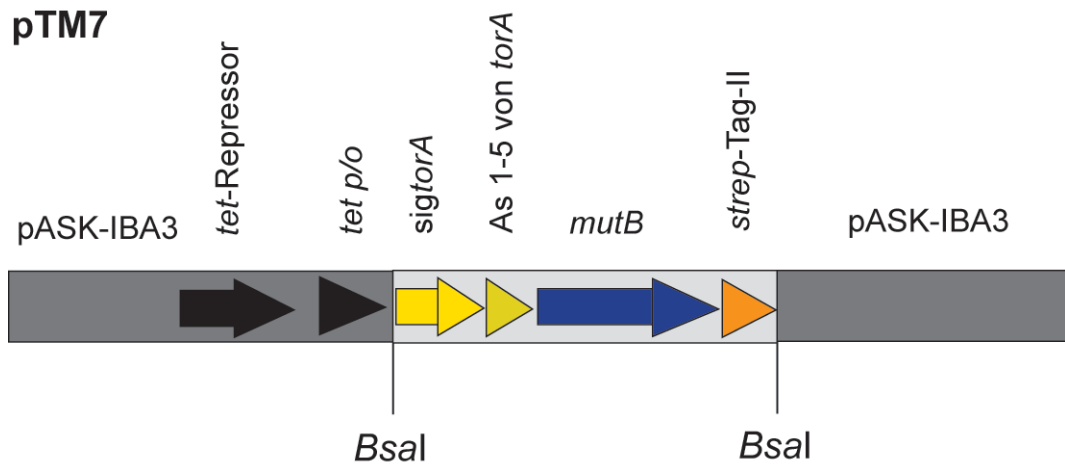
Spur 2: Periplasma *E. coli* BL21 (DE3)/pMB5

Spur 3: Zellpellet *E. coli* BL21 (DE3)/pMB5

### 3.5.1 Umklonierung von sigtorA-mutB in den Vektor pASK-IBA3

Der Nachweis von sigTorA-MutB im Periplasma von *E. blattae* durch Western-Blot-Analysen mit Hilfe des gegen den His<sub>6</sub>-Tag-gerichteten Antikörpers wurde, wie bereits erwähnt, oft durch eine starke Hintergrundreaktion erschwert. Daher wurde im weiteren versucht, diesen Nachweis durch ein anderes Detektionssystem zu ersetzen. Hierzu wurde ein Strep-TagII verwendet, der aus dem Vektor pASK-IBA3 stammt (siehe Tabelle 2). Bei dem „Tag“ handelt es sich um acht Aminosäuren (WSHPQFEK). Der Vektor pASK-IBA3 weist eine Ampicillin Resistenz auf und enthält keine Signalsequenz. Der *Strep*-TagII ist am C-terminalen Ende lokalisiert.



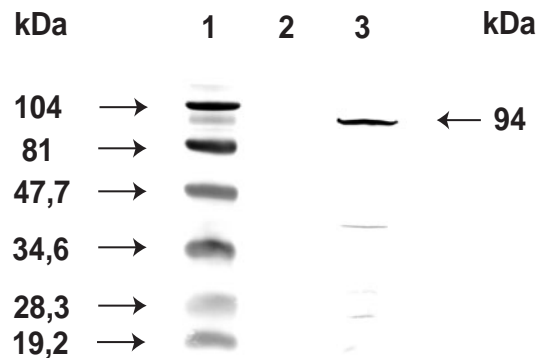


**Abbildung 30: Schematische Darstellung des Vektors pTM7**

Für die Klonierung von *sigtorA-mutB* in den Expressionsvektor pASK-IBA3 wurde über PCR sowohl 3'-, als auch 5'-terminal die Erkennungssite für *BsaI* amplifiziert. Hierfür wurden die Primer f-IBA3torA-mutB-BsaI und r-IBA3torA-mutB-BsaI herangezogen (siehe Tabelle 3). Die Anlagerung an das Template pMB5 erfolgte in den ersten drei Zyklen für 45 s bei 60 °C und in den folgenden 27 Zyklen für 45 s bei 64 °C. Die Kettenverlängerung wurde bei allen 30 Zyklen bei 72 °C für 5,10 min durchgeführt. Die Klonierung in den Vektor pASK-IBA3 erfolgte über die *BsaI*-Schnittstelle. Die korrekte Insertion von *sigtorA-mutB* wurde anschließend durch Sequenzierung bestätigt. Das Konstrukt wurde als pTM7 bezeichnet.

Für die folgende Expression wurde das Plasmid pTM7 über Elektroporation in *E. blattae* transferiert. Die Expression erfolgte aerob im 100 ml-Maßstab nach den unter 2.14.3 beschriebenen Methoden. Da die *sigtorA-mutB* Gene nun unter der Kontrolle des *tet*-Promotors standen, erfolgte die Induktion der Genexpression mit Anhydrotetracyclin. Bei der SDS-PAGE-Analyse des Expressionsversuches konnte nach Induktion der Genexpression eine Proteinbande im Molekularmassenbereich von sigTorA-MutB identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Daraufhin wurde die Expression unter den gleichen Bedingungen wiederholt und anschließend die periplasmatische Fraktion aus den Zellen gewonnen (siehe 2.14.5.5). Über Western-Blot-Analyse ließ sich im Periplasma eindeutig ein Signal mit der Molekularmasse von sigTorA-MutB detektieren. (siehe Abbildung 31, Spur 3). In der als Negativ-Kontrolle gewonnenen periplasmatischen Fraktion des Wildtyps, der unter gleichen Bedingungen angezogen worden war, ließ sich kein Signal nachweisen. Dies belegte eine durch pTM7 vermittelte Translokation von sigTorA-MutB ins Periplasma von *E. blattae*. Wie aus Abbildung 31 zu ersehen, trat mit Hilfe des gegen den Strep-TagII-gerichteten Antikörpers keine starke Hintergrundreaktion mehr im Western-Blot auf. Somit erfolgten alle weitere Expressionen von sigTorA-MutB in *E. blattae* mit dem Konstrukt pTM7.





**Abbildung 31: Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Translokation von sigTorA-MutB ins Periplasma von *E. blattae***

Dargestellt ist eine PVDF-Membran nach Behandlung mit polyklonalen gegen den Strep-Tag gerichteten Antikörpern.

Spur 1: Proteinstandard

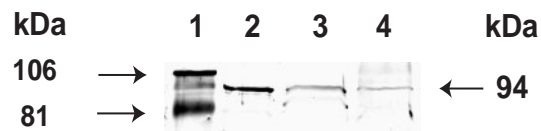
Spur 2: Periplasma aus Wildtyp von *E. blattae*

Spur 3: Periplasma aus *E. blattae*/pTM7

### 3.5.2 Translokation von sigTorA-MutB in B<sub>12</sub>-produzierenden Enterobakterien

Um die Voraussetzung für die Funktion des B<sub>12</sub>-Exporters zu erfüllen, musste noch der Beweis für die Translokation des MutB aus dem Cytoplasma unter B<sub>12</sub>-produzierenden Konditionen erbracht werden. Hierzu wurden die Stämme *C. freundii*/pMB5 und *E. blattae*/pTM7 eingesetzt. Die heterologe Expression von sigTorA-MutB erfolgte nach den unter 2.13.1 und 2.14.3 beschriebenen Methoden anaerob in 500 ml Volumina. Zusätzlich wurden dem Medium noch eine Reihe von Aminosäuren und 20 mM Fumarat als externer Elektronenakzeptor beigefügt (siehe 2.2.1). Dadurch sollten die anaeroben Wachstumsraten und die Zelldichten erhöht werden, so dass mehr Fusionsprotein heterolog gebildet werden konnte. Nach der Induktion der Expression des sigtorA-mutB-Fusionsgens in den B<sub>12</sub>-Produzenten *E. blattae*/pTM7 und *C. freundii*/pMB5 konnte das Periplasma aus den Zellen präpariert werden (siehe 2.15.5.5). Anschließend wurden außerdem aus den restlichen Zellpellets die Cytoplasma- und Membranfraktionen gewonnen. Die Analyse der verschiedenen Fraktionen von *E. blattae* erfolgte im Western-Blot mit Antikörpern, die gegen den Strep-TagII-gerichteten waren (siehe 2.23.1.2). Dabei zeigte sich, dass in *E. blattae*/pTM7 das Fusionsprotein ins Periplasma transportiert worden war (siehe Abbildung 32, Spur 2). Die Cytoplasma- und Membranfraktionen wiesen ebenfalls ein Signal im Molekularmassenbereich von sigTorA-MutB (94 kDa) auf, allerdings in geringerer Intensität als im Periplasma. Die Periplasma-, Cytoplasma- und Membranfraktionen von *C. freundii*/pMB5 brachten vergleichbare Ergebnisse in den Western-Blot-Analysen, die mit Hilfe des gegen den His<sub>6</sub>-Tag-gerichteten Antikörpers

durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt). Es konnte also gezeigt werden, dass ein Großteil des sigTorA-MutB Hybridproteins in den beiden B<sub>12</sub>-produzierenden Enterobakterien ins Periplasma transloziert wurde.



**Abbildung 32: Nachweis des sigTorA-IF im Periplasma, Cytoplasma und in den Membranen von *E. blattae* im Western-Blot**

Abgebildet ist eine PVDF-Membran, die mit polyklonalem gegen den Strep-TagII-gerichtetem Antiserum inkubiert wurde.

Spur 1: Proteinstandard

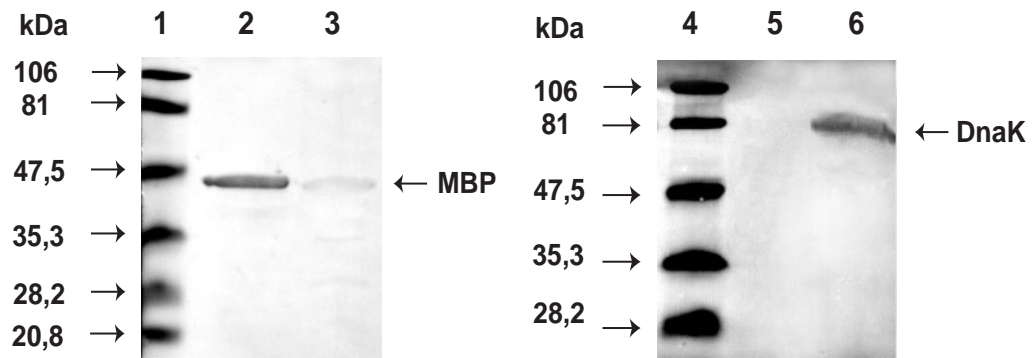
Spur 2: Periplasma von *E. blattae*/pTM7

Spur 3: Cytoplasma von *E. blattae*/pTM7

Spur 4: Membranen von *E. blattae*/pTM7

Zur Überprüfung der Reinheit des präparierten Periplasmas wurden diese Proben noch in zwei weiteren Western-Blot-Analysen untersucht. Diese erfolgten zum einen durch den Nachweis eines bekannten typischen periplasmatisch-lokalisierten Proteins. Hierzu wurde das Maltose-Bindeprotein (MBP) verwendet. Zum anderen wurde die Reinheit des Periplasmas überprüft. Im Falle einer Verunreinigung ließe sich nicht mehr eindeutig feststellen, ob das im Periplasma detektierte sigTorA-MutB tatsächlich transloziert worden war. Das Vorhandensein solcher Verunreinigungen konnte mit Hilfe eines Antiserums gegen ein typisch cytoplasmatisches Enzym, dem Chaperon DnaK, untersucht werden.

Zur Detektion beider Proteine wurde sowohl die periplasmatische als auch die cytoplasmatische Probe (Abbildung 32, Spur 2 und 3) in zwei Western-Blots mit beiden Antiseren inkubiert (siehe 2.23.1.2). Die Analyse der Blots zeigte, dass sich im Periplasma nur das periplasmatische MBP und kein cytoplasmatisches DnaK nachweisen ließ (siehe Abbildung 33 A, Spur 2 und B, Spur 5). Somit war bestätigt, dass es sich bei der präparierten Fraktion um Periplasma handelte, welches keine signifikanten cytoplasmatischen Anteile beinhaltet. Dagegen wies das Cytoplasma als Kontrolle wie erwartet nur geringe Mengen an MBP und eine eindeutige Bande im Molekularmassenbereich von DnaK auf (siehe Abbildung 33A, Spur 3 und B, Spur 6).



**Abbildung 33: Nachweis des Maltose-Bindeproteins MBP (A) und des Chaperons DnaK (B) in Zellfraktionen von *E. blattae/pTM7* im Western-Blot**

**(A)** Die Western-Blot-Analyse wurde mit Antiserum durchgeführt, welches gegen das MBP-gerichtet ist (siehe 2.23.1.2).

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Periplasma von *E. blattae/pTM7*

Spur 3: Cytoplasma von *E. blattae/pTM7*

**(B)** Dargestellt ist eine mit MBP-spezifischem Antiserum durchgeführte Western-Blot-Analyse (siehe 2.22.1).

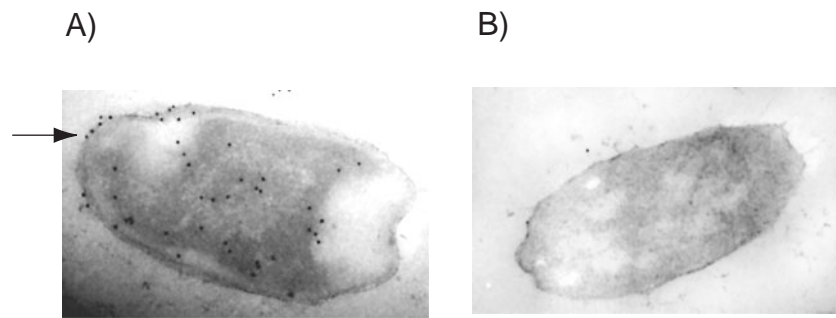
Spur 4: Proteinstandard

Spur 5: Periplasma von *E. blattae/pTM7*

Spur 6: Cytoplasma von *E. blattae/pTM7*

Die Translokation des sigTorA-MutB ins Periplasma konnte ebenfalls mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigt werden. Die Einbettung der Zellen erfolgte dabei nach der Lowicryl-Methode (siehe 2.25). Die Detektion des Hybridproteins wurde mit IgG-Maus-Antikörpern, die gegen den Strep-TagII gerichtet sind und mit Gold-markierten Anti-Maus-Antikörpern durchgeführt. Während der Wildtyp von *E. blattae* keinerlei Markierung in der Zelle aufwies waren in *E. blattae/pTM7* sowohl cytoplasmatische als auch periplasmatische Markierungen zu erkennen. Dabei ließ sich im Periplasma geringfügig mehr sigTorA-MutB-Fusionsprotein nachweisen.

Mit der bestätigten Translokation des B<sub>12</sub>-Bindepoteins MutB aus dem Cytoplasma ins Periplasma unter B<sub>12</sub>-produzierenden Voraussetzungen waren die Bedingungen für einen Transport des B<sub>12</sub> aus dem Cytoplasma gegeben.



**Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen zum Nachweis der Translokation von sigTorA-MutB in *E. blattae***

Die Arbeiten wurden von der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Mayer in Göttingen angefertigt nach der unter 2.25 beschriebenen Methode durchgeführt.

(A): anaerob gewachsene Zelle von *E. blattae*/pTM7 nach Induktion

(B): aerob gewachsene Zelle des *E. blattae* Wildtyps

### 3.6 Studien zum Nachweis der Cotranslokation von B<sub>12</sub> und MutB

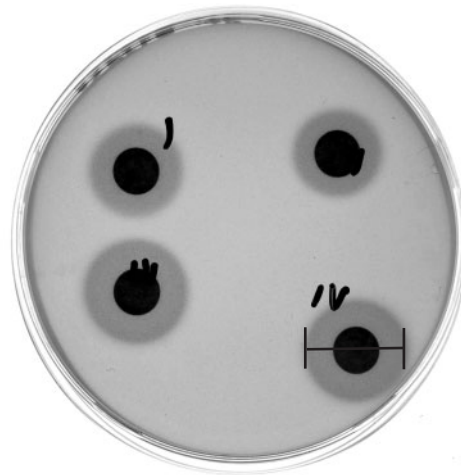
In dem Modell für den B<sub>12</sub>-Exporter ist die Bindung des Coenzym in der Zelle an das B<sub>12</sub>-Bindeprotein notwendig. Nachdem die Translokation des B<sub>12</sub>-Bindeproteins gezeigt werden konnte, sollte in folgenden Experimenten die Cotranslokation mit B<sub>12</sub> belegt werden. Dazu wurde zunächst untersucht, ob eine Abhängigkeit zwischen der Produktion des Corrinoids und dem heterolog gebildeten MutB besteht.

#### 3.6.1 Abhängigkeit der Corrinoidproduktion von verschiedenen *E. blattae*-Stämmen in An- und Abwesenheit von heterolog produzierter Methylmalonyl-CoA-Mutase

Mit Hilfe des B<sub>12</sub>-Plattentests (KRZYCKI *et al.*, 1980) wurde eine quantitative Corrinoidbestimmung mit den Rohextrakten verschiedener Stämme durchgeführt. Ziel war es zu untersuchen, inwieweit die vermehrte Produktion des Coenzym B<sub>12</sub>-bindenden Proteins MutB eine Steigerung der B<sub>12</sub>-Synthese bewirkt. Dazu wurden *E. blattae*-Stämme mit und ohne das sigTorA-MutB-Fusionsprotein eingesetzt. Die in dem Test verwendete *E. coli*-Mutante DSM 4261 ist aufgrund einer defekten B<sub>12</sub>-unabhängigen Methionin-Synthase bei Wachstum in Methionin-freiem Medium auf die Aktivität der B<sub>12</sub>-abhängigen Methionin-Synthase und damit auf das Vorhandensein von B<sub>12</sub> angewiesen. Zur Herstellung der Testplatten wurde nach der Methode unter 2.27.1 verfahren.

