

Vergleichende biochemische und strukturelle Untersuchung thermophiler α -Amylasen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Meike Ballschmiter
aus Göttingen

Göttingen 2005

D 7

Referent: Prof. Dr. W. Liebl

Korreferent: Prof. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 4. 2005

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| I. | EINLEITUNG..... | 1 |
| 1. | <i>Thermotoga maritima</i> , <i>Thermus thermophilus</i> und <i>Anaerobranca gottschalkii</i> : Bewohner heißer Standorte | 1 |
| 2. | Glykogenmetabolismus..... | 5 |
| 3. | Zielsetzung der Arbeit | 7 |
| II. | MATERIAL UND METHODEN..... | 8 |
| 1. | Organismen und Plasmide..... | 8 |
| 2. | Chemikalien und Enzyme..... | 10 |
| 3. | Zellanzucht..... | 10 |
| 3.1. | Medien und Zusätze..... | 10 |
| 3.1.1. | Nährmedien für <i>E. coli</i> | 10 |
| 3.1.2. | Nährmedien für <i>C. glutamicum</i> | 12 |
| 3.1.3. | Nährmedium für <i>T. maritima</i> | 13 |
| 3.2. | Anzuchtbedingungen | 14 |
| 3.2.1. | Anzucht von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i> | 14 |
| 3.2.2. | Anzucht von <i>E. coli</i> B834 zur Inkorporation von Selenomethionin | 15 |
| 3.2.3. | Anzucht von <i>T. maritima</i> | 15 |
| 3.3. | Stammhaltung | 16 |
| 3.4. | Messung der optischen Dichte..... | 16 |
| 3.5. | Zellzahlbestimmung..... | 16 |
| 4. | Molekulargenetische Arbeitsmethoden | 17 |
| 4.1. | Grundlegende Techniken | 17 |
| 4.1.1. | Behandlung von Materialien und Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren | 17 |
| 4.1.2. | Phenol-Chloroform-Extraktion..... | 17 |
| 4.1.3. | DNA-Fällung mit Isopropanol und Ethanol | 17 |
| 4.2. | Isolierung von Plasmid-DNA | 18 |
| 4.2.1. | Schnelle Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (<i>Cracking</i>) | 18 |
| 4.2.2. | Plasmidisolierung durch alkalische Lyse | 18 |
| 4.2.3. | Plasmidisolierung durch „QIAprep Spin Miniprep“ | 20 |
| 4.2.4. | Plasmidisolierung aus <i>C. glutamicum</i> | 20 |
| 4.3. | Agarose-Gelelektrophorese | 21 |
| 4.3.1. | Analytische Agarose-Gelelektrophorese | 21 |
| 4.3.2. | Präparative Agarose-Gelelektrophorese | 22 |
| 4.4. | Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 22 |
| 4.4.1. | Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR | 22 |
| 4.4.2. | Kolonie-PCR zur Klonüberprüfung..... | 23 |
| 4.4.3. | Ortsspezifische Mutagenese | 24 |
| 4.5. | Enzymatische Modifikation von DNA | 25 |
| 4.5.1. | Restriktionsverdau | 25 |
| 4.5.2. | Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten | 26 |
| 4.5.3. | Generierung von A-Überhängen | 26 |
| 4.5.4. | Ligation von DNA..... | 26 |

| | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6. | Transformationsverfahren..... | 27 |
| 4.6.1. | Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation | 27 |
| 4.6.2. | Transformation durch Hitzeschock | 28 |
| 4.6.3. | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die Elektroporation | 28 |
| 4.6.4. | Herstellung kompetenter <i>C. glutamicum</i> -Zellen für die Elektroporation (nach Van der Rest <i>et al.</i> , 1999) | 29 |
| 4.6.5. | Elektroporation | 29 |
| 4.6.6. | X-Gal Test zur Detektion rekombinater <i>E. coli</i> -Klone..... | 30 |
| 5. | Proteinbiochemische Methoden | 31 |
| 5.1. | Standardtechniken..... | 31 |
| 5.1.1. | Quantitative Proteinbestimmung (Bradfordtest) | 31 |
| 5.1.2. | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 31 |
| 5.1.3. | Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE)..... | 33 |
| 5.1.4. | Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen | 34 |
| 5.1.5. | Größenbestimmung von Proteinen | 34 |
| 5.1.6. | Amylase-Aktivitätsfärbung nach SDS-PAGE..... | 35 |
| 5.1.7. | Umpufferung durch Dialyse | 36 |
| 5.1.8. | Konzentration von Proteinlösungen | 36 |
| 5.2. | Zellernte und Rohextraktgewinnung..... | 36 |
| 5.2.1. | Zellernte..... | 36 |
| 5.2.2. | Zellaufschluß mit der „French Pressure Cell“ | 37 |
| 5.2.3. | Zellaufschluß durch Ultraschall | 37 |
| 5.2.4. | Abtrennung thermolabiler Proteine durch Hitzedenaturierung | 37 |
| 5.3. | Proteinreinigung durch FPLC..... | 38 |
| 5.3.1. | Ionenaustausch-Chromatographie (IEC) | 39 |
| 5.3.2. | Gelfiltration (SEC) | 40 |
| 5.4. | Renaturierung von <i>inclusion bodies</i> | 41 |
| 6. | Immunologische Methoden..... | 42 |
| 6.1. | Western-Blot (Towbin <i>et al.</i> , 1979)..... | 42 |
| 6.2. | Dot Blot für immunologischen Nachweis..... | 43 |
| 6.3. | Immundetektion von Proteinen mit alkalische-Phosphatase- konjugierten Antikörpern..... | 43 |
| 7. | Nachweis von Enzymaktivitäten | 44 |
| 7.1. | DNSA-Test zur Bestimmung der Menge reduzierender Zucker (Standard-Test) | 44 |
| 7.2. | Hydrolyse von para-Nitrophenylsubstraten | 47 |
| 7.3. | Produktanalyse durch Dünnschichtchromatographie (TLC) | 48 |
| 7.4. | Quantitative Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen | 50 |
| 7.5. | Photometrische Absorptionsbestimmung | 51 |
| 7.6. | Charakterisierung der Enzymaktivität | 51 |
| 7.6.1. | pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität..... | 51 |
| 7.6.2. | Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität | 51 |
| 7.6.3. | Einfluß von Metallionen und Chelatoren auf die Enzymaktivität | 51 |
| 8. | Charakterisierung glykosidischer Speicherstoffe..... | 52 |
| 8.1. | Isolation des Speicherpolysaccharids | 52 |
| 8.2. | Enzymatischer Verdau | 53 |
| 8.3. | Quantitative Glukose-Bestimmung..... | 53 |
| 9. | Strukturaufklärung..... | 54 |
| 9.1. | Kristallisation biologischer Makromoleküle..... | 54 |
| 9.2. | Kontrolle der Kristallisationsansätze | 55 |
| 9.3. | Kryo-Konservierung und Montage der Kristalle zur Datensammlung | 56 |
| 9.4. | Datenerhebung | 56 |

| | | |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III. | Experimente und Ergebnisse | 58 |
| 1. | Computergestützte Analysen der Sequenz des <i>amyB-Tm</i>-Gens und der Aminosäure-Sequenz von AmyB-Tm | 58 |
| 1.1. | Überprüfung des intragenischen Stopcodons | 58 |
| 1.2. | Datenbankabgleiche | 58 |
| 1.3. | Analyse der AmyB-Tm-flankierenden Region..... | 61 |
| 2. | Rekombinante Expression und Reinigung von AmyB-Tm | 62 |
| 2.1. | Anzucht und Aufreinigung aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3)/pET24c::AB | 62 |
| 2.2. | Expressionsexperimente | 65 |
| 2.2.1. | Semi-anaerobe Aufreinigung von AmyB-Tm | 65 |
| 2.2.2. | Renaturierung von <i>Inclusion Bodies</i> | 67 |
| 2.2.3. | AmyB-Tm-Expression in verschiedenen Medien..... | 68 |
| 2.2.4. | Abhängigkeit von AmyB-Tm-Aktivität und Expressionszeit..... | 69 |
| 2.3. | Expression in alternativen Vektorsystemen | 69 |
| 2.3.1. | Konstruktion des Plasmids pWLQ2::AB..... | 69 |
| 2.3.2. | AmyB-Tm-Expression in pWLQ2::AB-transformierten <i>E. coli</i> -Kulturen | 70 |
| 2.3.3. | AmyB-Tm-Expression in pTAA31 transformiertem <i>E. coli</i> JM83 | 72 |
| 2.4. | Expression in <i>Corynebacterium glutamicum</i> | 74 |
| 2.4.1. | Transfer in <i>C. glutamicum</i> | 74 |
| 2.4.2. | Aufreinigung aus <i>C. glutamicum</i> | 74 |
| 3. | Biochemische Charakterisierung von AmyB-Tm | 75 |
| 3.1. | Allgemeine Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität | 75 |
| 3.1.1. | Aktivität von AmyB-Tm mit pNP-Substraten | 75 |
| 3.1.2. | Enzymkinetik..... | 76 |
| 3.1.3. | Untersuchungen zur Beteiligung von AmyB-Tm am Glykogenstoffwechsel | 77 |
| 3.1.4. | Hemmung durch Acarbose | 78 |
| 3.2. | Einfluß von reduzierenden Agenzien | 78 |
| 3.3. | Einfluß komplexierender Agenzien und Metallionen | 82 |
| 3.4. | Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen | 85 |
| 3.5. | Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von AmyB-Tm..... | 85 |
| 3.5.1. | Analytische Gelfiltration..... | 85 |
| 3.5.2. | Laufverhalten in der Nativ-PAGE | 87 |
| 3.6. | Laufverhalten im SDS-PAGE-Gel | 88 |
| 4. | Untersuchung der AmyB-Expression in <i>T. maritima</i> | 89 |
| 4.1. | Immunologischer Nachweis von AmyB-Tm..... | 89 |
| 4.2. | Wachstumsphasen-Abhängigkeit der AmyB-Expression in <i>T. maritima</i> | 90 |
| 5. | Untersuchungen des Speicherpolysaccharids von <i>T. maritima</i> | 92 |
| 5.1. | Charakterisierung des Speicherpolysaccharids | 92 |
| 5.2. | Quantifizierung des Speicherpolysaccharids | 93 |
| 6. | Aufklärung der Proteinstruktur von AmyB-Tm..... | 94 |
| 6.1. | Kristallisation und Datenerhebung | 94 |
| 6.2. | Aufreinigung von Selenomethionin-AmyB-Tm aus <i>E. coli</i> B834 (DE3) | 95 |
| 6.3. | Eisennachweis | 96 |
| 7. | Analyse der Proteinstruktur | 98 |
| 7.1. | Tertiärstruktur von AmyB-Tm | 98 |
| 7.2. | Identifizierung der katalytischen Aminosäuren..... | 100 |
| 7.3. | Identifizierung einer potentiellen Eisenbindestelle | 103 |