Die Rohextrakte (je 2 ml) wurden aus anaerob im 50 ml-Maßstab inkubierten Kulturen von rekombinanten *E. blattae*-Stämmen mit dem sigTorA-MutB-Fusionsprotein

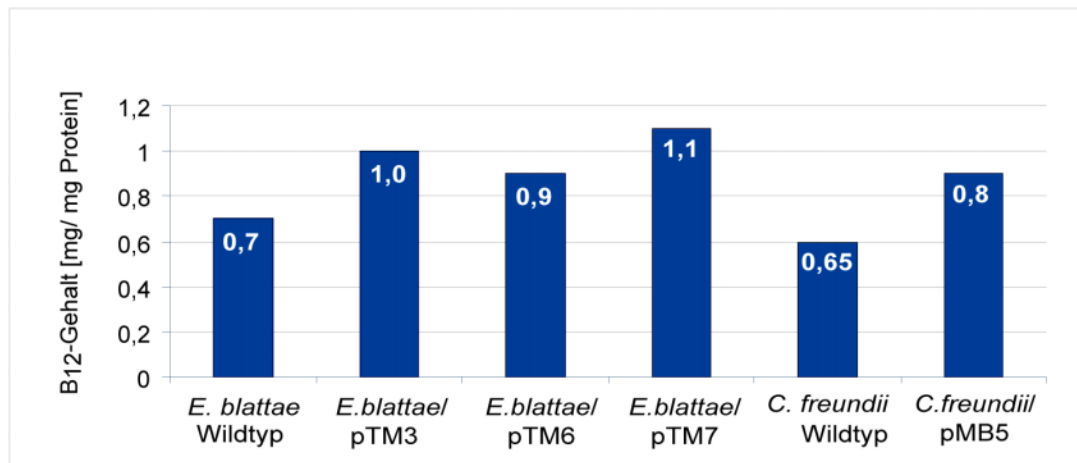
(*E. blattae*/pTM3, *E. blattae*/pTM6, *E. blattae*/pTM7) und als Kontrolle aus dem Wildtyp von *E. blattae* gewonnen (siehe 2.15.2). Dabei waren durch die Anzuchtbedingungen unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Glycerin (siehe 2.14.1) die Voraussetzungen für die B<sub>12</sub>-Synthese der Stämme gegeben. Von allen Kulturen wurden mindestens drei Parallelansätze bearbeitet und im Plattentest immer Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Induktion der Genexpression des Fusionsgens erfolgte dabei mit Arabinose (*E. blattae*/pTM3, *E. blattae*/pTM6) bzw. Anhydrotetracyclin (*E. blattae*/pTM7). Der Proteingehalt aller getesteten Rohextrakte wurde auf 7 mg/ml eingestellt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Pro Testansatz wurden 15 µl (entsprechend 0,1 µg Protein) von insgesamt 2 ml Rohextrakt eingesetzt.



**Abbildung 35:** Abbildung einer Testplatte der quantitativen Bestimmung von B<sub>12</sub>

Die Durchmesser der Zonen um die Filterplättchen sind proportional zur B<sub>12</sub>-Konzentration der aufgetragenen Probe.

Zur Ermittlung der B<sub>12</sub>-Eichgeraden wurden die Durchmesser der roten Zonen um die Filterplättchen der B<sub>12</sub>-Eichlösungen ausgemessen (siehe 2.27.1). Anschließend konnte die eingesetzte B<sub>12</sub>-Menge der Eichwerte mit dem Durchmesser der Zonen in Beziehung gesetzt werden. Die Berechnung der B<sub>12</sub>-Konzentrationen in den verschiedenen Rohextrakten (siehe Abbildung 36 und Tabelle 9) erfolgte mit Hilfe der B<sub>12</sub>-Eichgeraden.



**Abbildung 36: Graphische Darstellung der im Plattentest erhaltenen Mittelwerte der B<sub>12</sub>-Gehalte im Rohextrakt verschiedener B<sub>12</sub>-Produzenten**

Die Werte wurden aus drei verschiedenen Kulturen in unabhängigen Testdurchläufen ermittelt, die wiederum in Doppelbestimmungen durchgeführt worden waren.

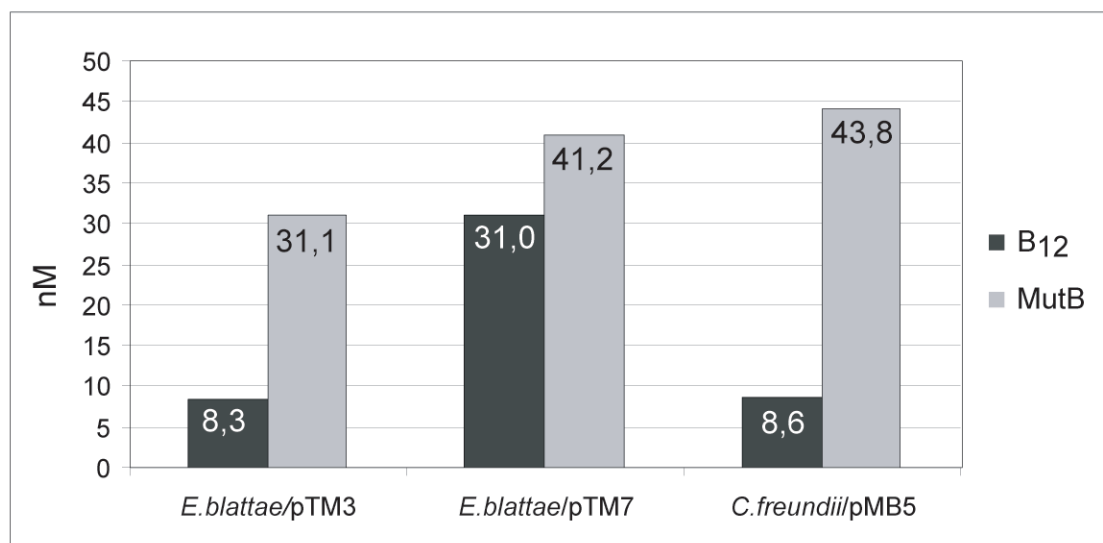
**Tabelle 9: ermittelte B<sub>12</sub>-Konzentrationen in den verschiedenen Rohextrakten**

Organismus	B <sub>12</sub> -Konzentration [µg/ml RE]
<i>E. blattae</i> Wildtyp	4,7
<i>E. blattae</i> /pTM3	6,6
<i>E. blattae</i> /pTM6	6,0
<i>E. blattae</i> /pTM7	7,3
<i>C. freundii</i> Wildtyp	4,3
<i>C. freundii</i> /pMB5	5,3

Sowohl für die *E. blattae*-Stämme als auch für den *C. freundii*-Stamm konnte dabei gezeigt werden, dass die heterologe Produktion von sigTorA-MutB eine erhöhte B<sub>12</sub>-Bildung zur Folge hatte (siehe Abbildung 36 und Tabelle 9). Dabei konnte eine Steigerung von 28-57 % ermittelt werden. Die geringste Konzentration an gebildetem B<sub>12</sub> wies der Rohextrakt von *E. blattae*/pTM6 und die größte der Rohextrakt von *E. blattae*/pTM7 auf.

### 3.6.2 Corrinoidnachweis im Periplasma verschiedener B<sub>12</sub>-Produzenten

Abschließend sollte die Frage untersucht werden, ob der Einsatz des B<sub>12</sub>-Exporters den Transport von Coenzym B<sub>12</sub> ins Periplasma bewirkt. Dazu wurden die periplasmatischen Proben aus den anaeroben 500 ml-Kulturen von verschiedenen *E. blattae*- und *C. freundii*-Stämmen untersucht, in denen die Translokation des sigTorA-MutB-Fusionsprotein bereits im Western-Blot nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 32). Die Quantifizierung des B<sub>12</sub>-Bindeproteins MutB in den Periplasma-Proben erfolgte durch Western-Blot-Analyse (siehe 2.23.2.1 und 2.22.1). Durch den Einsatz verschiedener Konzentrationen eines Strep-TagII-Proteins konnte eine Eichgerade erstellt und über diese die MutB-Konzentration in den periplasmatischen Proben ermittelt werden. Für die Bestimmung der B<sub>12</sub>-Konzentration im Periplasma wurde erneut die Plattentest-Methode von KRZYCKI *et al.*, 1980 herangezogen (siehe 2.27.1). Die in Abbildung 37 dargestellten Werte konnten wie in 3.6.1 beschrieben mit Hilfe der aus den B<sub>12</sub>-Eichlösungen erstellten B<sub>12</sub>-Eichgeraden bestimmt werden (siehe 2.27.1).



**Abbildung 37: Verhältnis von MutB und B<sub>12</sub> im Periplasma verschiedener B<sub>12</sub>-Produzenten**

Die Werte wurden aus vier verschiedenen Kulturen in unabhängigen Testdurchläufen ermittelt, die wiederum in Doppelbestimmungen durchgeführt worden waren.

Für alle eingesetzten Stämme konnte gezeigt werden, dass eine Cotranslokation von B<sub>12</sub> mit dem Bindeprotein MutB stattgefunden hatte. Dabei variierten die ermittelten Verhältnisse von transloziertem MutB zu B<sub>12</sub> zwischen 1,3 und 5,1 zu 1 (siehe Abbildung 37). In *C. freundii*/pMB5 wurde von allen drei Stämmen am meisten MutB

---

Protein im Verhältnis zum Coenzym B<sub>12</sub> ins Periplasma transloziert. Der Stamm *E. blattae*/pTM7 wies die größte Menge an B<sub>12</sub> pro Bindeprotein im Periplasma. Somit konnte für den konstruierten B<sub>12</sub>-Exporter, bestehend aus der TorA-Signalsequenz und B<sub>12</sub>-Bindeprotein MutB, der Nachweis für den Transport von B<sub>12</sub> ins Periplasma erbracht werden.



## 4 Diskussion

### 4.1 Transport von B<sub>12</sub> über Membranen

Einige Mikroorganismen wie z. B. *Citrobacter freundii*, *Escherichia blattae* oder *Klebsiella sp.* vermögen das für verschiedene Reaktionen benötigte Coenzym B<sub>12</sub> selbst zu synthetisieren. Andere B<sub>12</sub>-auxotrophe Mikroorganismen müssen es dagegen aus dem umgebenden Milieu aufnehmen (LAWCRENCE *et al.*, 1991). Beim Import von B<sub>12</sub> entstehen zwei Probleme für die bakterielle Zelle. Zum einen sind Cobalamine zu groß, um über die Porine der äußeren Membran aufgenommen zu werden, und zum anderen kommt B<sub>12</sub> nur in äußerst geringen Konzentrationen in der Umgebung vor. Deshalb ist ein hoch-affines Transportsystem für die Passage über die äußere Membran erforderlich. Ein weiteres System sorgt dann für den B<sub>12</sub>-Transport über die Cytoplasmamembran. (BRAUN, 1995; ROTH *et al.*, 1996). Mit Hilfe des membrangebundenen Transporterproteins BtuB wird das Cobalamin aus dem Medium gebunden und durch Interaktion von BtuB mit TonB ins Periplasma transportiert. TonB ist in der Cytoplasmamembran verankert und durchspannt den periplasmatischen Raum (siehe Abbildung 38; CARDIEUX *et al.*, 1999). Um für den Transport notwendige strukturelle Änderungen hervorzurufen, nutzt das TonB die protonmotorische Kraft. Für die Bindung des Cobalamins an BtuB ist der Cotransport von Calcium notwendig (BRADBEER *et al.*, 1990). Nach der aktiven Konzentrierung des Cobalamins durch das BtuB/ TonB-System im Periplasma wird es, wie bereits von VAN BIBBER *et al.*, 1999 postuliert und von CARDIEUX *et al.*, 2002 bestätigt, auf das periplasmatische Bindeprotein BtuF übertragen. Möglicherweise unterstützt BtuF dabei die Abtrennung des Cobalamins vom BtuB. Der Transport über die innere Membran ist an die Hydrolyse von ATP gebunden und wird durch einen ABC-Transporter bewerkstelligt. Dieser setzt sich aus den Membranproteinen BtuC und BtuD zusammen (ROTH *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zum Aufnahmesystem von B<sub>12</sub> ist für einen B<sub>12</sub>-Export in der Natur bislang kein Beispiel beschrieben worden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein solches System konstruiert werden. Bei der Entwicklung des B<sub>12</sub>-Exporters wurde berücksichtigt, dass der Import des Cobalamins über beide Membranen ausschließlich mit Hilfe von Bindeproteinen erfolgt. Deshalb wurde für den Exporter auch ein Bindeprotein-abhängiges System verwendet. Hierbei wurde das B<sub>12</sub> in der Zelle an ein Bindeprotein gebunden und zusammen mit diesem über die Cytoplasmamembran transportiert.

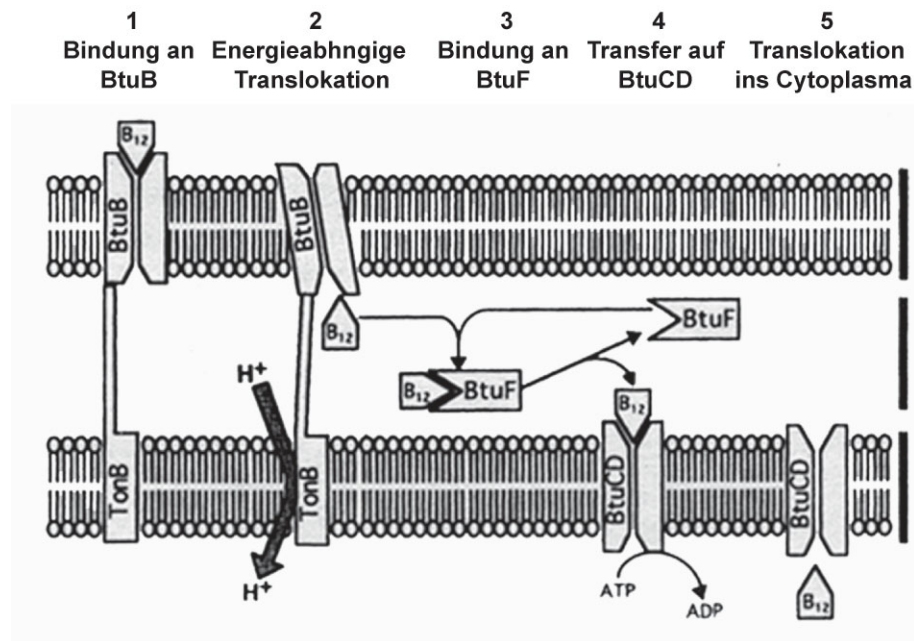
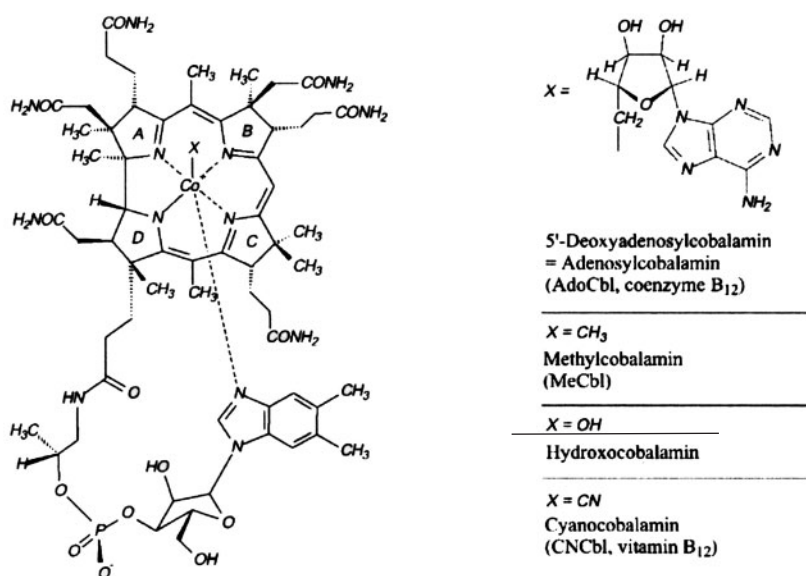


Abbildung 38: B<sub>12</sub>-Aufnahme in *E. coli* aus BRADBEER (1991)

#### 4.2 Coenzym B<sub>12</sub>-abhängige und Cobalamin-bindende Proteine

Vitamin B<sub>12</sub> übernimmt nach seiner Umwandlung zum Cofaktor nicht nur in Mikroorganismen, sondern auch in tierischen Zellen eine wichtige Funktion (ISHIDA *et al.*, 1994). Die physiologische Rolle der B<sub>12</sub>-Derivate ist dabei eng mit ihrer Funktion als Coenzyme in enzymatischen Reaktionen verbunden. (KRÄUTLER, 1998). Sie besitzen die Fähigkeit an Proteine zu binden, um daraufhin mit Substratmolekülen zu reagieren. B<sub>12</sub>-Cofaktoren kommen in zwei aktiven Formen, dem Methylcobalamin (MeCbl) und dem Adenosylcobalamin (5'-Deoxy-5'-adenosylcobalamin; AdoCbl) vor (siehe Abbildung 39). Beim MeCbl ist das Cobaltatom an die Methylgruppe und beim AdoCbl an 5'-Deoxyadenosin gebunden.



**Abbildung 39: Struktur des Vitamin B<sub>12</sub> und der B<sub>12</sub>-Cofaktoren aus MARTENS *et al.* (2002)**

Die Spaltung der Cobalt-Kohlenstoff-Bindung in den beiden Cofaktoren erfolgt dabei auf ganz unterschiedliche Weise, die stark von der Natur ihrer Alkyl-Gruppen bestimmt wird (GOLDING *et al.*, 1998). Während bei MeCbl durch Methyl-Transfer eine heterolytische Spaltung vorliegt und Nukleophile gebildet werden, wird bei AdoCbl die Bindung zwischen dem Cobalt und dem Kohlenstoff homolytisch gespalten und es entstehen freie Radikale.

Methylcobalamin-abhängige Enzyme katalysieren den Transfer von Methylgruppen, die dabei vorübergehend auf das Cobalt des Methylcobalamins übertragen werden. Sie sind an der Synthese von Methionin, Acetat und Methan beteiligt. Ein gut charakterisiertes Enzym aus der Gruppe der Methyltransferasen ist die Methionin Synthase von *E. coli*. Sie unterstützt die Übertragung einer Methylgruppe vom Methyltetrahydrofolat zum Homocystein (LUDWIG & MATTHES, 1997; ZAGALAK, 1982). *E. coli* besitzt neben dieser B<sub>12</sub>-abhängigen auch eine B<sub>12</sub>-unabhängige Methionin-Synthase (WU *et al.*, 1992). Außerdem sind B<sub>12</sub>-abhängige Methyltransferasen auch aus methanogenen Archaeen und acetogenen Bakterien bekannt (BLAYLOCK and STADMAN 1967; WOOD, 1991).

Adenosylcobalamin-abhängige Enzyme sind an verschiedenen Umlagerungsreaktionen beteiligt, wozu Spaltungen von Kohlenstoff-Kohlenstoff-, Kohlenstoff-Sauerstoff- und Kohlenstoff-Stickstoff-Verbindungen gehören. Diese Reaktionen gehören zu Abbauebenen, die anaeroben Bakterien die Fermentation von verschiedenen

Kohlenstoffquellen wie z. B. Glycerin oder Ethanolamin ermöglichen (DANIEL *et al.*, 1999; LUDWIG & MATTHES, 1997). Eine Ausnahme stellt die Ribonukleotid-Reduktase dar. Sie reduziert Ribonukleotid-Triphosphate zu Desoxyribonukleotid-Triphosphaten, die für die DNA-Synthese benötigt werden. In einigen Mikroorganismen wie *Lactobacillus leichmanii* wird diese Reaktion von der Adenosylcobalamin-abhängigen Ribonukleotid-Reduktase katalysiert (BLAKLEY, 1965). Insgesamt 12 verschiedene Adenosylcobalamin-abhängige Enzyme lassen sich aufgrund ihrer Substrate in drei Untergruppen einteilen. Sie bewirken Umlagerung von Amino- oder Hydroxylgruppen in Amino-Alkoholen oder Diolen mit nachfolgender Deaminierung bzw. Dehydratisierung zu Aldehyden. Zur Gruppe der Dehydratasen und Deaminasen zählen die Glycerin-Dehydratase, die Diol-Dehydratase und die Ethanolamin-Ammonium-Lyase. Die Mutasen stellen eine weitere Gruppe dar. Sie katalysieren Veränderungen am Kohlenstoffskelett. Zu ihnen gehören die Methylmalonyl-CoA-Mutase, die Glutamat-Mutase, die  $\alpha$ -Methylglutarat-Mutase und die Isobutyryl-CoA-Mutase. Die dritte Gruppe stellen die Aminomutasen mit der L- $\beta$ -Lysin-[D- $\alpha$ -Lysin]-5,6-Aminomutase, der D-Ornithin-4,5-Aminomutase und der L-Leucin-2,3-Aminomutase dar. Sie katalysieren die 1,2-Umlagerungen einer Aminogruppe in einer Aminosäure und scheinen nur in Clostridien vorzukommen. Als zusätzliches Coenzym benötigen diese Pyridoxalphosphat (MARSH, 1999).

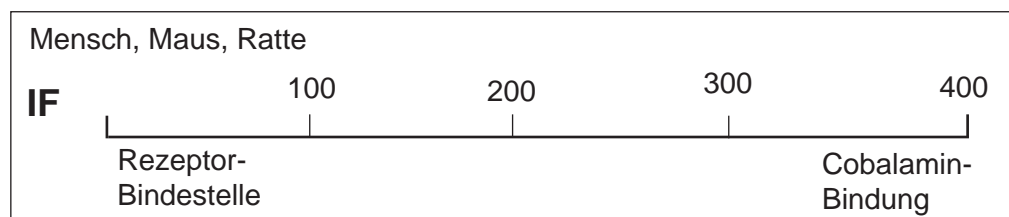
Corrinoid-abhängige Enzyme sind vor allem in der Mikroorganismenwelt vertreten. Bei Tieren und bei Menschen sind nur die Homocystein-Methyltransferase und die Methylmalonyl-CoA-Mutase bekannt (ZAGALAK, 1982). Die cytoplasmatische Methionin-Synthase benötigt Methylcobalamin, um durch Methylierung von Homocystein Methionin zu gewinnen, wobei Methyltetrahydrofolat als Methyl donor fungiert. Adenosylcobalamin hingegen ist in den Mitochondrien an der Isomerisierung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA durch die Methylmalonyl-CoA-Mutase beteiligt (BANERJEE, 1998). Diese Reaktion spielt eine Rolle beim Metabolismus von Propionyl-CoA, das aus dem Abbau von Thymin, Valin, Methionin oder ungeradzahligen Fettsäuren hervorgeht (MARTENS *et al.*, 2002).

An der Aufnahme und dem Transport von Cobalamin aus der Nahrung des Menschen sind drei lösliche Proteine beteiligt: der Intrinsic Faktor (IF), Transcobalamin (TC) und Haptocorrin (HC). Diese Proteine stellen sicher, dass die geringen Mengen an B<sub>12</sub>, die mit der Nahrung aufgenommen werden, auch zu den beiden intrazellulären Enzymen, Methionin-Synthase und Methylmalonyl-CoA-Mutase, gelangen (KRÄUTLER, 1998). Der Intrinsic Faktor hat seinen Namen von dem früher als Extrinsic Faktor bezeichneten Vitamin B<sub>12</sub> und wird im Magen produziert. Dort übernimmt er das vom Haptocorrin im Speichel gebundene Cobalamin. Anschließend wird der IF-Cobalamin-Komplex im Intestinaltrakt von Rezeptoren absorbiert und auf Haptocorrin und Transcobalamin

übertragen, um auf diesem Wege in die Zelle zu gelangen. Das meiste Cobalamin wird in die Leber und Niere transportiert. In den Zellen wird dann das Cobalamin in die zwei enzymatisch aktiven Coenzym-Formen umgewandelt (NEXØ, 1998).

Der Intrinsic Faktor ist einer der beiden B<sub>12</sub>-Bindeproteine, die zur Konstruktion des B<sub>12</sub>-Exporters im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt wurden. Er weist eine Größe von etwa 50 kDa auf und ist natürlicherweise stark glykosyliert. Zwar scheint die Glykosylierung von geringerer Bedeutung für die Bindung des B<sub>12</sub> und die anschließende Kopplung an den Rezeptor zu sein. Dafür schützt sie mit großer Wahrscheinlichkeit den Intrinsic Faktor vor Degradation. Nicht glykosylierter IF ist somit funktionell identisch zum glykosylierten Protein (GORDON, 1997).

Lokalisiert ist der IF auf dem Chromosom 11, weist neun Exons und 8 große Introns und eine TATA-Box auf. Fehlen 12 % des C-terminalen Endes, so ist er nicht mehr in der Lage B<sub>12</sub> zu binden (NEXØ, 1998). Die Aminosäure-Reste 29 bis 62 von insgesamt 399 des reifen IF, stellen die Rezeptorbindestelle dar (siehe Abbildung 40; TANG *et al.*, 1992).



**Abbildung 40: Proteinstruktur des menschlichen Intrinsic Faktors aus NEXØ, (1998)**

Der Intrinsic Faktor wurde besonders wegen seiner hohen Bindekapazität als B<sub>12</sub>-Bindeprotein ausgewählt, wobei Hydroxy- Methyl-, 5'-Deoxyadenosyl und Cyanocobalamin etwa gleich gut gebunden werden. (KRÄUTLER, 1998; NEXØ, 1998). Durch die Bindung von B<sub>12</sub> wird der Radius des Intrinsic Faktors reduziert. Die molare Binderate von IF zu Cobalamin liegt bei 30:1, es werden also 1 ng B<sub>12</sub> von 30 ng Intrinsic Faktor gebunden.

Viele verschiedene prokaryotische Expressionssysteme wurden bereits getestet und alle als unzureichend befunden, da sich in keinem von ihnen reproduzierbare Mengen an Intrinsic Faktor detektieren ließen. GORDON (1997) gelang es mit Hilfe des Bakulovirus das Protein in geringer Konzentration (1-3 mg/ l Medium) zu synthetisieren. Das Expressionssystem der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris* hingegen ermöglichte die Produktion des menschlichen IF mit einer Rate von

10-40 mg/l. Für die Klonierung in den Expressionsvektor pPIC9 war dabei die Signalsequenz des IF entfernt worden. Western-Blot-Analysen zur Detektion des menschlichen IF in *Pichia pastoris* hatten gezeigt, dass neben der Bande bei 55 kDa auch drei zusätzliche, aber schwächere Signale bei 32, 28 und 23 kDa auftraten. Dabei handelte es sich vermutlich um Degradationsprodukte der größeren IF-Bande (WEN *et al.*, 1999).

In den Experimenten zu dieser Arbeit wurde das *if-Gen* mit Hilfe des Konstruktes pTM1 (siehe Abbildung 7) in *E. coli* DH5 $\alpha$  exprimiert. Es gelang dabei nur eine geringe heterologe Produktion durch SDS-PAGE- und Western-Blot-Analysen nachzuweisen (siehe 3.2). Außerdem traten neben der schwachen 55-kDa Bande des IF auch noch kleinere Proteinbanden bei den Analysen hervor (siehe Abbildung 10 und Abbildung 16 bis Abbildung 18). Es wäre denkbar, dass es sich bei diesen Banden um Degradationsprodukte des IF handelt, da in *E. coli* keine Glykosylierung der Proteine stattfindet. Damit fehlte der natürliche Schutz des IF vor dem Abbau durch Proteasen. Somit ist es wahrscheinlich, dass der heterolog produzierte IF zum Großteil abgebaut wurde. Dies erklärt die geringen Produktionsmengen im Rahmen dieser Arbeit, die zur Folge hatten, dass nur wenig IF im Cytoplasma vorlag, welches ins Periplasma transportiert werden konnte. Daher liegt es nahe, dass sich aufgrund der geringen IF-Konzentration kein B<sub>12</sub>-Export ins Periplasma nachgewiesen ließ. Der IF schien somit ungeeignet für den Einsatz im B<sub>12</sub>-Exporter-Modell. Weitere Studien wurden deshalb mit einem alternativen B<sub>12</sub>-Bindeprotein durchgeführt.

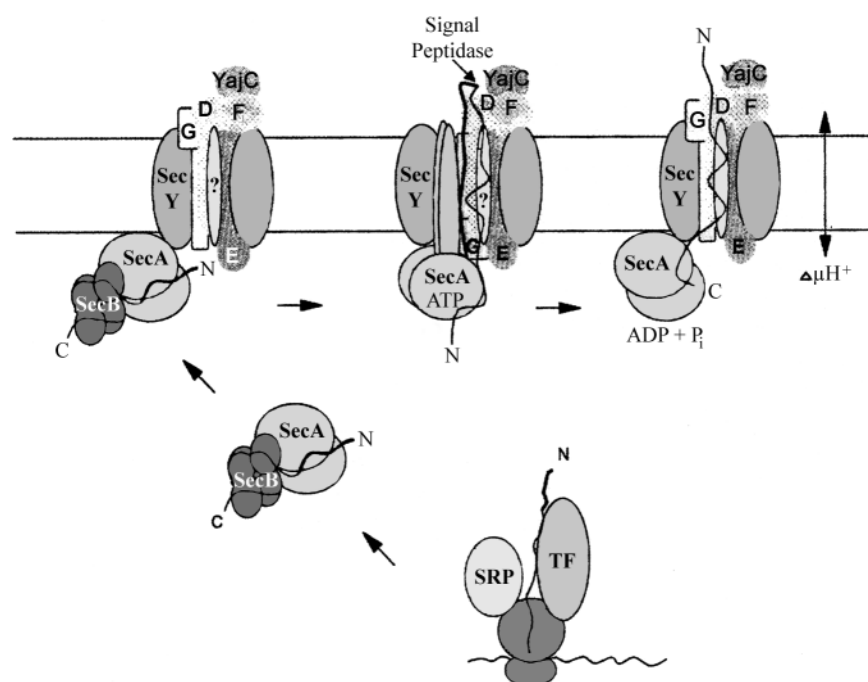
Als zweites B<sub>12</sub>-Bindeprotein wurde die Methylmalonyl-CoA-Mutase aus *Propionibacterium shermanii* für die Konstruktion des B<sub>12</sub>-Exporters ausgesucht, da ihre Kristallstruktur bereits aufgeklärt ist (MANCIA *et al.*, 1996). In dem Gram-positiven Mikroorganismus ist das Adenosylcobalamin-abhängige Enzym an der Fermentation von Pyruvat zu Propionat beteiligt. Dabei katalysiert es die Interkonversion zwischen Methylmalonyl-CoA und Succinyl-CoA. Die Methylmalonyl-CoA-Mutase ist ein  $\alpha\beta$ -Heterodimer mit einer Molekularmasse von 150 kDa (MANCIA *et al.*, 1996). Die Bindung des Substrates oder Inhibitors erfolgt durch die N-terminale Domäne der 80 kDa  $\alpha$ -Kette. Die C-terminale Domäne der gleichen Kette bindet das Coenzym B<sub>12</sub>. Kodiert wird die  $\alpha$ -Untereinheit von *mutB*. Da die  $\beta$ -Untereinheit nicht an der Bindung des Coenzym beteiligt ist, wurde für die Konstruktion eines Transporterproteins nur die  $\alpha$ -Kette der Methylmalonyl-CoA-Mutase verwendet, um die Molekularmasse des B<sub>12</sub>-Bindeproteins möglichst gering zu halten (EVANS and MANCIA, 1998). Dazu wurde das *mutB*-Gen mit der Tat-Signalsequenz der TMAO-Reduktase aus *E. coli* fusioniert. Die Expressionsstudien in *E. coli* JM109 und BL21 (DE3), *S. typhimurium*, *C. freundii* und *E. blattae* hatten gezeigt, dass im Gegensatz

zum IF große Mengen an MutB heterolog produziert werden konnten (siehe Abbildung 20 bis Abbildung 22 und Abbildung 24 bis Abbildung 26).

### 4.3 Signalsequenz-abhängiger Proteintransport ins Periplasma

Viele lösliche oder membrangebundene Proteine müssen in oder über Membranen transportiert werden, um ihren endgültigen Funktionsort zu erreichen (SCHATZ und DOBBERSTEIN, 1996). Die meisten Proteine werden durch die von SecY und SecE geformte Pore exportiert. Dabei existieren zwei verschiedene Mechanismen, um die Proteine zu der als Translokon bezeichneten SecYE-Pore zu geleiten. Integrale Membranproteine werden durch direkte Interaktion ihres Signalankers mit dem bakteriellen „signal recognition particle“ (SRP) spezifisch erkannt. Dabei werden, außer SecYE, keine weiteren Sec-Proteine für die Integration in die Membran benötigt. Bei dem zweiten Mechanismus werden Präproteine mit einer Signalsequenz synthetisiert und anschließend mit Hilfe von cytoplasmatischen Chaperonen zu den spezifischen Rezeptoren in der Membran geleitet. Diese Signalpeptide werden nach der Translokation abgespalten. Ein Großteil der periplasmatisch lokalisierten Enzyme wird über den Sec (secretory)-Weg transportiert (siehe Abbildung 41; WICKNER *et al.*, 1991). SecB fungiert dabei als Chaperon und dirigiert die Präproteine zur Cytoplasmamembran. Außerdem hält es die Vorläuferproteine in einem unvollständigen Faltungszustand, der für die Translokation erforderlich ist (COLLIER *et al.*, 1988). SecB liegt als Heterodimer im Cytoplasma vor und weist im Gegensatz zu vielen anderen Chaperonen keine ATPase-Aktivität auf. Nach der Interaktion von SecB mit SecA wird das Präprotein auf SecA transferiert. Sobald ein ATP an SecA gebunden hat, löst sich SecB von der Membran, um ein neues Präprotein zu binden. Die ATPase SecA spielt eine Schlüsselrolle bei der Translokation der Vorläuferproteine über die Cytoplasmamembran. Durch wiederholte ATP-Bindung liefert sie die für die Reaktion benötigte Energie. Die Bindung an den SecYEG Komplex aktiviert das SecA für die Erkennung von SecB und der Präproteine. Die Membranproteine SecD, SecG, SecF und YajC sind nicht direkt an der Proteintranslokation beteiligt, stabilisieren aber beispielsweise die aktive Konformation von SecA. Ausgelöst durch die Bindung des Präproteins an SecA tauscht es ein gebundenes ADP gegen ein ATP an einer seiner beiden Bindungsstellen aus. Die Energie, die bei der ATP-Bindung entsteht, ermöglicht die Insertion der SecA-Domäne zusammen mit der Signalsequenz und der N-terminalen Region des Vorläuferproteins in der Membran. Nach der Insertion kann das Präprotein durch ATP-Hydrolyse freigesetzt werden. Das SecA wird durch die Bindung und Hydrolyse eines weiteren ATP an der zweiten Bindestelle aus der Membran

freigegeben. Durch wiederholte Zyklen der SecA-Präprotein-Bindung, ATP-Bindung und -Hydrolyse und der Dissoziation des SecA Moleküls von der Membran wird eine schrittweise Translokation des gesamten Präproteins über die Membran bewirkt (siehe Abbildung 41). Anschließend wird das Signalpeptid von der Signalpeptidase abgespalten. Die Vorläuferproteine, die über den Sec-Weg transportiert werden, enthalten die Informationen dafür nicht nur in der Signalsequenz, sondern auch im reifen Teil des Proteins. (MÜLLER *et al.*, 2001; FEKKES and DRIESSEN, 1999; KUMAMOTO, 1991; KUMAMOTO *et al.*, 1985).



**Abbildung 41: Schematische Darstellung der Proteinsekretion über den Sec-Transportweg aus MÜLLER *et al.* (2001)**

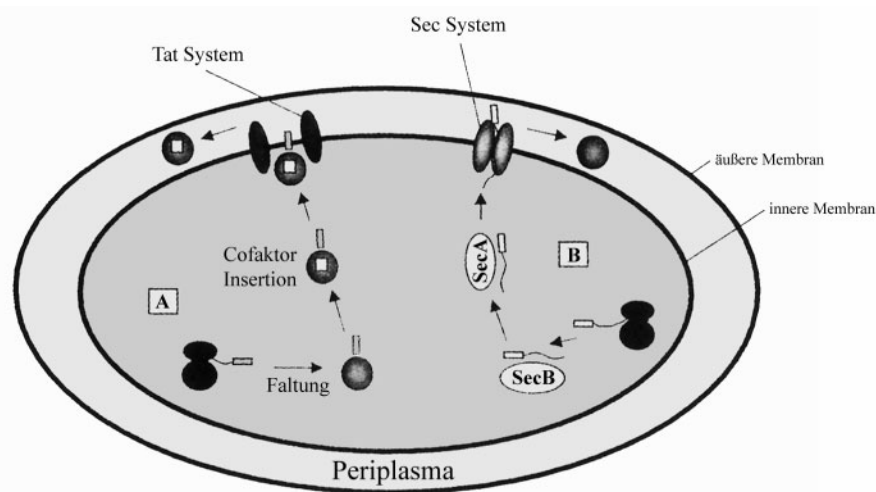
Das Periplasma enthält nur etwa 4 % des gesamten Zellproteins. Viele verschiedene Signalpeptide konnten bislang für die erfolgreiche Translokation von Proteinen ins Periplasma von *E. coli* eingesetzt werden. Dazu gehören beispielsweise prokaryotische Signalsequenzen wie die der Alkalischen Phosphatase PhoA und des Outer Membrane Proteins OmpA (DENÈFLE *et al.*, 1989), der  $\beta$ -Lactamase aus *E. coli* (KADONOGA *et al.*, 1984) oder der Pectat Lyase PelB aus *Erwinia carotovoa* (LEI *et al.*, 1987). Allerdings ermöglicht eine Signalsequenz nicht automatisch eine effiziente Proteintranslokation über die Cytoplasmamembran. So konnten menschliche Immunoglobuline durchaus erfolgreich in Bakterien produziert und transloziert werden, während die Produktion von T-Zell-Rezeptorvarianten trotz der strukturellen



Ähnlichkeit zu den Immunoglobulinen sich als weit schwieriger erwies. Obwohl das Signalpeptid in korrekter Weise abgespalten wurde, konnte kein Protein im Periplasma detektiert werden. WÜLFING and PLÜCKTHUN (1994) gelang es durch Induktion der Hitzeschockproteine zusammen mit der Überexpression von DsbA, was zum Dsb-System gehört und die Bildung von Disulfidbrücken bei Proteinen der Zellhülle katalysiert, immerhin Fragmente von korrekt gefalteten T-Zell-Rezeptorproteinen im Periplasma nachzuweisen. Es wurde davon ausgegangen, dass dabei eine große Anzahl von verschiedenen Chaperonen induziert worden war, darunter auch bislang unbekannte periplasmatisch lokalisierte. Neben den Signalpeptiden sind auch andere strukturelle Merkmale der Proteine an dem Membrantransport beteiligt. Strategien für die effizientere Translokation der Proteine ins Periplasma beinhalten auch die Zugabe von Komponenten, die an dem Transport beteiligt sind. Allerdings sind noch nicht alle an der Translokation mitwirkenden Mechanismen vollständig aufgeklärt. (MAKRIDES, 1996; WALL and PLÜCKTHUN, 1995; CHEAH *et al.*, 1994).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des IF auch mit Hilfe des Vektors pET 20b(+) untersucht. Dabei sollte der Transport des Proteins über den Sec-Weg erfolgen, da die vorausgegangenen Experimente nur zu einer sehr geringen Transportrate des IF-Proteins über den Tat-Weg geführt hatten. In dem Expressionsvektor pET 20b(+) erfolgt die periplasmatische Translokation mit Hilfe der *pELB*-Signalsequenz aus *Erwinia caratovora* (siehe 3.3.3). Auch bei dem Transport über das Sec-System wurden nur minimale Mengen an IF ins Periplasma transloziert. Möglicherweise fehlen für die korrekte Faltung des menschlichen IF im Cytoplasma der eingesetzten Expressionsstämme (beim Transport über den Tat-Weg) und im Periplasma (beim Transport über den Sec-Weg) ganz entscheidenden Komponenten. Denkbar wäre, dass die geringe Produktion und damit auch Translokation des IF in den verwendeten prokaryotischen Organismen eine Folge der unzureichenden Faltung des Proteins ist.