| | | |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 8. | Ortsspezifische Mutagenese von AmyB-Tm | 104 |
| 8.1. | Mutagenese des Cysteinrests 186 | 104 |
| 8.2. | Expression und Aufreinigung der AmyBCys186-Mutante | 106 |
| 9. | Klonierung von <i>amyB-Tt</i> aus <i>T. thermophilus</i> und teilweise Charakterisierung des Genprodukts | 106 |
| 9.1. | Analyse des genetischer Kontexts | 107 |
| 9.2. | Amplifikation und Klonierung | 107 |
| 9.3. | Expressionsvorversuch | 109 |
| 9.4. | Anzucht und Aufreinigung | 109 |
| 9.5. | Biochemische Charakterisierung von AmyB-Tt | 111 |
| 10. | Untersuchungen der α-Amylasen AmyA und AmyB aus <i>Anaerobranca gottschalkii</i> | 114 |
| IV. | DISKUSSION | 117 |
| 1. | Die intrazelluläre α-Amylase AmyB-Tm aus <i>Thermotoga maritima</i> | 117 |
| 1.1. | Biochemische Untersuchungen von AmyB-Tm und AmyB-Tt | 117 |
| 1.2. | Abhängigkeit der AmyB-Tm-Aktivität von Metallionen | 120 |
| 1.3. | Inhibitorischer Effekt von Nukleotiden auf AmyB-Tm | 122 |
| 1.4. | AmyB-Tm als Protein der GHF 57 | 123 |
| 1.5. | Das katalytische Zentrum von AmyB-Tm | 127 |
| 1.6. | Eisen als Metallcofaktor von AmyB-Tm | 129 |
| 1.7. | Die Rolle von AmyB-Tm im <i>T. maritima</i> Stoffwechsel | 131 |
| 2. | Vergleich zweier α-Amylasen aus <i>Anaerobranca gottschalkii</i> | 137 |
| V. | ZUSAMMENFASSUNG | 140 |
| VI. | LITERATURVERZEICHNIS | 142 |
| ANHANG | | 151 |
| DANKSAGUNG | | 155 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|---------------------------------------------------------------|
| A | Ampere |
| AA | Acrylamid |
| Abb. | Abbildung |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BCIP | 5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat |
| bidest. | bidestilliert |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| COG | „Cluster of orthologous groups“ |
| Da | Dalton |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| dest. | destilliert |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| DNSA | 3,5-Dinitrosalicylsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| <i>et al.</i> | und weitere (<i>et alii</i>) |
| Fa. | Firma |
| FPLC | „Fast Protein Liquid Chromatography“ |
| g | Gramm |
| G1,.....,G7 | Glucose,.....,Maltoheptaose (Maltooligosaccharide) |
| h | Stunde |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| IPTG | Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid |
| k | Kilo- ($1 \cdot 10^3$) |
| kB | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani |
| m | milli- ($1 \cdot 10^{-3}$), Meter |
| M | Molar (mol/l), Mega- ($1 \cdot 10^6$) |
| μ | Mikro- ($1 \cdot 10^{-6}$) |
| MCS | Multiklonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>) |
| min | Minute |
| n | Nano- ($1 \cdot 10^{-9}$) |
| NBT | Nitroblue-Tetrazolium |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>) |
| Pa | Pascal |
| PAGE | Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese |
| PBS | Phosphat-NaCl-Puffer (<i>phosphate buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| <i>Pfu</i> -Polymerase | Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i> |
| PEG | Polyethylenglykol |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration |

| | |
|------------------------|-------------------------------------------------|
| PIPES | Piperazin-1,4-bis(2-ethansulfonsäure) |
| r | resistent/Resistenz |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunden |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| ssDNA | einzelsträngige DNA |
| SV | Säulenvolumen |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| <i>Taq</i> -Polymerase | Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i> |
| TE | Tris-EDTA-Puffer |
| TEMED | N,N,N',N',- Tetramethylethylen-diamin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Einheit der Enzymaktivität (unit) |
| ÜN | über Nacht |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| Vol. | Volumen |
| w/v | Masse pro Volumen |
| x-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid |

I. Einleitung

1. *Thermotoga maritima*, *Thermus thermophilus* und *Anaerobranca gottschalkii*: Bewohner heißer Standorte

Eine nicht geringe Anzahl prokaryotischer Organismen existiert in Bereichen, die für den Menschen lebensfeindlich sind. In der anthropozentrisch geprägten Nomenklatur werden die Bewohner solcher Lebensräume als extremophil, das Äußerste liebend, bezeichnet. Darunter fallen in heißen und kalten Habitaten lebende Organismen (Thermophile, Psychrophile) genauso wie die Bewohner von Habitaten mit niedrigem oder hohem pH-Wert (Acidophile, Alkaliphile). Auch unter großem Druck (Piezophile) oder hohem Salzgehalt (Halophile) lebende Organismen werden als extremophil eingestuft.

Die Stellung der hyperthermophilen, d.h. außergewöhnlich hitzeliebenden, Organismen im Stammbaum, wo sie in den tiefsten und kürzesten Zweigen zu finden sind, ist ein Hinweis darauf, daß der gemeinsame Vorfahr der Archaeen und Bakterien ein hyperthermophiler Organismus gewesen ist. Es ist darüber hinaus wahrscheinlich, daß die Entstehung des Lebens auf unserem Planeten in einem heißen Milieu stattgefunden hat. Im Lichte dieser Erkenntnisse scheinen heiße Lebensräume nicht so sehr das Extrem darzustellen, sondern sind vielmehr ein sehr ursprüngliches Habitat. (Achenbach-Richter *et al.*, 1987; Stetter, 1999; DeLong, 2001; Nisbet und Sleep, 2001; Di Giulio, 2003)

Die hitzeliebenden Organismen werden in drei Gruppen eingeteilt: Thermophile haben ein Wachstumsoptimum von 55 °C oder darüber, extrem thermophile wachsen optimal bei mindestens 70 °C und hyperthermophile zeigen optimales Wachstum bei einer Temperatur von 80 °C und höher. Die Temperatur von 113 °C, bei der das Archaeon *Pyrolobus fumarii* sich gerade noch vermehren kann, stellt das bislang bekannte obere Limit des Lebens dar (Blöchl *et al.*, 1997). Es ist aber es ist keinesfalls ausgeschlossen, daß bisher unentdeckte oder noch nicht kultivierte Organismen mit einer höheren Wachstumstemperatur existieren (Stetter, 1999). *Anaerobranca gottschalkii* und *Thermus thermophilus*, deren α -Amylasen in dieser Arbeit untersucht wurden, werden aufgrund ihres Wachstumsoptimums den Thermophilen bzw. extrem Thermophilen zugeordnet. Das Bakterium *Thermotoga maritima*, auf dem das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt, gehört zu den Hyperthermophilen.