Ein entscheidendes Kriterium der Translokation über den Sec-Weg ist, dass durch die SecYE Pore nur unvollständig gefaltete Proteine transportiert werden können. In dem konstruierten B<sub>12</sub>-Exporter soll der Export von B<sub>12</sub> ins Periplasma erst nach Bindung an das B<sub>12</sub>-Bindeprotein durch den anschließenden Transport des Enzym-Cobalamin-Komplexes erfolgen. Dafür muss das Bindeprotein bereits im Cytoplasma nativ vorliegen. Ein Transport über den Sec-Weg ist somit nicht möglich.



**Abbildung 42: Schematische Darstellung des Proteinexports über den Sec- und den Tat-Transportweg aus ROBINSON (2000)**

Seit Anfang der 90.er Jahre ist ein weiterer genereller Protein-Exportweg in Bakterien bekannt, der sich deutlich vom Sec-Weg unterscheidet. Dieser Transportweg wurde als Tat (für „twin arginine translocation“) -System bezeichnet, da die beteiligten Signalpeptide ein charakteristisches Motiv, bestehend aus zwei Arginin-Resten, aufweisen. Alternativ wird der Tat-Weg auch als Mtt (membrane targeting and transport) -Weg bezeichnet, da dieser Transportweg auch für integrale Membranproteine wie die Formiat-Dehydrogenase O von *E. coli* (BENOIT *et al.*, 1998) genutzt wird (WEINER *et al.*, 1998).

Ein ganz entscheidendes Merkmal des Proteintransportes über den Tat-Weg ist, dass nur gefaltete Proteine transportiert werden. Die Molekularmasse der Proteine spielt dabei eine untergeordnete Rolle. Das kleinste bekannte Substrat des Tat-Systems ist das 9 kDa HIPIP („high potential iron-sulfur protein“) von *Chromatium vinosum*, dessen Durchmesser bei 20 bis 30 Å liegt (CHARTER *et al.*, 1974). Der größte bekannte Proteinkomplex hingegen, der durch das Tat-System transportiert wird, ist die 142 kDa große FdnGH Untereinheit der Formiat-Dehydrogenase von *E. coli* (BERG *et al.*, 1991). Der Durchmesser dieser Untereinheit beträgt 70 Å. Die beiden B<sub>12</sub>-Bindeproteine IF (55 kDa) und MutB (80 kDa), die für den B<sub>12</sub>-Exporter ausgewählt wurden, liegen damit im Größenbereich, der durch das Tat-System transportiert wird.

Eine Vielzahl von Proteinen, die über diesen Weg ins Periplasma oder die Membran transloziert werden, sind Cofaktor-abhängig. Der Cofaktor wird dabei bereits im Cytoplasma vor dem Export an das Enzym gebunden. Dazu gehören beispielsweise die Trimethyl-N-Oxid-Reduktase (TorA) aus *E. coli*, (SARGENT *et al.*, 1999), die

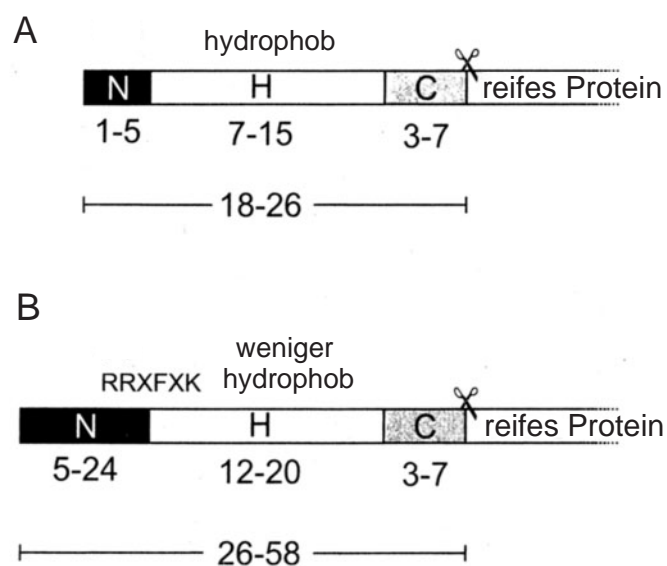
Glucose-Fructose-Oxidoreduktase von *Zymomonas mobilis* (WIEGERT *et al.*, 1996) oder die Aldehyd-Dehydrogenase aus *Acetobacter polyoxogenes* (TAMAKI *et al.*, 1989). Bei den Cofaktoren handelt es sich um Eisen-Schwefel-Cluster, Molybdopterin Cofaktoren, einige Kupfer-Cluster, NAD<sup>+</sup> und FAD. Ist die Cofaktor Bindung blockiert, so wird das Vorläuferprotein im Cytoplasma angehäuft. Das wiederum lässt vermuten, dass die Cofaktorbindung eine Voraussetzung für den Export dieser Proteine ist. (BERKS 1996; SANITNI *et al.*, 1998). Es werden aber auch Proteine ohne Cofaktoren über den Tat-Transportweg aus dem Cytoplasma geschleust, da sie vermutlich entweder cytoplasmatische Faktoren für die Faltung benötigen oder sich zu schnell und eng falten, um über den Sec-Weg transportiert werden zu können (BERKS, 1996; BRÜSER *et al.*, 1998).

Der bakterielle Tat-Weg weist strukturelle und mechanistische Ähnlichkeiten zu dem  $\Delta$ pH-abhängigen Protein-Import Weg auf. Dort sind Signalpeptide mit einem Twin-Arginin-Motiv für die Aufnahme von Proteinen über die Thylakoidmembran von Chloroplasten durch die  $\Delta$ pH-getriebene Protein-Translokase verantwortlich (BRINKS *et al.*, 1998). Beide Wege erfordern ähnlich Komponenten und Signale für den Transport der Proteine, was eine evolutionäre Verwandtschaft vermuten lässt. So gelang es MORI und CLINES (1998) das bakterielle Tat-Signalpeptid der kleinen Untereinheit der Hydrogenase 1 (HyaA) von *E. coli* mit dem Plastocyanin zu fusionieren und anschließend einen effizienten Transport des Fusionsproteins über die Thylakoidmembran nachzuweisen (DALBEY and ROBINSON, 2000; CHADDOCK *et al.*, 1995; SETTLES and MAERTIENSSEN, 1998).

Tat-Signalpeptide haben eine ähnliche Einteilung in Amino (N)-Terminus,  $\alpha$ -helicale Kernregion (H-Region) und C-terminale Region wie die Signalpeptide des Sec-Weges. Allerdings weisen sie einige unverwechselbar Unterschiede auf. Der wichtigste davon ist das konservierte Sequenz-Motiv (S/T)-**R-R-x-F-L-K** an der Grenze zwischen der N- und H-Region. Zunächst wurde angenommen, dass die beiden Arginin-Reste essentiell für einen effizienten Transport und völlig invariabel sind (BERKS, 1996). Die Substitution ein oder beider Arginin-Reste gegen ein oder zwei Lysin-Reste in der Signalsequenz der Glucose-Fructose Oxidoreduktase aus *Zymomonas mobilis* hatte die vollständige Blockierung des Protein-Exports zur Folge (HALBIG *et al.*, 1999). Ebenso konnte kein Transport mehr nachgewiesen werden, nachdem das erste Arginin in dem Konsensus-Motiv der Signalsequenz der Nitrat-Oxidoreduktase aus *Pseudomonas stutzeri* durch ein Aspartat ersetzt worden war (DREUSCH *et al.*, 1997). Andere Studien zeigten allerdings, dass der Austausch des ersten Arginins durch verschiedene Aminosäuren in dem Fusionsprotein bestehend aus der Tat-Signalsequenz der Hydrogenase von *Desulfovibrio vulgaris* und der  $\beta$ -Lactamase von *E. coli* nur zu einer Hemmung und nicht zu einer kompletten Unterbindung des Exports führte (NIEVIÈRE

*et al.*, 1992). Auch die Substitution eines Arginins gegen ein Lysin in der Signalsequenz von SurfI aus *E. coli* führte nur zu einem stark verlangsamten Export des Proteins (STANLEY *et al.*, 2000). HINSLEY *et al.* (2001) fanden schließlich in der Tetrathionat Reduktase aus *Salmonella enterica* das erste und bislang einzige natürlich vorkommende Tat-Signalpeptid, das nur ein Arginin enthält und trotzdem voll funktionstüchtig ist. In einigen Tat-Signalpeptide scheinen die beiden Arginine nicht obligatorisch für die Translokation zu sein. Die anderen Aminosäuren des Konsensus-Motivs kommen mit einer Häufigkeit von mehr als 50 % vor (BERKS 1996).

Die Tat-Signalpeptide haben eine durchschnittliche Länge von 26 bis 58 Aminosäuren und sind damit im Mittel um 14 Aminosäuren länger als die Signalpeptide des Sec-Weges (siehe Abbildung 43). Hervorgerufen wird dieses Merkmal durch eine ausgedehnte N-Region. Die C-Region enthält basische Aminosäuren, die korrespondierende Sec-Region weist dagegen kaum geladene Reste in der Nähe der Spaltstelle für die Signalpeptidase auf. Die H-Region enthält viele Glycin- und Threonin- Reste, aber nur wenige Leucin-Reste und ist deutlich weniger hydrophob als die entsprechende Region der Sec-Signalpeptide.



**Abbildung 43: Vergleich des Sec-Signalpeptids (A) mit dem Tat-Signalpeptid (B) aus FEKKES und DRIESSEN (1999)**

Die Schere kennzeichnet die Stelle, an der die Signalpeptidase das Signalpeptid nach der Translokation abspaltet.

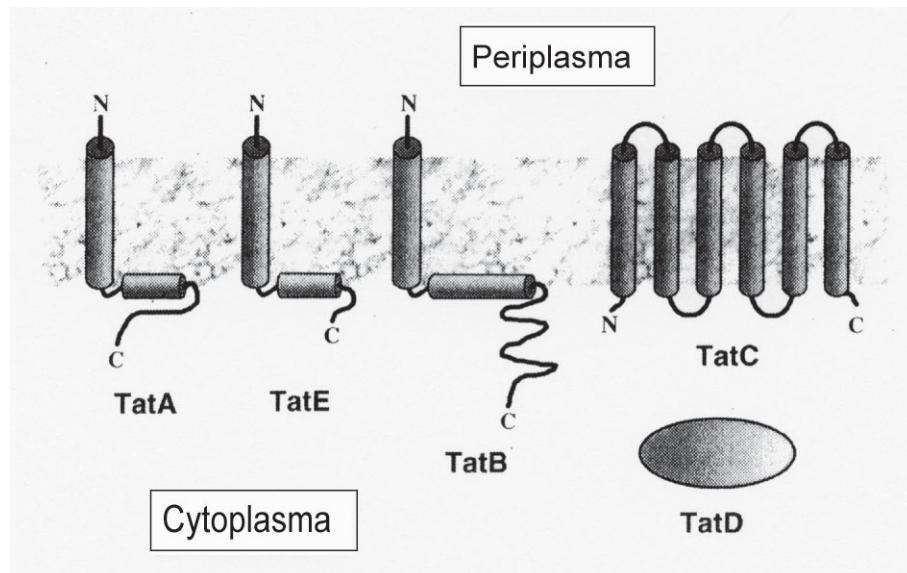
BOGSCH *et al.* (1997) und CHRISTÓBAL *et al.* (1999) beschrieben, dass in den Tat-Signalpeptiden nicht nur die Informationen für den Transport über den Tat-Weg, sondern auch Signale zu Verhinderung der Translokation über den Sec-Weg enthalten

sind. Die Interaktion mit dem Sec-Weg wird durch eine Kombination der relativ geringen Hydrophobizität in der H-Region und dem Vorhandensein von basischen Aminosäure-Resten in der C-Region verhindert. Die Rolle der übrigen Aminosäuren der Konsensus-Sequenz ist bislang noch nicht erforscht worden. Auch ist noch nicht bekannt an welcher Stelle der Sec-verhindernde Effekt einwirkt. Es wird vermutet, dass durch die Interaktion mit SecA oder SecB ein Transport über den Sec-Weg verhindert wird (BOGSCH *et al.*, 1997; BERKS *et al.*, 2000).

Durch Studien in *E. coli* konnten vier Gene identifiziert werden, die am Proteinexport beteiligt sind. Während *tatABC* in einem Operon organisiert sind, bildet *tatE* eine unabhängige Transkriptionseinheit. „Knockout“ Experimente zeigten, dass für einen Protein-Export über den Tat-Weg mindestens TatB, TatC und entweder TatA oder TatE notwendig sind, wobei TatA wichtiger zu sein scheint als TatE (WEINER *et al.*, 1998; SARGENT *et al.*, 1998; BOGSCH *et al.*, 1998; SARGENT *et al.*, 1999). Bei allen vier Tat-Proteinen handelt es sich um integrale Membranproteine (MÜLLER *et al.*, 2001). TatA, B und E sind homolog zu Hcf106, der ersten identifizierten Komponente aus dem  $\Delta$ -pH-abhängigen Weg. Neben TatA, B und E sind noch zwei weitere Tat-Proteine, TatC und TatD, bekannt. TatD ist ein wasserlösliches cytoplasmatisches Enzym, dessen Deletion keinen Defekt im Transportsystem hervorruft (SARGENT *et al.*, 1998). TatC ist dagegen ein essentielles, stark hydrophobes Protein, das vermutlich sechs transmembrane Helices enthält (BOGSCH *et al.*, 1998). Es wird angenommen, dass es von TatB durch Bildung eines Komplexes stabilisiert wird, da es ohne TatB zu einer schnellen Degradation von TatC kommt. Dabei könnte TatC als Bindestelle für das Vorläuferprotein dienen (SARGENT *et al.*, 1999).

Bislang ist noch nicht geklärt, wie genau diese Proteine zu der Bildung der Translokase beitragen und ob bzw. wie sie an der Erkennung der Tat-Signalsequenz beteiligt sind. BERKS *et al.* (2000) postulierten u. a. ein Modell, in dem die Pore von vielen Kopien der TatABE-Proteine gebildet wird. Dabei formen die N-terminalen transmembranen Helices dieser Proteine die Pore und die C-Termini kontrollieren den Zugang an der cytoplasmatischen Seite. Durch die zirkuläre Struktur könnten die einzelnen Untereinheiten aneinander entlang gleiten und sich dadurch den verschiedenen Durchmessern der transportierten Proteine anpassen. SARGENT *et al.* (2001) konnten durch Isolierung eines 600 kDa TatAB-Komplexes die postulierte Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen bestätigen. Weiterhin nehmen sie an, dass es sich bei TatA um die Hauptkomponente der Pore handelt. BOLHUIS *et al.* (2001) fanden dagegen heraus, dass die Proteine TatA, B und C zusammen einen 600 kDa Komplex bilden. So beschrieben sie ein Modell, in dem aufgrund der Größe des Komplexes mehrere TatA, B und C Untereinheiten die Pore ausbilden. Als einzige offensichtliche Energiequelle

für die Translokation bakterieller Tat-Substrate kommt die protonmotorische Kraft in Frage. Wie sie genutzt wird ist aber noch unbekannt (MÜLLER *et al.*, 2001).



**Abbildung 44: Modell für den Aufbau der Strukturgene des Tat-Weges aus BERKS *et al.* (2000)**

Für die Konstruktion des B<sub>12</sub>-Exporters in dieser Arbeit wurde die Signalsequenz der Trimethylamin-N-Oxid Reduktase (TorA) aus *E. coli* (siehe Abbildung 45) mit den B<sub>12</sub>-Bindeproteinen IF oder MutB fusioniert. Der Export des löslichen TorA-Enzyms über den Tat-Weg ist besonders eingehend untersucht worden (SANTINI *et al.*, 1998; WEINER *et al.*, 1998; SARGENT *et al.*, 1999). Es handelt sich dabei um ein unter anaeroben Bedingungen synthetisiertes periplasmatisches Molybdoenzym. Es reduziert Trimethylamin-N-Oxid zu Trimethylamin und ermöglicht dem Organismus dadurch alternative Elektronenakzeptoren zu nutzen. Die TMAO-Reduktase wird von dem *torA* Gen des *torCAD* Operons kodiert, dessen Expression bei der Anwesenheit von TMAO durch das Zweikomponentensystem TorS/TorR induziert wird (ANSALDI *et al.*, 1999). Das korrespondierende Genprodukt setzt sich aus zwei identischen 90 kDa-Untereinheiten zusammen (SILVESTRO *et al.*, 1989). Das TorA-Vorläuferprotein besitzt eine N-terminale Signalsequenz von 39 Aminosäuren Länge (MÉJAN *et al.*, 1994).