Die große Mehrheit der bekannten hyperthermophilen Organismen sind Archaeen. Die Ordnungen der *Thermotogales* und der *Aquificales* stellen bis heute die einzigen hyperthermophilen Vertreter der Bakterien, was *T. maritima* zu einem hervorragenden Studienobjekt für die bakterielle Anpassung an das Leben unter hyperthermophilen Bedingungen macht. Während die Vertreter der *Aquificales* einen lithoautotrophen

Stoffwechsel haben, leben die Vertreter der *Thermotogales* organoheterotroph. Beide Ordnungen stellen sehr tiefe Verzweigungen im Stammbaum der Bakterien dar und bilden gemeinsam mit den hyperthermophilen Archaeen ein Cluster um die gemeinsame Wurzel von Archaeen und Bakterien (Stetter, 1999; DeLong, 2001) (Abb. 1).

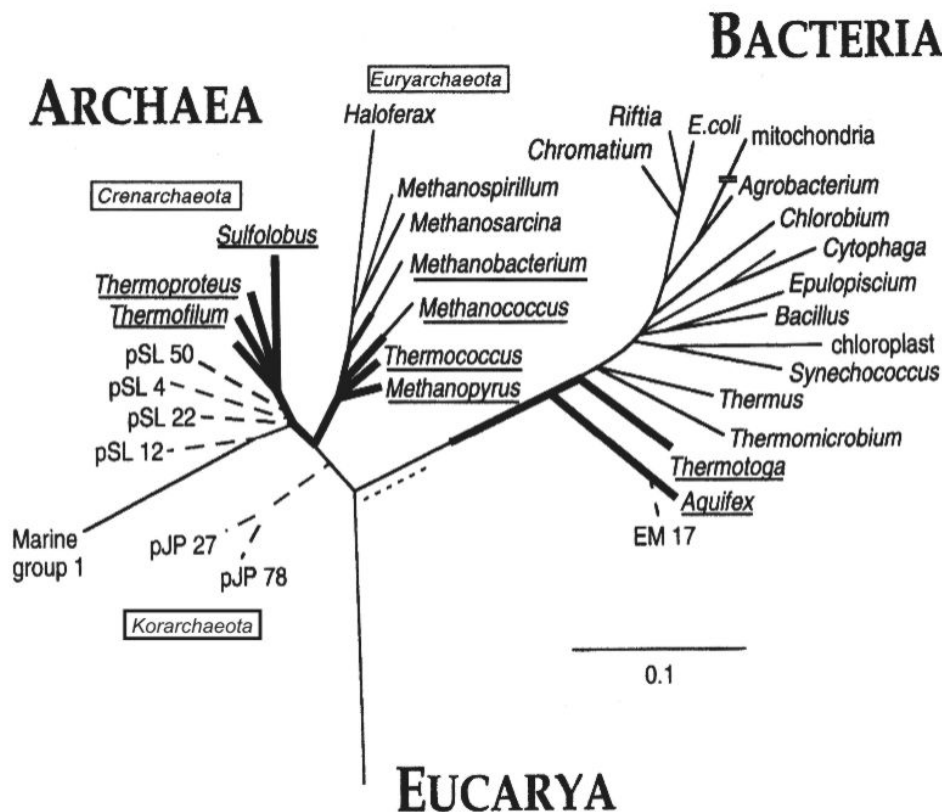


Abb. 1: Ribosomaler RNA-Stammbaum der Archaeen und Bakterien. Fettgedruckte Zweige und unterstrichene Gattungsnamen repräsentieren Hyperthermophile. *Methanococcus* und *Methanobacterium* beinhalten sowohl an hohe wie an niedrige Temperaturen angepasste Spezies. Gestrichelte Linien stellen rRNA aus Umweltproben unkultivierter Organismen dar. Die gepunktete Linie repräsentiert die noch unsichere Position des gemeinsamen Vorfahren von Archaeen und Bakterien. (Aus DeLong, 2001, modifiziert.)

Thermotoga maritima

Das strikt anaerob lebende Bakterium *Thermotoga maritima* wurde aus dem Meeresboden vor der Insel Vulcano, Italien, isoliert und stellt mit seinem Wachstumsoptimum von 80 °C und seiner Fähigkeit, im Bereich von 55 bis 90 °C zu wachsen, zusammen mit dem nahe verwandten *Thermotoga neapolitana* das bisher thermophilste heterotroph lebende Bakterium dar (Huber *et al.*, 1986; Belkin, *et al.*, 1986). Inzwischen konnten *T. maritima* und seine nächsten Verwandten an vielen Orten mit geothermal erhitzten Meeressedimenten

nachgewiesen werden, z. B. vor den Azoren, den Fidschi Inseln, vor der Küste Indonesiens und Japans, sowie an mehreren Tiefseestandorten (Huber *et al.*, 1986; Huber und Stetter, 1992).

Charakteristisch für die Morphologie des Gram-negativen, stäbchenförmigen *T. maritima* ist die namensgebende ‚Toga‘. Diese an den Zellpolen auffällig abstehende äußere Hülle umgibt eine ballonartige Erweiterung des periplasmatischen Raums, deren Volumen das des Cytoplasmas übertreffen kann. Welche Vorteile *T. maritima* durch den so entstehenden zusätzlichen Reaktionsraum hat, ist noch nicht geklärt (Engel *et al.*, 1992).

Wie die übrigen Vertreter der *Thermotogales* hat *T. maritima* einen chemoorganoheterotrophen Stoffwechsel und wächst auf vielen Mono- und Polysacchariden und anderen komplexen organischen Substraten, die zu 15 % über den Entner-Doudoroff-Weg und zu 85 % über den Embden-Meyerhof-Parnas-Weg verwertet werden. Dabei benutzt *T. maritima* im Gegensatz zu vielen hyperthermophilen Archaeen die ‚klassischen‘, nicht-modifizierten Varianten dieser Stoffwechselwege. Als Produkte der Fermentation entstehen Acetat, CO₂ und H₂, sowie in geringer Menge L-Laktat (Huber, *et al.*, 1986; Huber und Stetter, 1992; Schröder *et al.*, 1994; Selig *et al.*, 1997).

Obwohl es sich bei *T. maritima* eindeutig um ein Eubakterium handelt, zeigte sich bei der Sequenzierung des Genoms, daß 24 % der Gene hohe Ähnlichkeit zu archaeellen Genen haben. Außerdem wurden, obwohl *T. maritima* aufgrund der phylogenetischen Einordnung eher als primitiv gilt, überraschend viele Gene für am Zuckerstoffwechsel beteiligte Enzyme sowie für die hohe Anzahl von neun zuckerspezifischen Transportern gefunden. In Relation zu seiner Größe von 1,9 Mbp ist im *T. maritima*-Genom die höchste Anzahl von Kohlenhydrat-modifizierenden und -abbauenden Proteinen aller bislang bekannten prokaryotischen Genome kodiert. Allein der Anteil der für diese Arbeit relevanten Glykosid-Hydrolasen übersteigt den anderer Bakterien bei Weitem (Nelson *et al.*, 1999) (Abb. 2).