**Abbildung 45: Aminosäuresequenz des Signalpeptids der Trimethylamin-N-Oxid Reduktase (TorA) aus *E. coli* aus MÉJAN *et al.* (1994)**

Die Konsensus Sequenz ist durch dick gedruckte Buchstaben hervorgehoben. Das schwarze Dreieck markiert die Stelle, an der das Signalpeptid nach der Translokation abgespalten wird.

Das Tat-Signalpeptid weist die zuvor beschriebenen Merkmale von Tat-Signalpeptiden auf. Die N-Region des TorA-Signalpeptids beinhaltet 13 Aminosäure-Reste mit einer insgesamt positiven Ladung und das doppelte Arginin-Motiv. Die H-Region besteht aus vorwiegend hydrophoben Resten und die C-Region mit ihren 6 Aminosäuren weist die A-T-A-Erkennungsstelle für die Signalpeptidase auf. Um eine reibungslose Abspaltung des Signalpeptids bei dem in dieser Arbeit entwickelten B<sub>12</sub>-Exporter zu gewährleisten, wurde zusätzlich die Gen-Sequenz für die ersten fünf Aminosäuren des reifen TorA-Proteins zwischen der Signalsequenz und dem B<sub>12</sub>-Bindeprotein in den Fusionsgenen *sigtorA-if-* und *sigtorA-mutB* kloniert. Die Wahl des Tat-Signalpeptids fiel auf die TorA-Signalsequenz, da sie bereits mehrfach erfolgreich eingesetzt wurde, um Proteine über den Tat-Weg zu translokieren, die normalerweise über den Sec-Weg ins Periplasma gelangen. So fusionierten beispielsweise SANTINI *et al.*, (2001) die TorA-Signalsequenz mit dem GFP („green fluorescent“ Protein) aus Quallen. Anschließend gelang es ihnen, korrekt gefaltetes GFP nach der Translokation über den Tat-Weg im Periplasma von *E. coli* nachzuweisen. In einer anderen Studie konnte die periplasmatische GFOR (Glucose-Fructose-Oxidoreduktase) aus *Zymomonas mobilis* nur mit Hilfe der TorA-Signalsequenz ins Periplasma von *E. coli* transloziert werden. Ein Transport nach Expression mit dem natürlichen Signalpeptid des GFOR-Enzyms, welches ebenfalls ein Twin-Arginin-Motiv aufweist, fand dagegen in *E. coli* nicht statt. Dies war ein Hinweis darauf, dass Tat-Signalpeptide nicht universell von Tat-Translokasen erkannt werden. Da die Expressionsstudien des B<sub>12</sub>-Exporters zunächst in *E. coli* und anschließend in dem nahe verwandten B<sub>12</sub>-produzierenden Enterobakterium *C. freundii* erfolgen sollten, wurden ein Tat-Signalpeptid aus *E. coli* genommen. Mit Hilfe der TorA-Signalsequenz aus *E. coli* gelang es in dieser Arbeit, das Fusionsprotein sigTorA-MutB ins Periplasma von *E. coli* BL21 (DE3) zu transportieren (siehe Abbildung 29). Dabei war aber noch ein erheblicher Anteil im Cytoplasma und den Membranen verblieben. Weiterhin war es möglich, das Fusionsprotein auch unter anaeroben Bedingungen in den Enterobakterien *C. freundii* und *E. blattae* in großen Mengen zu produzieren (siehe Abbildung 31). Die sich anschließenden Experimente zur Translokation des Fusionsproteins in *C. freundii* und *E. blattae* unter anaeroben

Bedingungen führten dann zur Translokation des größten Teils von sigTorA-MutB ins Periplasma (siehe Abbildung 32). Es konnte damit gezeigt werden, dass generell eine Translokation der B<sub>12</sub>-bindenden Untereinheit aus *P. shermanii* (MutB) über den Tat-Weg möglich ist und auf diese Weise mit Hilfe der TorA-Signalsequenz aus *E. coli* ein Transport von MutB über die Cytoplasmamembran auch unter anaeroben B<sub>12</sub>-produzierenden Bedingungen erfolgt.

#### 4.4 Einfluss der Produktion und des Exports der sigTorA-Fusionsproteine auf die Coenzym B<sub>12</sub>-Synthese

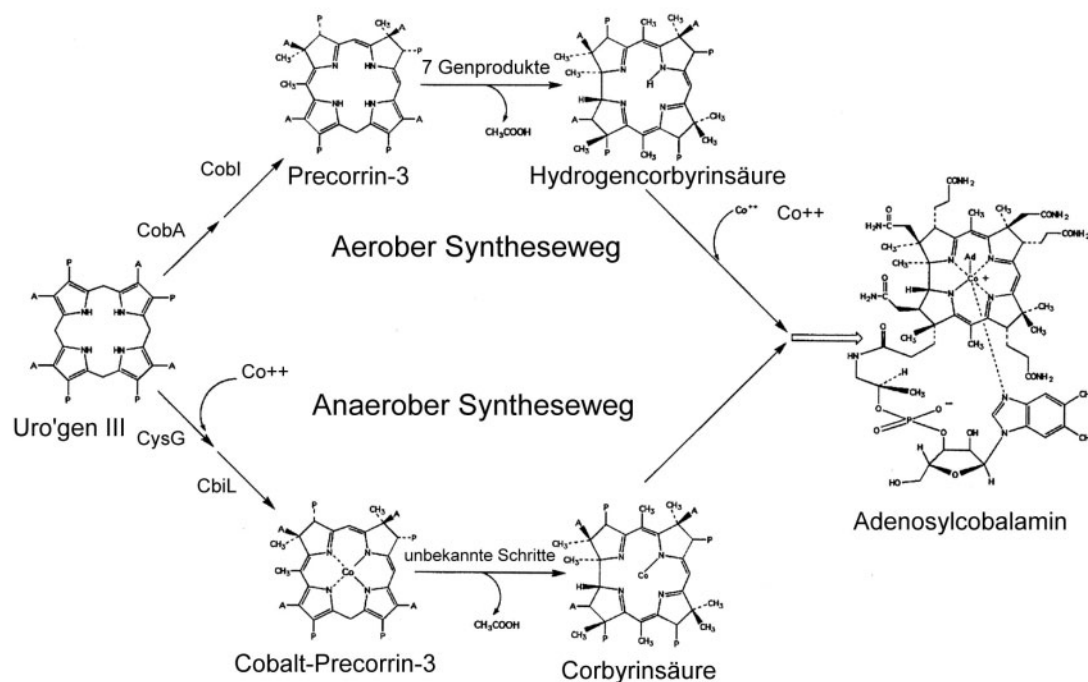
Die Cobalamin-Biosynthese stellt einen der komplexesten Synthesewege dar, die in der Natur vorkommen. Dabei sind etwa 30 enzymkatalysierte Reaktionen an der kompletten *de novo* Synthese beteiligt. Die Produktion von Coenzym B<sub>12</sub> ist auf einige Bakterien wie z. B. *Citrobacter freundii*, *Escherichia blattae* und Archaeen beschränkt. Die Cobalamin-Synthese besteht grob aus der Synthese der Corrinring-Komponenten, der Ausbildung des unteren axialen Liganden und dem Zusammensetzen aller Komponenten zum Coenzym B<sub>12</sub>. Im ersten Teil wird Uroporphyrinogen III zu Cobinamid umgewandelt, im zweiten Teil wird Dimethylbenzimidazol (DMB) gebildet und im letzten Abschnitt werden Cobinamid, DMB und die Phosphoribosylreste zusammengefügt.

Es existieren zwei verschiedene biosynthetische Wege: ein aerober, Sauerstoff-abhängiger Weg, bei dem Cobalt zu einem vergleichsweise späten Zeitpunkt in den Corrin-Ring inseriert wird und ein anaerober, Sauerstoff-unabhängiger Weg, bei dem das Cobalt sehr viel früher eingebaut wird (BLANCHE *et al.*, 1993). Der aerobe Syntheseweg ist bei *Pseudomonas denitrificans* und der anaerobe bei *Propionibacterium shermanii* und *Salmonella typhimurium* untersucht worden.

Die Coenzym Formen des B<sub>12</sub> gehören zu einer Familie von prosthetischen Gruppen, den Tetrapyrrol-Derivaten. Dazu zählen Moleküle wie Häm, Chlorophyll, Sirohäm und Coenzym F<sub>430</sub>. Sie alle weisen im Zentrum der prosthetischen Gruppe ein charakteristisches Metall-Ion auf (Magnesium, Eisen oder Cobalt) (WARREN *et al.*, 1990). Mit Ausnahme der  $\alpha$ -Gruppe der Proteobakterien beginnen alle Synthesewege mit dem C-5 Skelett des Glutamats. Im ersten Schritt wird tRNA-gebundenes Glutamat zu Glutamat-1-Semialdehyd reduziert. Das Aldehyd wird anschließend durch intramolekulare Umwandlung der Aminogruppe zu 5-Aminolävulinsäure umgesetzt. Zwei 5-Aminolävulinsäure-Moleküle werden zum ersten Pyrrol-Derivat, dem Porphobilinogen kondensiert. Vier dieser Pyrrol-Moleküle bilden im folgenden durch Polymerisation, Umlagerungsreaktionen und Ringschlüsse das Uroporphyrinogen III (JAHN *et al.*, 1996, MARTENS *et al.*, 2002). Während die Decarboxylierung des



Uroporphyrinogen III zur Biosynthese von Häm und Chlorophyll führt, wird durch die Methylierung dieses Moleküls Precorrin-2 synthetisiert. Die bei der letzten Reaktion benötigten zwei Methylgruppen stammen vom S-Adenosyl-L-Methionin, die von einer einzigen Methyltransferase eingebaut werden (WOODCOCK *et al.*, 1998). An der Stelle des Precorrin-2 teilen sich die beiden Biosynthesewege für Cobalamin. Während beim aeroben Zweig Precorrin-2 durch eine weitere Methyltransferase methyliert wird, woraus das Precorrin-3A resultiert, wird das Precorrin-2 im anaeroben Weg mit Cobalt chelatiert, wobei Cobalt-Precorrin-2 entsteht. Von diesem Punkt an unterscheiden sich also die beiden Wege grundlegend: der Sauerstoff-unabhängige Zweig beginnt an dieser Stelle mit dem Einbau des Cobalt, während im Sauerstoff-abhängigen Weg dieser Einbau erst neun Reaktionsschritte später erfolgt. Bemerkenswert ist auch, dass sich die Cobalt-Chelatasen der beiden Wege dadurch unterscheiden, dass nur die Chelatase des aeroben Zweiges ATP benötigt. Aufgrund der frühen Cobalt-Insertion innerhalb des einen Weges handelt es sich bei dem Großteil der Intermediate um Cobalt-Komplexe und die benötigten Enzyme weisen eine ganz unterschiedliche Substratspezifität auf als die Metall-freien Intermediate des Sauerstoff-abhängigen Weges. Durch eine Reihe von verschiedenen Reaktionen wie z. B. Methylierungs-, Amidierungs- und Adenolysierungsschritten entsteht Adenosyl-Cobyrinsäure. Nachdem die anaeroben und aeroben Biosynthesewege des Cobalamins sich ab dem Precorrin-2 geteilt haben, verlaufen sie ab der Adenosyl-Cobyrinsäure wieder analog. Durch Anlagerung eines Aminopropanols an die Propionsäure-Seitenkette entsteht aus Adenosyl-Cobyrinsäure Cobinamid. Der untere axiale Ligand, das DMB wird separat synthetisiert. Nach der Addition einer Phosphoribosyl-Gruppe aus einem Nikotinsäure-Mononukleotid an DMBI (Dimethylbenzimidazol) entsteht daraus  $\alpha$ -Ribazol. Im letzten Reaktionsabschnitt wird das  $\alpha$ -Ribazol mit Adenosylcobinamid-GDP zu Adenosylcobalamin verknüpft.



**Abbildung 46: Schematische Darstellung der beiden unterschiedlichen Cobalamin-Biosynthesewege aus RAUX *et al.* (1996)**

Uro'gen: Uroporphyrionogen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten  $\text{B}_{12}$ -Produzenten *C. freundii* und *E. blattae* synthetisieren das Coenzym *de novo* über den anaeroben Syntheseweg. Während KEUTH und BISPING (1994) in ihren Experimenten für *C. freundii* eine  $\text{B}_{12}$ -Produktionsrate von 114-152 ng  $\text{B}_{12}$  pro g Zellen beschrieben haben, liegen aus experimentellen Daten von BECHER aus unserer Arbeitsgruppe Werte im Bereich von 0,05-0,09 mg  $\text{B}_{12}$ / l Kultur vor. Für *E. blattae* waren noch keine Daten bezüglich der Syntheserate bekannt.

In den Experimenten im Rahmen dieser Arbeit wurde getestet, ob die Produktion der  $\text{B}_{12}$ -Bindeproteine Intrinsic Faktor und MutB eine erhöhte Syntheserate von  $\text{B}_{12}$  in den Organismen hervorruft. Die Expressionsstudien fanden anaerob mit Glycerin als einziger C-Quelle ( $\text{B}_{12}$ -produzierende Bedingungen) statt. *Citrobacter freundii* und *E. blattae* gehören zu den Organismen, die anaerob ohne externe Elektronenakzeptoren mit Glycerin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen können. Glycerin unterliegt dabei einer Disproportionierung. Die Enzyme des oxidativen Zweigs setzen Glycerin zu Dihydroxyacetonphosphat um. Die dabei anfallenden Reduktionsäquivalente werden im reduktiven Zweig verbraucht. Die Coenzym- $\text{B}_{12}$ -abhängige Glycerin-Dehydratase bildet dabei aus Glycerin 3-Hydroxypropionaldehyd, der anschließend weiter zu 1,3-Propandiol reduziert wird (DANIEL *et al.*, 1995 a und b,

ABELES *et al.*, 1961). Durch die B<sub>12</sub>-Abhängigkeit der Glycerin-Dehydratase ist nur dann ein anaerobes Wachstum von *C. freundii* und *E. blattae* in B<sub>12</sub>-freiem Mineralmedium mit Glycerin als einziger Kohlenstoff-Quelle möglich, wenn der Organismus das benötigte B<sub>12</sub> *de novo* synthetisiert.

Dabei konnte trotz der schwachen Produktion des Intrinsic Faktors in *C. freundii* eine maximale Steigerung der B<sub>12</sub>-Produktion um 17 % nachgewiesen werden (siehe 3.6). Die ermittelten B<sub>12</sub>-Konzentrationen lagen dabei in den Kulturen ohne das Bindeprotein bei 0,09 und mit IF-Bindeprotein bei 0,15 mg B<sub>12</sub>/ l Kultur. Die heterologe Produktion von MutB in *C. freundii* oder *E. blattae* gelang in großen Mengen und führte zu einer gesteigerten Coenzym-Syntheserate zwischen 28 und 57 % (siehe 3.6.1). Für die *E. blattae* Stämme wurde dabei eine B<sub>12</sub>-Konzentration in den Anzuchten ohne MutB von 0,2 mg/ l Kultur und mit MutB von 0,3 mg/ l Kultur erreicht, die *C. freundii* Stämme enthielten ohne MutB-Bindeprotein 0,09 und mit MutB 0,11 mg B<sub>12</sub>/ l Kultur. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Synthese der Fusionsproteine (sigTorA-IF und sigTorA-MutB) eine stärkere B<sub>12</sub>-Produktion in *C. freundii* und *E. blattae* hervorruft. Diese kommt vermutlich durch die Bindung des Coenzym B<sub>12</sub> an das Bindeprotein zustande, wodurch der Zelle weniger freies B<sub>12</sub> für die benötigten B<sub>12</sub>-abhängigen Reaktionen zur Verfügung steht.

Außerdem gelang es in Experimenten nachzuweisen, dass im Cytoplasma von *C. freundii* und *E. blattae* synthetisiertes Coenzym B<sub>12</sub> gebunden and das B<sub>12</sub>-Bindeprotein MutB ins Periplasma transportiert werden konnte (siehe Abbildung 37). Dabei wurden für *E. blattae* Werte von 8,3 bis 31,0 nM B<sub>12</sub> im Periplasma ermittelt und für *C. freundii* ein Wert von 8,6 nM B<sub>12</sub>.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen festhalten, dass generell ein Transport von Coenzym B<sub>12</sub> gebunden an ein Protein über die Cytoplasmamembran möglich ist. Zum anderen belegt die Cotranslokation von B<sub>12</sub> mit der B<sub>12</sub>-bindenden Untereinheit aus *P. shermanii* (MutB) die Funktionalität des in dieser Arbeit entwickelten B<sub>12</sub>-Exporters.

#### 4.5 Ausblick:

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte B<sub>12</sub>-Exporter eröffnet die Möglichkeit für weitere Experimente im Hinblick auf einen effizienteren und vollständigen Export von B<sub>12</sub> ins Kulturmedium. Zunächst ist es notwendig, ein System zum Transport des Coenzym über die äußere Membran zu entwickeln. Das wiederum könnte mit Hilfe des *kil*-Gen-Systems von MIKSCH *et al.* (1997b) erfolgen, welches eine kontrollierte Freisetzung von periplasmatischen Enzymen ins Medium ermöglicht. Das Sekretionssystem basiert auf dem permeabilisierenden Effekt des *kil*-Genproduktes aus

dem Plasmid ColE1 von *E. coli* und wird unter einem Stationärphasen-Promotor exprimiert. Dadurch kommt es zu keiner Beeinflussung der Lebensfähigkeit der Zelle, ebenso wenig tritt eine Zellyse auf. Der Einsatz der *kil*-Gene hatte z. B. in dem B<sub>12</sub>-produzierenden *Klebsiella planticola* oder in *Acetobacter methanolicus* und *E. coli* zur Sekretion periplasmatischer Proteine ins Medium geführt (MIKSCH *et al.*, 1997c, 1997a und 1999).

Ein anderer Ansatzpunkt wäre es, den konstruierten B<sub>12</sub>-Exporter in einem Cobalamin-synthetisierenden Gram-positiven Organismus einzusetzen. Das hätte den Vorteil, dass kein extra Proteinexport mehr wie bei Gram-negativen Bakterien über die äußere Membran notwendig wäre. *Bacillus megaterium* ist zum einen in der Lage B<sub>12</sub> zu synthetisieren (RAUX *et al.*, 1998) und zum anderen ist in einem anderen *Bacillus*-Stamm bereits der Hinweis für das Vorkommen des Tat-Transportweg beschrieben worden (TJALSMA *et al.*, 2000). Dabei könnte zuerst untersucht werden, ob das in dieser Arbeit konstruierte B<sub>12</sub>-Exportsystem, bestehend aus der TorA-Signalsequenz und dem B<sub>12</sub>-Bindeprotein MutB, auch in *Bacillus megaterium* produziert wird. Im Falle einer Produktion des Fusionsproteins müsste ein Transport ins Medium und anschließend der Cotransport mit Coenzym B<sub>12</sub> nachgewiesen werden. Falls es zu keinem Transport des Fusionsproteins kommt, könnte versucht werden die Translokation durch Fusion des B<sub>12</sub>-Bindeproteins MutB an eine andere Tat-Signalsequenz, wenn möglich aus einem *Bacillus*-Stamm, zu erzielen.

Weiterhin wäre es denkbar durch den Einsatz eines Organismus mit höherer B<sub>12</sub>-Syntheserate, die Effizienz des B<sub>12</sub>-Exports zu verbessern. So sind in der Literatur Produktionsraten von 1,1 bis zu 206 mg B<sub>12</sub>/ l Medium beschrieben worden (BYKHOVSKY *et al.*, 1998). Der Einsatz des B<sub>12</sub>-Exporters in einem Organismus, der weit mehr B<sub>12</sub> produziert, als die beiden in dieser Arbeit eingesetzten B<sub>12</sub>-Produzenten *C. freundii* und *E. blattae*, könnte zu einer größeren Menge an B<sub>12</sub> im Periplasma führen. Außerdem ließe sich die Produktionsrate von B<sub>12</sub> in den Organismen dieser Arbeit eventuell durch die oft beschriebene Zugabe von Komponenten wie Dimethylbenzimidazol, Aminolävulinsäure oder anderer Vorläufer des Cobalamins erhöhen (MARTENS *et al.*, 2002).

Eine andere Möglichkeit um die Cotranslokation von B<sub>12</sub> mit seinem Bindeprotein ins Periplasma oder umgebende Medium zu verbessern, ließe sich eventuell durch den Austausch des B<sub>12</sub>-Bindeproteins gegen ein Protein mit geringerer Molekularmasse erreichen. Denkbar wäre der Einsatz des nur 30 kDa großen BtuF Proteins. Dabei handelt es sich um das periplasmatisch lokalisierte B<sub>12</sub>-Bindeprotein, das an der Aufnahme von Cobalaminen in die Zelle beteiligt ist (siehe 4.1) und somit eine hohe Binderate zum B<sub>12</sub> aufweist (CARDIEUX *et al.*, 2002). Nach Fusion mit der TorA-Signalsequenz müsste eingangs die Produktion und im weiteren der Transport ins

Periplasma von *E. blattae* oder *C. freundii* untersucht werden. Anschließend ließe sich durch quantitative Bestimmungen überprüfen, ob eine Cotranslokation von B<sub>12</sub> mit BtuF stattgefunden hat.

Außerdem könnte man testen, ob mit Hilfe des Tat-Systems auch andere an Proteine gebundene Cofaktoren ins Periplasma transloziert werden können. Das wäre besonders im Hinblick auf die Produktion von toxischen Substanzen interessant. So könnten Cofaktor-abhängige für die Zelle sonst toxische Reaktionen im Periplasma ablaufen, wodurch sich unter Umständen ganz neue Möglichkeiten des Stoffumsatzes im Periplasma als Reaktionsraum eröffnen würden.

## 5 Zusammenfassung

- 1.) Zur Konstruktion eines bakteriellen B<sub>12</sub>-Exporters wurden die Gene für die Signalsequenz der periplasmatischen Trimethylamin-N-Oxid-Reduktase (*sigtorA*) aus *Escherichia coli* und für den B<sub>12</sub>-bindenden humanen Intrinsic Faktor (*if*) fusioniert. Die heterologe Expression des Fusionsgens erfolgte unter Kontrolle des durch Arabinose induzierbaren *paraBAD*-Promotors in verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Dabei konnte auch nach Variation verschiedenster Parameter nur eine minimale Produktion des sigTorA-IF-Fusionsproteins durch Western-Blot-Analyse detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei der heterologen Produktion des Fusionsproteins in dem B<sub>12</sub>-produzierenden Enterobakterium *C. freundii* erzielt.
- 2.) In Experimenten zum Nachweis der Translokation von sigTorA-IF ins Periplasma war, zur Erhöhung der Detektierbarkeit des nur schwach produzierten Proteins, eine Konzentrierung notwendig. Mit Hilfe des im Zuge der Klonierung angefügten His<sub>6</sub>-Tags konnte das Fusionsprotein durch eine Affinitätschromatographie an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen konzentriert werden. Hiernach ließ sich eine geringe Translokation des sigTorA-IF ins Periplasma nachweisen.
- 3.) Anschließend sollte durch quantitative Bestimmung der Corrino-Konzentration ein Cotransport von sigTorA-IF und B<sub>12</sub> ins Periplasma von *C. freundii* nachgewiesen werden. Dieser Nachweis gelang nicht, da aufgrund der geringen Produktion von sigTorA-IF die maximal zu erwartende B<sub>12</sub>-Menge unterhalb der Nachweisgrenze lag.  
Die schwache Produktion des Fusionsproteins führte jedoch zu einer Steigerung der B<sub>12</sub>-Syntheserate in dem Wirtsorganismus.
- 4.) Zur Konstruktion eines effizienten B<sub>12</sub>-Exportsystems erschien der Intrinsic Faktor, aufgrund der zu schwachen heterologen Produktion, als nicht geeignet. Daher sollte die Genfusion von *sigtorA* mit dem Gen eines anderen B<sub>12</sub>-bindenden Enzyms für die weiteren Experimente verwendet werden. Hierzu wurde die B<sub>12</sub>-bindende Untereinheit der Methylmalonyl-CoA-Mutase (*mutB*) aus *Propionibacterium shermanii* eingesetzt. Aus anderen Arbeiten aus unserer Gruppe (BOLM 2000) lag ein entsprechendes Konstrukt (pMB5) mit der *sigtorA-mutB*-Genfusion bereits vor. Es konnte in Expressionsversuchen gezeigt werden, dass das korrespondierende Genprodukt in verschiedenen Enterobakterien in großen Mengen heterolog produziert wird.

- 5.) In weiteren Experimenten wurde die *sigtor-mutB*-Fusion anaerob unter B<sub>12</sub>-produzierenden Bedingungen in *C. freundii* und *E. blattae* untersucht. Für letzteren erfolgte eine Umklonierung der Genfusion in ein für diesen Stamm geeignetes Vektorsystem. Die resultierenden Konstrukte wurden als pTM3 und pTM6 bezeichnet. Der Nachweis der Bildung des Fusionsproteins erfolgte über den angefügten His<sub>6</sub>- bzw. GFP-Tag durch Western-Blot-Analysen bzw. Fluoreszenzmikroskopie. Mit Hilfe dieser Detektionssysteme gelang es sowohl in *C. freundii* als auch in *E. blattae* eine starke Produktion des sigTorA-MutB-Proteins unter B<sub>12</sub>-produzierenden Bedingungen nachzuweisen. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls nach Einfügen eines Strep-TagsII durch Klonierung der Fusionsgene in den Vektor pASK-IBA3 mittels Western-Blot-Analysen in *E. blattae* erlangt werden.
- 6.) Experimente zur Translokation des sigTorA-MutB-Fusionsproteins ins Periplasma wurden zunächst in *E. coli* durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass das Fusionsprotein transloziert wurde, aber ein noch erheblicher Anteil im Cytoplasma und in den Membranen verblieben war. In anschließenden Untersuchungen unter B<sub>12</sub>-produzierenden Bedingungen, die mit *C. freundii* und *E. blattae* durchgeführt wurden, konnte eine Translokation des sigTorA-MutB-Proteins ins Periplasma der B<sub>12</sub>-Produzenten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Versuchen mit *E. coli* blieb dabei jedoch nur ein kleiner Teil des Fusionsproteins im Cytoplasma und in den Membranen zurück. Dies konnte durch Immunolokalisation mit goldmarkierten Antikörpern durch elektronenmikroskopische Analyse belegt werden.
- 7.) Die quantitative Bestimmung des Corrinoidegehaltes bei *C. freundii* und *E. blattae* zeigte, dass die heterologe Produktion von sigTorA-MutB je nach Bedingung zu einer um 28-57% gesteigerten B<sub>12</sub>-Synthese führte. Ferner konnte eine Cotranslokation von B<sub>12</sub> und MutB ins Periplasma von *C. freundii* und *E. blattae* in einem Verhältnis von 1,3 bis 5,1 zu 1 nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen bestätigen, dass die hergestellte Genfusion als B<sub>12</sub>-Exportsystem fungiert.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abeles R. H., Lee H. A. Jr., 1961**

An intramolecular oxidation-reduction requiring a vobamide coenzyme. *J. Biol. Chem.* 236: 2347-2350.

**Ansaldi M., Simon G., Lepelletier M., Mejean V. 1999**

TorC apocytochrome negatively autoregulates the trimethylamine N-oxide reductase operon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 182: 961-966.

**Averhoff, B. (1988)**

Optimierung der Succinat- und Trimethylenproduktion durch Variation von Wachstumsparametern und Zugabe externer H-Donatoren. Dissertation, Göttingen.

**Ballal R. S., Jacobsen D. W., Robinson K., 1997**

Homocysteine: update on a new risk factor. *Cleve. Clin. J. Med.* 64: 543-549.

**Banerjee R., 1998**

Spectroscopic and molecular genetic characterization of the two mammalian B<sub>12</sub>-dependent enzymes. In: Vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub> Proteins. Kräutler B., Duilio A. D., Golding B. T. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

**Benoit S., Abaibou H., Mandrand-Berthelot M.-A., 1998**

Topological analysis of the aerobic membrane bound formate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180: 6625-6634.

**Berg B. L., Li J. and Stewart V., 1991**

Nitrate-inducible formate dehydrogenase in *Escherichia coli* K-12. Nucleotide sequence of the *fdnGHI* operon and evidence that opal (UGA) encodes selenocystein. *J. Biol. Chem.* 266: 22380-22385.

**Berks B. C., 1996**

A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors? *Mol. Microbiol.* 22, No.3: 393-404 Microreview.

**Berks B. C., Sargent F. and Palmer T. 2000**

The Tat protein export pathway. Microreview, *Mol. Microbiol.* 35, No. 2: 260-274.

**Blakley R., 1965**

Cobamides and ribonucleotide reduction. I. Cobamide stimulation of ribonucleotidreduction in extracts of *Lactobacillus leichmanii*. *J. Biol. Chem.* Vol. 240: 2173-2180.



**Blanche F., Thibaut D., Debussche L., Hertle R., Zipfel F. and Müller G., 1993**

Parallels and decisive differences in vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32: 1651-1653.

**Blaylock B. A., Stadtman T. C., 1967**

Role of B<sub>12</sub> compounds in methane formation. *Arch. Dermatol.* 80 (4): 719-724.

**Blum H., Beier H. and Gross H. J., 1987**

Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.

**Bogsch E. G., Sargent F., Stanley N. R., Berks B. C., Robinson C. and Palmer T. 1998**

An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem.* Vol 273, No. 29: 18003-18006.

**Bogsch E., Brink S. and Robinson C., 1997**

Pathway specificity for a  $\Delta$ pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'sec-incompatible' mature protein. *EMBO J.* Vol. 6, No. 13: 3851-3859.

**Bolhuis A., Mathers J. E., Thomas J. D., Barrett C. M. L. and Robinson C., 2001**

TatB and TatC form a functional and structural unit of the twin-arginine translocase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, No. 23: 20213-20219.

**Bolm M., 2000**

Entwicklung eines B<sub>12</sub>-Exportersystems für Enterobakterien. Diplomarbeit, Göttingen.

**Brada N., Gordon M. M., Shao J.-S., Wen J. and Alpers D. H., 2000**

Production of gastric intrinsic factor, transcobalamin, and haptocorrin in opossum kidney cells. *AJP Renal Physiol.* Vol. 279, No. 6: 1-8.

**Bradbeer C., 1991**

Cobalamin transport in *Escherichia coli*. *Biofactors.* 3: 11-19.

**Bradbeer C., Gudmundsdottir A., 1990**

Interdependence of calcium and cobalamin binding by wild-type and mutant BtuB protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* Vol. 172: 4919-4926.

**Braun V., 1995**

Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via TonB-ExB-ExD-dependent receptor proteins. FEMS Microbiol. 16: 295-307 Reviews.

**Brinks S., Bogsch E. G., Edwards W. R., Hynds P. J., Robinson C., 1998**

Targeting of thylakoid proteins by the  $\Delta$ pH-driven twin-arginine translocation pathway requires a specific signal in the hydrophobic domain in conjunction with the twin-arginine motif., FEBS Lett. 434: 425-430.

**Brüser, T., Deutsmann, R., Dahl, C. (1998)**

Evidence against the double-arginine motif as the only determinant for protein translocation by a novel Sec-independent pathway in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 164: 329-336.

**Bulewela L., Forster A., Boehm T., Rabbitts T. H., 1989**

A rapid procedure for colony screening using nylon filters. Nucl. Acids. Res. 17: 23-24.

**Bykhovsky V. Y., Zaitseva N. I., Eliseev A. A. (1998)**

Tetrapyrroles: diversity, biosynthesis, and biotechnology. Appl. Biochem. Microbiol. 34: 1-18.

**Cardieux N., Kadner R. J., 1999**

Site-directed disulfide bonding reveals an interaction site between energy-coupling protein TonB and BtuB, the outer membrane cobalamin transporter. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 96: 10673-10678.

**Chaddock A M., Mant A., Karnauchov I., Brink S., Herrmann R. G., Klösgen R. B. and Robinson C., 1995**

A new type of signal peptide: central role of a twin-arginine motif in transfer signals for the  $\Delta$ pH-dependent thylakoidal protein translocase. EMBO J., Vol. 14, No. 12: 2715-2722.

**Charter Jr. C. W., Kraut J., Freer S. T., Xuong N.-H., Alden R. A. and Bartsch R. G., 1974**

Two-angstrom crystal structure of oxidized *Chromatium* high potential iron protein. J. Biol. Chem. 249: 4214.

**Cheah K. C., Harrison S., King R., Crocker L., Wells J. R. E. and Robins A., 1994**

Secretion of eucaryotic growth hormones in *Escherichia coli* is influenced by the sequence of the mature protein. Gene 138: 9-15.

**Christóbal S., de Gier J.-W., Nielsen H. and von Heijne G., 1999**

Competition between Sec- and Tat- dependent protein translocation in *Escherichia coli*. EMBO J. Vol. 18, No. 11: 2982-2990.

**Collier D. N., Bankaitis V. A., Weiss J. B., Bassford Jr. P. J., 1988**

The antifolding activity of SecB promotes the export of the *E. coli* maltose-binding protein. *Cell* 53: 273-283.

**Cramer A., Whiehorn E. A., Tate E., Stemmer W. P. C., 1996**

Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nature Biotechnology* Vol. 14: 315-319.

**Dalbey R. E. and Robinson C., 1999**

Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane. *TIBS* 24: 17-22 reviews.

**Daniel R., Bobil T. A., Gottschalk G., 1999**

Biochemistry of coenzyme-B<sub>12</sub>-dependent glycerol and diol dehydratase and organization of the encoding genes. *FEMS Microbiol. Reviews* 22: 553-566.

**Daniel R., Boenigk R., Gottschalk G., 1995a**

Purification of 1,3-Propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii* and cloning, sequencing and overexpression of the corresponding gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177: 2151-2156.

**Daniel R., Stuerz K., Gottschalk G., 1995b**

Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*. *J. Bacteriol.* 177: 4392-4401.

**Denèfle P., Kovarik S., Ciora T., Gosselet N., Bénichou J.-C., Latta M., Guinet F., Ryter A. and Mayaux J.-F., 1989**

Heterologous protein export in *Escherichia coli*: influence of bacterial signal peptides on the export of human interleukin 1  $\beta$ . *Gene* 85: 499-510.

**Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. (1988)**

High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl Acids Res* 16: 6127-6145.

**Dreusch A., Bürgisser D. M., Heitmann C. W. and Zumft W. G., 1997**

Lack of copper insertion into unprocessed cytoplasmic nitrous oxide reductase generated by an R20D substitution in the arginine consensus motif of the signal peptide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1319: 311-318.

**Duda J., Pedziwilk Z., Zodrow K., 1967**

Studies on the vitamin B<sub>12</sub> content on the leguminous plants. *Acta Microbiol. Pol.* 6: 233-238.

**Eklund C., Lankford C. E., 1967**

Laboratory manual for general microbiology. S. 277. Pentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA.

**Evans P. R. and Mancía F., 1998**

Insights on the reaction mechanism of methylmalonyl-CoA-mutase from crystal structure. Kapitel 13: 317-226. In: Vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub> Proteins. Kräutler B., Duilio A. D., Golding B. T. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

**Fekkes P. and Driessen A. J. M., 1999**

Protein targeting in the bacterial cytoplasmic membrane. Microbiol. and Mol. Biol. Vol. 63, No. 1: 161-173.

**Golding B. T., Anderson R. J., Ashwell S., Edwards C. H., Garnet I., Kroll F. and Buckel W., 1998**

A mechanistic overview of B<sub>12</sub>-dependent processes. In: Vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub> Proteins. Kräutler B., Duilio A. D., Golding B. T. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

**Gordon M. M., Russel-Jones G. and Alpers D. H., 1997**

Expression of functional intrinsic factor using recombinant baculovirus. Methods in enzymology Vol. 281, [29]: 255-261.

**Gordon M. M., Russel-Jones G., Alpers D. H., 1997**

Expression of functional Intrinsic Factor using recombinant baculovirus. Methods in Enzymology 281: 255-261.

**Green A. A., Hughes W. L., 1955**

Protein fraction on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: Colowick S. P., Kaplan N. O. (Ed.): Methods in enzymology. Vol I: 67-90.

**Greene R. J. & Guarente L., 1987**

Subcloning. Methods Enzymol. 152: 512-521.

**Halbig D., Wiegert T., Blaudeck N., Freudl R., Sprenger G. A., 1999**

The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding. Eur. J. Biochem. 263: 543-551.

**Hanahan, D. (1983)**

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166: 557-580.

**Hawkes R.**, 1986

The dot immunobinding assay. *Methods Enzymol.* 135: 102-117.

**Hinsley A. P., Stanley N. R., Palmer T., Berks B. C.**, 2001

A naturally occurring bacterial Tat signal peptide lacking one of the "invariant" arginine residues of the consensus targeting motif. *FEBS Lett.* 497: 45-49.

**Hochschuli E.**, 1988

Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J. Chromatogr.* 444: 293-302.

**Holdeman L. V., Cato E. P., Moore W. E. C.**, 1977

Anaerobe laboratory manual. 4<sup>th</sup> ed. Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.

**Holmes, D. S., Quickley, M.** (1981)

A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197.