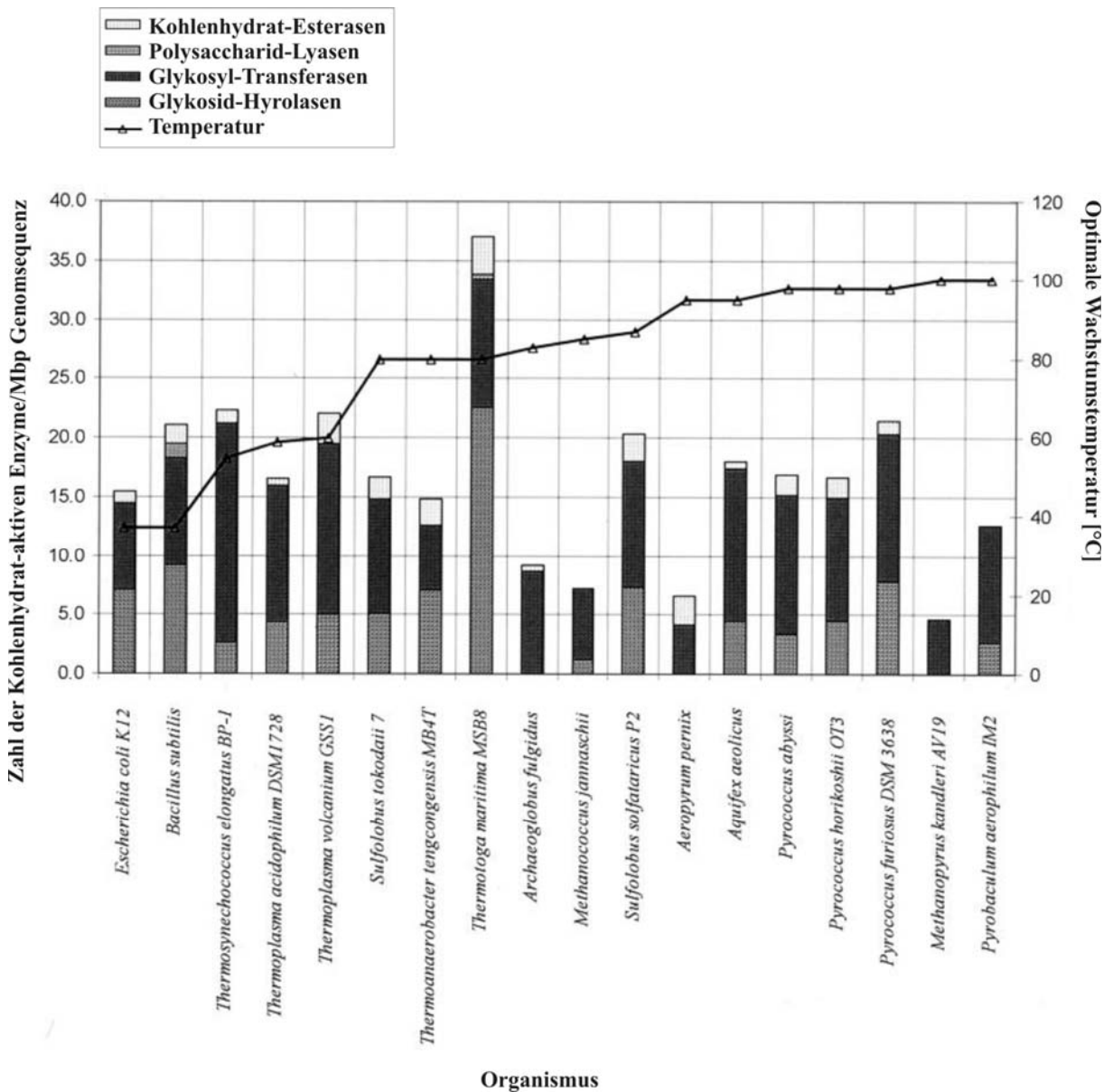


Abb. 2: Zahl der Kohlenhydrat-modifizierenden und -abbauenden Enzyme, die in den Genomsequenzen thermophiler und hyperthermophiler Archaeen und Bakterien kodiert sind. *B. subtilis* und *E. coli* sind zum Vergleich gezeigt. Die zugrundeliegenden Daten wurden der CAZY-Datenbank (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>) entnommen. (Aus Chhabra *et al.*, 2003, modifiziert.)

Thermus thermophilus

Das Gram-negative Bakterium *Thermus thermophilus* wurde aus einer heißen Quelle in Japan isoliert. Sein Wachstumsoptimum liegt bei 75 °C, aber der Organismus ist bis zu einer Temperatur von 85 °C zur Zellteilung fähig. *T. thermophilus* ist halotolerant und wächst unter aeroben Bedingungen obligat chemoorganoheterotroph (Oshima und Imahori, 1974). Neben dem 1,9 Mbp großen Chromosom liegt in *T. thermophilus* ein 230 kbp großes Megaplasmid vor. Der Guanin- und Cytosin-Anteil beträgt in beiden DNA-Molekülen durchschnittlich

69,4 %, was der *T. thermophilus*-DNA einen ungewöhnlich hohen Schmelzpunkt verleiht (Henne *et al.*, 2004). Als einziger der bisher isolierten thermophilen Organismen besitzt *T. thermophilus* eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von extrazellulärer DNA, was das Bakterium zu einem idealen Objekt für genetische Studien macht (Koyama *et al.*, 1986).

Anaerobranca gottschalkii

Anaerobranca gottschalkii befindet sich als thermoalkaliphiles Bakterium mit einem pH-Optimum von pH 8,5 und einem Temperaturoptimum von 50-55 °C gleich in zwei Grenzbereichen des Lebens. Neben seiner Einordnung unter den extrem thermophilen Organismen gehört es auch zur Gruppe der Alkaliphilen, die ein Wachstum bei pH 8,5 oder darüber auszeichnet. Obwohl aufgrund einer ungewöhnlich dünnen Zellwand die Gram-Färbung negativ ausfällt, gehört *A. gottschalkii* zu den Gram-positiven Bakterien (Prowe und Antranikian, 2001). Diese Klassifizierung wird interessanterweise von allen bisher isolierten Thermoalkaliphilen geteilt (Wiegel, 1998).

Das Bakterium wurde aus einem heißen Zulauf des alkalischen Bogoriasees (Kenia) isoliert, der zu einer Kette von Natron-Seen im Great Rift Valley in Ostafrika gehört. Es wächst unter obligat anaeroben Bedingungen und fermentiert ein breites Spektrum an Protein-Substraten sowie Mono- und Polysacchariden. Charakteristisch und namensgebend für *A. gottschalkii* ist die Y-förmige Verzweigung der Zellen (Prowe und Antranikian, 2001).