**Hörig J. A., Renz P.**, 1980

Biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub>. *Eur. J. Biochem.* 105: 587-592.

**Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.** (1990)

High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.

**Ishida A., Kanefusa H., Fujita H., Toraya T.**, 1994

Microbiological activities of nucleotide loop-modified analogues of vitamin B<sub>12</sub>. *Arch. Microbiol.* Vol. 161: 293-299.

**Jahn D., Hungerer C., Troup B.**, 1996

Ungewöhnliche Wege und umweltregulierte Gene der bakteriellen Hämbiosynthese. *Naturwissenschaften* 83: 389-400.

**Kadner R. J.**, 1990

Vitamin B<sub>12</sub> transport in *Escherichia coli*: energy coupling between membranes. *Mol. Microbiol.* Vol 4, No. 12: 2027-2033 microreview.

**Kadonaga J. T., Gautier A. E., Straus D. R., Charles A. D., Edge M. D. and Knowles J. R.**, 1984

The role of the  $\beta$ -lactamase signal sequence in the secretion of proteins by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 259: 2149-2154.

**Keuth S. und Bisping B., 1994**

Vitamin B<sub>12</sub> production by *Citrobacter freundii* or *Klebsiella pneumoniae* during tempeh fermentation and proof of enterotoxin absence by PCR. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 60, No. 5: 1495-1499.

**Kräutler, 1998**

B<sub>12</sub>-Coenzymes, the Central Theme. Kapitel 1: 1-43. In: Vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub> Proteins. Kräutler B., Duilio A. D., Golding B. T. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

**Krzycki J. and Zeikus J. G., 1980**

Quantification of corrinoids in methanogenic bacteria. Curr. Microbiol. Vol. 3: 243-245.

**Kumamoto C. A. and Beckwith J., 1985**

Evidence for specificity at an early step in protein export in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 163: 267-274.

**Kumamoto C. A., 1991**

Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. Mol. Microbiol. 5: 19-22.

**Lawrence J. G. and Roth J. R., 1996**

Evolution of coenzyme B<sub>12</sub> synthesis among enteric bacteria: evidence for loss and reacquisition of a multigene complex. Genetics. 142: 11-24.

**Lawrence J. G., Ochman H. and Hartl D. L., 1991**

Molecular and evolutionary relationships among enteric bacteria. J. Gen. Microbiol. 137: 1911-1921.

**Lei S. P., Lin H. C., Wang S. S., Callaway J., Wilcox G. 1987**

Characterization of the *Erwinia carotovora* pelB gene and its product pectate lyase. J Bacteriol 1987 Vol. 169(9):4379-83.

**Ludwig M. L. and Matthews R. G., 1997**

Structure-based perspectives on B<sub>12</sub>-dependent enzymes. Annu. Rev. Biochem. 66: 269-313.

**Makrides S. C., 1996**

Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. Vol. 60, No. 3: 512-538.

**Mancia F., Evans P. R., 1998**

Conformational changes on the substrate binding to methylmalonyl-coenzyme A mutase and new insights into free radical mechanism. Structure 6: 711-720.

**Mancia F., Keep N. H., Nakagawa A., Leadlay P. F., McSweeney S., Rasmussen B., Bösecke P., Diat O., Evans P. R., 1996**

How coenzyme B<sub>12</sub> radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution. *Structure* 4: 339-350.

**Margolin W., 2000**

Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localisation in bacterial cells. *Methods* 20: 62-72.

**Marsh E. N. G., 1999**

Coenzyme B<sub>12</sub> (cobalamin)-dependent enzymes. *Ess. Biochem.* 34: 139-154.

**Martens J.-H., Barg H., Warren M. J., Jahn D., 2002**

Microbial production of vitamin B<sub>12</sub>. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 275-285.

**Mayer M. P., 1995**

A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163: 41-46.

**Méjan V., Iobbi-Nivol C., Lepelletier M., Giordano G., Chippaux M. and Pascal M. C., 1994**

TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the *tor* operon. *Mol. Microbiol* 11: 1169-1179.

**Méjean V., Iobbi-Nivol C., Lepelletier M., Giordano G., Chippaux M. and Pascal M.-C., 1994**

TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the *tor* operon. *Mol. Microbiol.* Vol 11, No. 6: 1169-1179.

**Miksch G., Friedler E., Dobrowolski P., Friehs K., 1997b**

The *kil*-gene of the ColE1 plasmid of *Escherichia coli* controlled by a growths-phase-dependent promoter mediates the secretion of a heterologous protein during the stationary phase. *Arch. Microbiol.* 167: 143-150.

**Miksch G., Friedler E., Dobrowolski P., Friehs K., 1997c**

Controlled secretion into the culture medium of a hybrid  $\beta$ -glucanase by *Acetobacter methanolicus* mediated by the *kil* gene of *Escherichia coli* located on a Tn5-derived transposon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 530-536.

**Miksch G., Neitzel R., Friedler E., Friehs K., Flaschel E., 1997a**

Extracellular production of a hybrid  $\beta$ -glucanase from *Bacillus* by *Escherichia coli* under different cultivation conditions in shaking cultures and bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 120-126.

**Miksch G., Neitzel R., Friehs K., Flaschel E., 1999**

High-level expression of a recombinant protein in *Klebsiella planticola* owing to induced secretion into the culture medium. Appl. Microbiol. 167: 143-150.

**Minot G. R., Murphy W. P., 1926**

Treatment of pernicious anaemia by a special diet. J. Am. Med. Assoc. 87: 470-476.

**Mori H. and Cline K., 1998**

A signal peptide that directs non-sec transport in bacteria also directs efficient and exclusive transport on the thylakoid delta pH pathway. J. Biol. Chem. Vol. 273. No. 19: 11405-11408.

**Müller M., Koch H. G., Beck K., Schafer U., 2001**

Protein traffic in bacteria: multiple routes from the ribosome to and across the membrane. Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. 6: 107-157.

**Nexo E., 1998**

Cobalamin binding proteins. Kapitel 30: 461-475.

In: Vitamin B<sub>12</sub> and B<sub>12</sub> Proteins. Kräutler B., Duilio A. D., Golding B. T. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

**Nivière V., Song A.-L., Voordouw G., 1992**

Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box presents export of  $\beta$ -Lactamase fusion protein. J. Gen. Microbiol. 138: 2173-2183.

**Pfennig , Lippert, K. D. (1966)**

Über das Vitamin B<sub>12</sub>-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. Arch Microbiol 55: 245-256.

**Raux E., Lanois A., Levillayer F., Warren M. J., Brody E., Rambach A. and Thermes C., 1996**

*Salmonella typhimurium* cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) biosynthetic genes: functional studies in *S. typhimurium* and *Escherichia coli*. J. Bacteriol. Vol. 178, No. 3: 753-767.

**Raux E., Lanois A., Warren M. J., Rambach A. and Thermes C. 1998.**

Cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) biosynthesis: identification and Characterization of characterization of a *Bacillus megaterium cob* operon. Biochem. J. 335: 159-166.

**Raux E., Schubert H. L. and Warren M. J., 2000**

Biosynthesis of cobalamin (vitamin B<sub>12</sub>): a bacterial conundrum. CMLS Cell. Mol. Life Sci. 57: 1880-1893.



**Rickes E. L., Brink N. G., Koniuszy F. R., Wood T. R., Folkers K., 1948**

Crystalline vitamin B<sub>12</sub>. Science 107: 396.

**Robinson C., 2000**

The twin-arginine translocation system: A novel means of transporting folded proteins in chloroplasts and bacteria. Minireview, Biol. Chem. Vol. 381: 89-93.

**Rodrigue A., Chanal A., Beck K., Müller M. and Wu L.-F., 1999**

Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial Tat pathway. J. Biol. Chem. Vol. 274, No. 19: 13223-13228.

**Roth J. R., Lawrence J. G. and Bobik T. A., 1996**

Cobalamin (coenzyme B<sub>12</sub>): synthesis and biological significance. Annu. Rev. Microbiol. 50: 137-181.

**Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989)**

Molecular cloning: a laboratory manual (2. Aufl.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York, USA.

**Santini C. L., Bernadec A., Zhang M., Chanal A., Ize B., Blanco C., Wu L. F., 2001**

Translocation of jellyfish green fluorescent protein via the Tat system of *Escherichia coli* and change of its periplasmic location in response to osmotic up-shock. J. Biol. Chem. 276 (11): 8159-8164.

**Santini C.-L., Bérengère I., Chanal A., Müller M., Giordano G. and Wu L.-F., 1998**

A novel sec-independent periplasmic protein in *Escherichia coli*. EMBO J. Vol. 17, No. 1: 101-112

**Sargent F., Bogsch E. G., Stanley N. R., Wexler M., Robinson C., Berks B. C. and Palmer T. 1998**

Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. EMBO J. Vol 17, No.13: 3640-3650.

**Sargent F., Gohlke U., de Leeuw E., Stanley N. R., Palmer T., Saibil H. R. and Berks B. C., 2001**

Purified components of the *Escherichia coli* Tat protein transport system form a double-layer ring structure. Eur. J. Bioche. 268: 3361-3367.

**Sargent F., Stanley N. R., Berks B. C. and Palmer T., 1999**

Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. Vol. 274, No. 51: 36073-36082.

**Schägger, H., von Jagow, G. (1987)**

Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range of 1 to 100 kDa. Anal Biochem 166: 368-379.

**Schatz G., Dobberstein B., 1996**

Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271: 1519-1526.

**Schneider Z. E. G., Larsen G., Jacobson G., Johnson B. C. and Pawelkiewicz J., 1970**

Purification and properties of glycerol dehydratase. *J. Biol. Chem.* 245: 3388-3396.

**Settles A. M. and Martienssen R., 1998**

Old and new pathways of protein export in chloroplasts and bacteria. *Cell Biol. reviews* 8: 494-501.

**Silvestro A., Pommier J., Pascal M. C. and Giordano G., 1989**

The inducible trimethylamine N-oxide reductase of *Escherichia coli* K-12: its localization and inducers. *Biochim. Biophys. Acta.* 994: 208-216.

**Stanley R. N., Palmer T. and Berks B. C., 2000**

The twin arginine consensus motif of tat signal peptides is involved in sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* Vol. 275, No. 16: 11591-11596.

**Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J. & Dubendorff J. W. 1990**

Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185: 60-89.

**Tamaki T., Horinouchi S., Fukaya S., Okumura M., Kawamura Y. and Beppu T., 1989**

Nucleotide sequence of the membrane bound aldehyde dehydrogenase gene von *Acetobacter polyoxogenes*. *J. Biochem.* 106: 541-544.

**Tang L-H., Chokshi H., Hu C.-B., Gordon M. M. and Alpers, D. H., 1992**

The intrinsic factor (IF)-Cobalamin receptor binding site is located in the amino-terminal portion of IF. *J. Biol. Chem.* Vol. 267, No.32: 22982-22986.

**Tjalsma H., Bolhuis A., Jongbloed J. D. H., Bron S. and Maarten van Dijk J., 2000**

Signal-peptide dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol.* Vol 64, No.3: 515-547.

**Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979)**

Elektrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci. USA.* 76: 4350-4354.

**Van Bibber M., Bradbeer C., Clark N. and Roth J. R., 1999**

A new class of cobalamin transport mutants (*btuF*) provides genetic evidence for a periplasmic binding protein in *Salmonella thyphimurium*. *J. Bacteriol.* Vol. 181, No. 17: 5539-5541.

**Wall J. G. and Plückthun A., 1995**

Effects of overexpressing folding modulators on the *in vivo* folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 507-516.

**Warren M. J. and Scott A. I., 1990**

Tetrapyrrole assembly and modification into the ligands of biologically functional cofactors. *Trend Biochem. Sci.* 180: 486-491.

**Weiner J. H., Bilous P. T., Shaw, M. G., Lubitz S. P., Frost L., Thomas G. H., Cole J. A. and Turner R. J., 1998**

A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell* 93: 93-101.

**Wen J., Kinnear M. B., Richardson M. A., Willets N. S., Russel-Jones G. J., Gordon M. M., Alpers D. H., 1999**

Functional expression in *Pichia pastoris* of human and rat intrinsic factor. *Biochim. Biophys. Acta* 1490: 43-53.

**Wickner W., Driessen A. J. M., Hartl F. U., 1991**

The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 101-124.

**Wiegert T., Sahm H. and Sprenger G. A., 1996**

Export of the periplasmic NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Arch. Microbiol.* 166: 32-41:

**Wingfield P. T., 1995**

Overview of the purification of recombinant proteins produced in *E. coli*. In: *Current protocols in protein science* Vol. 1, Coligan J. E., Dunn B. M., Ploegh H. L., Speicher D. W., Wingfield P. T. John Wiley and Sons, New York Vol. 1: 6.11.-6.1.22.

**Wood H. G., 1991**

Life with Co or CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> as a source of carbon and energy. *FASEB J.* 5 (2): 156-163 Review.

**Woodcock S. C., Raux E., Levillayer F., Thermes C., Rambach A., Warren M. J., 1998**

Effect of mutations in the transmethylase and dehydrogenase/ chelatase domains of sirohaem synthase (CysG) on sirohaem and cobalamin biosynthesis. *Biochem. J.* 330: 121-129.

**Wu W.-F., Urbanowski M. L. and Stauffer G. V., 1992**

Role of the MetR regulatory system in vitamin B<sub>12</sub>-mediated repression of the *Salmonella typhimurium metE* gene. J. Bacteriol. Vol. 174, No. 14: 4833-4837.

**Wülfing C. and Plückthun A., 1994**

Correctly folded T-cell receptor fragments in the periplasm of *Escherichia coli* – influence of folding catalysts. J. Mol. Biol. 242: 655-669.

**Yip T. T., Nakagawa Y., Porath J., 1989**

Evaluation of the interaction of peptides with Cu (II), Ni (II), and Zn (II) by high-performance immobilized-metal ion affinity chromatography. Anal. Biochem. 183: 159-171.

**Zagalak B., 1982**

Vitamin B<sub>12</sub> als biologisch aktive Modellsubstanz, Naturwissenschaften 69: 63-74  
Springer Verlag

## 7 Anhang

### Nukleotidsequenz des Inserts von pTM1:

mit den Erkennungssequenzen: 5'-terminal für EcoRI und 3'-terminal für HindIII

GAATTCACCCATGAACAATAACGATCTCTTTTCAGGCATCACGTCGGCGTTTTCTGGCACAACCTCGGCGGCT  
TAACCGTCGCCGGGATGCTGGGGCCGTCATTGTAAACGCCGCGACGTGCGACTGCGGCGCAAGCGGCGAC  
TGACGTTGTCAGTACCCAGACCCAGAGTTCATGCTCCGTTCCCTCAGCACAGGAGCCCTTGGTCAATGGA  
ATACAAGTACTCATGGAGAACTCGGTGACTTCATCAGCCTACCCAAACCCAGCATCCTGATTGCCATGA  
ATCTGGCCGGAGCCTACAACCTTGAAGGCCAGAAGCTCCTGACTTACCAGCTCATGTCCAGCGACAACAA  
CGATCTAACCATTGGGCAGCTCGGCCTCACCATCATGGCCCTCACCTCCTCCTGCCGAGACCCTGGGGAT  
AAAGTATCCATTCTACAAAGACAAATGGAGAACTGGGCACCTTCCAGCCCCAACGCTGAAGCATCAGCCT  
TCTATGGGCCCAGTCTAGCGATCTTGGCACTGTGCCAGAAGAACTCTGAGGCGACCTTGCCGATAGCCGT  
CCGCTTTGCCAAGACCCTGCTGGCCAACCTCCTCCTCCTTCAATGTAGACACAGGAGCAATGGCAACCTTG  
GCTCTGACCTGTATGTACAACAAGATCCCTGTAGGTTTACAGAGGAAGTTACAGATCCCTGTTTGGTCAGG  
TACTAAAGGATATTGTGGAGAAAATCAGCATGAAGATCAAAGATAATGGCATCATTTGGAGACATCTACAG  
TACTGGCCTCGCCATGCAGGCTCTCTCTGTAAACACCTGAGCCATCTAAAAAGGAATGGAACCTGCAAGAAG  
ACTACGGATATGATACTCAATGAGATTAAGCAGGGGAAATTCACAACCCCATGTCCATTGCTCAAATCC  
TCCCTTCCCTGAAAGGCAAGACATACCTAGATGTGCCCCAGGTCACCTTGTAGTCTTGATCATGAGGTACA  
ACCAACTCTACCCAGCAACCCTGGCCCTGGCCCCACCTCTGCATCTAACATCACTGTCATATACACCATA  
AATAACCAGCTGAGGGGGTTGAGCTGCTCTTCAACGAGACCATCAATGTTAGTGTGAAAAGTGGGTCAG  
TGTTACTTGTGCTCCTAGAGGAAGCACAGCGCAAAAATCCTATGTTCAAATTTGAAACCACAATGACATC  
TTGGGGCCTTGTGCTCTCTTCTATCAACAATATCGCGGAAAATGTTAATCACAAGACATACTGGCAGTTT  
CTTAGTGGTGTAAACACCTTTGAATGAAGGGGTTGCTGACTACATACCCTTCAACCACGAGCACATCACAG  
CCAATTTACACAGTACCACCATCACCATCACCATTAATAAAGCTT