2. Glykogenmetabolismus

Bereits in früheren Studien konnten drei α -Amylasen, eine extrazelluläre (AmyA-Tm) und zwei intrazelluläre (AmyB-Tm und AmyC-Tm), in *T. maritima* identifiziert werden (Liebl *et al.*, 1996; Fütterer, 2001; Lim *et al.*, 2003). *A. gottschalkii* besitzt vermutlich zwei α -Amylasen, eine extrazelluläre (Amy-Ag) und eine intrazelluläre (AmyB-Ag), während im kürzlich sequenzierten Genom von *T. thermophilus* noch kein Gen mit Ähnlichkeit zu einer α -Amylase gefunden werden konnte (Prowe, 1996; Henne *et al.*, 2004).

Die Klasse der α -Amylasen (EC: 3.2.1.1) ist ein verbreiteter Enzymtyp beim Stärkeabbau. Diese Enzyme spalten α -1,4-glykosidische Bindungen hydrolytisch an beliebigen Stellen innerhalb des Polysaccharids, was zu einem Gemisch kleinerer Maltooligosaccharide als Abbauprodukte führt. Während die Funktion extrazellulärer Amylasen im möglichst schnellen Erschließen einer C-Quelle liegt, haben intrazelluläre andere Aufgaben. Ihnen dienen in der Zelle das bakterielle Speicherglykosid Glykogen und die nach extrazellulärem Stärkeabbau in die Zelle importierten, kurzkettigen Maltodextrine als Substrat.

Glykogen wird von vielen Bakterien und Eukaryoten in der Zelle zur Energiespeicherung gebildet. Es stellt das tierische und prokaryotische Äquivalent zum pflanzlichen Speicherstoff Stärke dar. Als Grundbausteine dienen Glukoseeinheiten, die α -1,4-glykosidisch bzw. α -1,6-glykosidisch verknüpft sind (Abb. 3). Glykogen unterscheidet sich von Amylopektin, dem verzweigten Bestandteil der aus Amylopektin und Amylose bestehenden Stärke, nur durch einen höheren Verzweigungsgrad, d.h. eine höhere Zahl von α -1,6-Bindungen. Während Amylopektin eine durchschnittliche Kettenlänge von 18-24 Glukoseeinheiten hat, sind dies beim Glykogen 12-17 Glukoseeinheiten (Illingworth *et al.*, 1952). In *T. thermophilus*, *E. coli* und thermophilen Archaeen wurden aber auch höher verzweigte Glykogene mit einer Kettenlänge von sieben oder elf Einheiten gefunden (Preiss *et al.*, 1975; König *et al.*, 1982; Boeck und Schinzel, 1998).

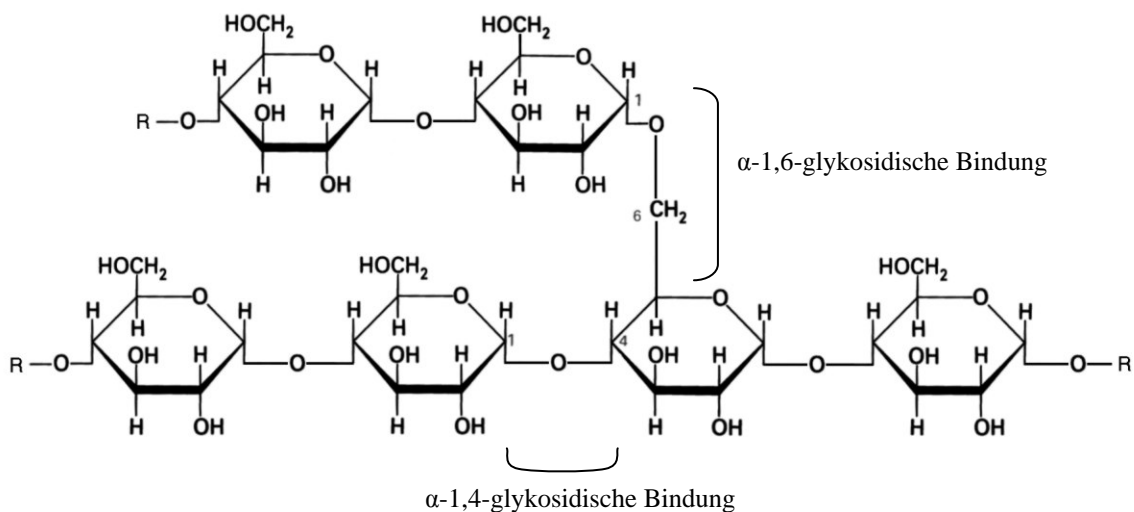


Abb. 3: Ausschnitt aus einem Glykogenmolekül. R steht für weitere Glykosylreste. (Nach Stryer, 1995, modifiziert.)

Glykogen wird in der Zelle gebildet, wenn eine C