**Nukleotidsequenz des Inserts von pTM3:**mit der Erkennungssequenz: 5'- und 3'- terminal für XbaI

TCTAGAGAACAATAACGATCTCTTTTCAGGCATCACGTCGGCGTTTTCTGGCACAACTCGGCGGCTTAACC  
GTCGCCGGGATGCTGGGGCCGTCATTGTAAACGCCGCGACGTGCGACTGCGGCGCAAGCGGCGACTAGCA  
CTCTGCCCCGTTTTGATTTCAGTTGACCTCGGCAATGCCCCGGTTCTGCTGATGCCGCACGACGCTTCGA  
GGAAGTGGCCGCCAAGGCCGGCACCCGAGAGGCGTGGGAGACGGCCGAGCAGATTCCGGTTGGCACCCCTG  
TTCAACGAAGACGTCTACAAGGACATGGACTGGCTGGACACCTACGCAGGTATCCCGCCGTTTCGTCCACG  
GCCCCGTATGCAACCATGTACGCGTTCCGTCCCTGGACGATTCGCCAGTACGCCGGTTTTCTCCACGGCCAA  
GGAGTCGAACGCCTTCTACCGCCGCAACCTTGGCGCCGGCCAGAAGGGCCTGTCGGTTGCCCTTCGACCTG  
CCCACCCACCGTGGCTACGACTCGGACAATCCCCGCGTCGCCGGTGACGTCGGCATGGCCGGTGTGGCCA  
TCGACTCCATCTATGACATGCGCGAGCTGTTCCGCCGATTCGCTGGACCAGATGAGCGTGTCCATGAC  
CATGAACGGCGCCGCTGCTGCCGATCCTGGCCCTCTATGTGGTGACCGCCGAGGAGCAGGGCGTCAAGCCC  
GAGCAGCTCGCCGGGACGATCCAGAACGACATCCTCAAGGAGTTCATGGTTCGTAACACCTACATCTACC  
CGCCGCAGCCGAGTATGCGAATCATCTCTGAGATCTTCGCCTACACGAGTGCCAATATGCCGAAGTGGAA  
TTGATTTCCATTTCCGGCTACCACATGCAGGAAGCCGGCGCCACGGCCGACATCGAGATGGCCTATACC  
CTGGCCGACGGTGTGACTACATCCCGCGCCGGCGAGTCGGTGGGCCTCAATGTCGACCAGTTCGCGCCGC  
GTCTGTCTTTCTTCTGGGGCATCGGCATGAACTTCTTCATGGAGGTGCGCAAGCTGCGTGC CGCGCGCAT  
GTTGTGGGCCAAGCTGGTGCATCAGTTCGGGCCGAAGAACC CGAAGTCGATGAGCCTGCGCACCCACTCG  
CAGACCTCCGGTTGGTGCCTGACCGCCAGGACGTCTACAACAACGTCGTGCGTACCTGCATCGAGGCCA  
TGGCCGCCACCCAGGGCCATAACCAGTCGCTGCACACGAACTCGCTCGACGAGGCCATCGCCCTGCCGAC  
CGATTTTCAGCGCCCGCATCGCCCGTAACACCCAGCTGTTCTTCGACGAGGAATCGGGCAGCAGCGCGGTG  
ATCGACCCGTGGAGCGGCTCGGCATACGTCGAGGAGCTCACCTGGGACCTGGCCCGCAAGGCATGGGGTC  
ACATCCAGGAGGTCGAGAAGGTCGGCGGCATGGCCAAGGCCATCGAAAAGGGCATCCCCAAGATGCGCAT  
CGAGGAAGCCGCCCGCCCGCACCCAGGCACGCATCGACTCCGGCCGCCAGCCGCTGATCGGCGTGAACAAG  
TACCGCCTGGAGCACGAGCCGCCGCTCGATGTGCTCAAGGTGGACAACCTCCACGGTGTCTGCCGAGCAGA  
AGGCCAAGCTGGTCAAGCTGCGCGCCGAGCGCGATCCCGAGAAGGTCAAGGCCGCCCTCGACAAGATCAC  
CTGGGCCGCCCGGCAACCCCCGACGACAAGGATCCGGATCGCAACCTGCTGAAGCTGTGCATCGACGCTGGC  
CGCGCCATGGCGACGGTCCGGCGAGATGAGCGACGCGCTCGAGAAGGTCTTCGACGCTACACCGCCAGA  
TTCGCACCATCTCCGGTGTGTACTCGAAGGAAGTGAAGAACACGCCTGAGGTTGAGGAAGCACGCGAGCT  
CGTTGAGGAATTCGAGCAGGCCGAGGGCCGTCGTCTCGCATCCTGCTGGCCAAGATGGGCCAGGACGGT  
CACGACCGTGGCCAGAAGGTCATCGCCACCGCCTATGCCGACCTCGGTTTCGACGTCGACGTGGGCCCGC  
TGTTCCAGACCCCGGAGGAGACCGCACGTCAGGCCGTCGAGGCCGATGTGCACGTGGTGGGCGTTTTCTGTC  
GCTCGCCGGCGGGCATCTGACGCTGGTTCCGGCCCTGCGCAAGGAGCTGGACAAGCTCGGACGTCCCGAC  
ATCCTCATCACCGTGGGCGGCGTGATCCCTGAGCAGGACTTCGACGAGCTGCGTAAGGACGGCGCCGTGG  
AGATCTACACCCCGGCACCGTCATTCCGGAGTCGGCGATCTCGCTGGTCAAGAACTGCGGGCTTCGCT  
CGATGCCACCATCACCATCACCATTAATTCTAGA

**Nukleotidsequenz des Inserts von pTM4:**

mit den Erkennungssequenzen: 5'-terminal für EcoRI und 3'-terminal für HindIII

GAATTCCAGTACCCAGACCCAGAGTTCATGCTCCGTTCCCTCAGCACAGGAGCCCTTGGTCAATGGAATA  
CAAGTACTCATGGAGAACTCGGTGACTTCATCAGCCTACCCAAACCCAGCATCCTGATTGCCATGAATC  
TGGCCGGAGCCTACAACCTGAAGGCCCAGAAGCTCCTGACTTACCAGCTCATGTCCAGCGACAACAACGA  
TCTAACCATTTGGGCAGCTCGGCCTCACCATCATGGCCCTCACCTCCTCCTGCCGAGACCCTGGGGATAAA  
GTATCCATTCTACAAAGACAAATGGAGAACTGGGCACCTTCCAGCCCCAACGCTGAAGCATCAGCCTTCT  
ATGGGCCCAGTCTAGCGATCTTGGCACTGTGCCAGAAGAACTCTGAGGCGACCTTGCCGATAGCCGTCCG  
CTTTGCCAAGACCCTGCTGGCCAACTCCTCTCCCTTCAATGTAGACACAGGAGCAATGGCAACCTTGGCT  
CTGACCTGTATGTACAACAAGATCCCTGTAGGTTTACAGAGGAAGGTTACAGATCCCTGTTTGGTCAGGTAC  
TAAAGGATATTGTGGAGAAAATCAGCATGAAGATCAAAGATAATGGCATCATTTGGAGACATCTACAGTAC  
TGGCCTCGCCATGCAGGCTCTCTCTGTAAACACCTGAGCCATCTAAAAAGGAATGGAACTGCAAGAAGACT  
ACGGATATGATACTCAATGAGATTAAGCAGGGGAAATTCACAACCCCATGTCCATTGCTCAAATCCTCC  
CTTCCCTGAAAGGCAAGACATACCTAGATGTGCCCCAGGTCACCTTGTAGTCCTGATCATGAGGTACAACC  
AACTCTACCCAGCAACCCTGGCCCTGGCCCCACCTCTGCATCTAACATCACTGTATATACACCATAAAT  
AACCAGCTGAGGGGGTTGAGCTGCTCTTCAACGAGACCATCAATGTTAGTGTGAAAAGTGGGTCAGTGT  
TACTTGTGTCTTAGAGGAAGCACAGCGCAAAAATCCTATGTTCAAATTTGAAACCACAATGACATCTTG  
GGGCCTTGTCTCTCTTCTATCAACAATATCGCGGAAAATGTTAATCACAAGACATACTGGCAGTTTCTT  
AGTGGTGTAACACCTTTGAATGAAGGGTTGCTGACTACATACCCTTCAACCACGAGCACATCACAGCCA  
ATTTACACAGTACAAAGCTT

**Nukleotidsequenz des Inserts von pTM6:**mit den Erkennungssequenzen: 5'-terminal für XbaI und 3'-terminal für ClaI

TCTAGAGAACAATAACGATCTCTTTTCAGGCATCACGTCGGCGTTTTCTGGCACAACTCGGCGGCTTAACC  
GTCGCCGGGATGCTGGGGCCGTCATTGTAAACGCCGCGACTGCGACTGCGGGCGAAGCGGCgactAGCA  
CTCTGCCCCGTTTTGATTTCAGTTGACCTCGGCAATGCCCCGGTTCTGCTGATGCCGCACGACGCTTCGA  
GGAActGGCCGCCAAGGCCGGCACCCGAGAGGCGTGGGAGACGGCCGAGCAGATTCCGGTTGGCACCCCTG  
TTCAACGAAGACGTCTACAAGGACATGGACTGGCTGGACACCTACGCAGGTATCCCGCCGTTTCGTCCACG  
GCCCCGTATGCAACCATGTACGCGTTCCGTCCCTGGACGATTCGCCAGTACGCCGGTTTTCTCCACGGCCAA  
GGAGTCGAACGCCTTCTACCGCCGCAACCTTGGCGCCGGCCAGAAGGGCCTGTCGGTTGCCCTTCGACCTG  
CCCACCCACCGTGGCTACGACTCGGACAATCCCCGCGTCGCCGGTGACGTCGGCATGGCCGGTGTGGCCA  
TCGACTCCATCTATGACATGCGCGAGCTGTTTCGCCGGCATTCGCTGGACCAGATGAGCGTGTCCATGAC  
CATGAACGGCGCCGCTGCTGCCGATCCTGGCCCTCTATGTGGTGACCGCCGAGGAGCAGGGCGTCAAGCCC  
GAGCAGCTCGCCGGGACGATCCAGAACGACATCCTCAAGGAGTTCATGGTTCGTAACACCTACATCTACC  
CGCCGCAGCCGAGTATGCGAATCATCTCTGAGATCTTCGCCTACACGAGTGCCAATATGCCGAAGTGGAA  
TTGATTTCCATTTCCGGCTACCACATGCAGGAAGCCGGCGCCACGGCCGACATCGAGATGGCCTATAACC  
CTGGCCGACGGTGTGACTACATCCGCGCCGGCGAGTCGGTGGGCCTCAATGTCGACCAGTTCGCGCCGC  
GTCTGTCTTTCTTCTGGGGCATCGGCATGAACTTCTTCATGGAGGTTGCCAAGCTGCGTGC CGCGCGCAT  
GTTGTGGGCCAAGCTGGTGCATCAGTTCGGGCGGAAGAACCCGAAGTCGATGAGCCTGCGCACCCACTCG  
CAGACCTCCGGTTGGTTCGCTGACCGCCAGGACGTCTACAACAACGTCGTGCGTACCTGCATCGAGGCCA  
TGGCCGCCACCCAGGGCCATAACCCAGTCGCTGCACACGAACTCGCTCGACGAGGCCATCGCCCTGCCGAC  
CGATTTTCAGCGCCCGCATCGCCCGTAACACCCAGCTGTTCTTCGACGAGGAATCGGGCAGACGCGCGTG  
ATCGACCCGTGGAGCGGCTCGGCATACGTCGAGGAGCTCACCTGGGACCTGGCCCGCAAGGCATGGGGTC  
ACATCCAGGAGGTCGAGAAGGTCGGCGGCATGGCCAAGGCCATCGAAAAGGGCATCCCCAAGATGCGCAT  
CGAGGAAGCCGCCCGCCCGCACCCAGGCACGCATCGACTCCGGCCGCCAGCCGCTGATCGGCGTGAACAAG  
TACCGCCTGGAGCACGAGCCGCCGCTCGATGTGCTCAAGGTGGACAACCTCCACGGTGTCTGCCGAGCAGA  
AGGCCAAGCTGGTCAAGCTGCGCGCCGAGCGCGATCCCGAGAAGGTCAAGGCCGCCCTCGACAAGATCAC  
CTGGGCCGCCCGGCAACCCCCGACGACAAGGATCCGGATCGCAACCTGCTGAAGCTGTGCATCGACGCTGGC  
CGCGCCATGGCGACGGTCCGGCGAGATGAGCGACGCGCTCGAGAAGGTCTTCGACGCTACACCGCCAGA  
TTCGCACCATCTCCGGTGTGTACTCGAAGGAAGTGAAGAACACGCCTGAGGTTGAGGAAGCACGCGAGCT  
CGTTGAGGAATTCGAGCAGGCCGAGGGCCGTCGTCTCGCATCCTGCTGGCCAAGATGGGCCAGGACGGT  
CACGACCGTGGCCAGAAGGTCATCGCCACCGCCTATGCCGACCTCGGTTTCGACGTCGACGTGGGCCCGC  
TGTTCCAGACCCCGGAGGAGACCGCACGTCAGGCCGTCGAGGCCGATGTGCACGTGGTGGGCGTTTTCTGTC  
GCTCGCCGGCGGGCATCTGACGCTGGTTCCGGCCCTGCGCAAGGAGCTGGACAAGCTCGGACGTCCCGAC  
ATCCTCATCACCGTGGGCGGCGTGATCCCTGAGCAGGACTTCGACGAGCTGCGTAAGGACGGCGCCGTGG  
AGATCTACACCCCGGCACCGTCATTCCGGAGTCGGCGATCTCGCTGGTCAAGAACTGCGGGCTTCGCT  
CGATGCCACCATCACCATCACCATATCGATATGGCTAGCAAAGGAGAAGAACTTTTACTGGAGTTGTCC  
CAATTCCTTGTGAATTAGATGGTGTGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGA



---

TGCTACATACGGAAAGCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACA  
CTTGTCACTACTTTCTCTTATGGTGTTC AATGCTTTTCCCGTTATCCGGATCATATGAAACGGCATGACT  
TTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAACGCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGAACTA  
CAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGAT  
TTTAAAGAAGATGGAAACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAAC TATAACTCACACAATGTATACATCA  
CGGCAGACAAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAA AATTCGCCACAACATTGAAGATGGATCCGT  
TCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCAT  
TACCTGTCGACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGCGTGACCACATGGTCCCTTCTTGAGT  
TTGTAAGTCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAGCTCTACAAATAATATCGAT

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Gottschalk für die Überlassung des Themas, sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, die Ermöglichung eines selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens und die mir in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. Rolf Daniel danke ich für die Betreuung während der Promotionszeit, die Freiräume bei der Entwicklung neuer Ideen, diverse Tipps und Anregungen in Gesprächen und ganz besonders die intensive, gewissenhafte und schnelle Durchsicht dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Ruth Schmitz bedanken, die immer ein offenes Ohr für meine Antikörperprobleme hatte, gern anregende Tipps gab und mir auch so einige Substanzen zur Mitbenutzung zur Verfügung gestellt hat.

Nicht zu vergessen sind die ehemaligen und jetzigen „Laborinsassen“ aus 201, mit denen ich gemeinsam durch manch Höhen und Tiefen der Doktorzeit gegangen bin. So möchte ich mich bei *Frank* meinem langjährigen Laborbank- und Schreibtischnachbarn für die vielen außergewöhnlichen Gespräche, bei *Jessi*, die mir durch die Flaschen demonstriert hat, wie herrlich man doch mit sich selber reden kann, und die meinen Schlumpi oft liebevoll versorgt hat, bei *Claudi* der Katzenliebhaberin, bei *Susanne*, dem zweiten Joghurt-Fan neben mir, bei *Anja* mit ihrer „Geheimforschung“, bei der handballspielenden Pflanzen-*Tanja*, bei dem Computer-Liebhaber *Bariş*, bei dem leise-Telefonierer *Sebastian* und bei den ehemaligen Mitgliedern Maike, Corinna, Anke und Tanja für die gute Zusammenarbeit, die lockere, freundschaftliche Atmosphäre und so einige interessante Gespräche bedanken, die mich auf neue Gedanken gebracht haben.

Auch F.F. mit seinem enormen Wissen über die Frauenwelt, M. H., Bata und Kai aus meinem ehemaligen Labor 206 danke ich für so einige überaus erheiternde Freitag-Nachmittage.

Mit Axel hatte ich in der ganzen Zeit nicht nur viele schöne Teestunden. Deine Sicht der Dinge lenkt einen manchmal in ganz neue, interessante und ungeahnte Bahnen. Wir hatten eine schöne Zeit, VIELEN DANK Axel.

Herrn Hellwig, Verena, der Wekstattcrew (den Ehemaligen Charlie und Steckel) und allen Institutsangehörigen, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, sei an dieser Stelle gedankt.

Ebenso verdient die Mannschaft in der Abteilung der Genomanalyse ein Dankeschön für die Sequenzierung meiner Proben.

Sven danke ich für seine Hilfe bei Problemen mit besonders kleinen oder auch großen PCR-Fragmenten.

Silky und mir ist es doch meistens gelungen, uns immer wieder auch an die anderen wichtigen Dinge des Lebens zu erinnern. Ein Hoch auf uns.

Patrick und Naimeh danke ich für ihre Hilfe bei den Arbeiten am Fluoreszenzphotometer und der AG Braus natürlich für die Benutzung des Gerätes.

Inge von den Emis (Abteilung Prof. Dr. F. Mayer) danke ich für die Bearbeitung meiner Proben und Michael Hoppert für die Beantwortung meiner vielen Fragen.

Meiner Mutter und meinen Großeltern bin ich sehr dankbar, dass sie mir das Studium überhaupt ermöglicht haben und mir mit großen und kleinen Geschenken eine tolle und unvergeßliche Studentenzeit bereitet haben.

Mein Schwesterherz kriegt einen dicken Kuß dafür, dass ich nie vergessen habe, wo ich herkomme - nämlich aus dem Norden.

Anke danke ich für die vielen ablenkenden Mittagessen in der Z-Mensa und für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Um Tilli müsstest mich alle beneiden.....! Vielen vielen Dank, dass Du der Mikrobiologie nicht wie geplant völlig den Rücken zugekehrt, sondern bei mir eine Ausnahme gemacht hast. Und für Dein offenes Ohr bei aufkommendem allgemeinen Laborfrust, mathematischen und Computer „Problemchen“ und der großen Unterstützung beim Erstellen des Manuskriptes zu dieser Arbeit. Nicht zu vergessen die Direktleitung zu Impress: SOS! Aber auch Dein geniales Kochtalent haben mir so einige Gaumenfreuden bereitet.

## Lebenslauf

12. März 1971	geboren in Hamburg
1977-1981	Besuch der Heinrich-Hertz-Grundschule in Hamburg
1981-1982	Besuch der Gelehrtenschule des Johanneums, Altsprachliches Gymnasium in Hamburg
1982-1988	Besuch des Detlefsengymnasiums in Glückstadt
1988-1991	Besuch der Kaiser-Karl-Schule in Itzehoe
1991	Abitur
September 1991	Immatrikulation an der Pädagogischen Hochschule in Kiel für das Lehramtstudium mit zusätzlichem Magisterabschluß; Wahlfächern Deutsch und Geschichte
August-September 1992	Industriepraktikum bei der Firma SIHI GmbH & Co KG in Itzehoe
September 1992	Exmatrikulation an der Pädagogischen Hochschule in Kiel
Oktober 1992	Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen für das Studienfach Biologie
September 1993	Pflegepraktikum im Krankenhaus Itzehoe
Oktober 1994	Diplomvorprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Zoologie, Chemie und Physikalische Chemie
Mai 1997	Diplomprüfung in Mikrobiologie (Hauptfach), Zoologie und Bodenkunde
Juli 1997-August 1998	Anfertigung der experimentellen Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. G. Gottschalk und Priv. Doz. Dr. U. Deppenmeier mit dem Titel: „Untersuchung von <i>Gluconobacter oxydans</i> -Stämmen mit mutagenisierter Glucose-Dehydrogenase“
November-Dezember 1998	Laborpraktikum im „Department of Microbiology and Molecular Genetics“ bei Prof. Dr. R. P. Gunsalus and der „University of California, Los Angeles“
Januar 1999	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation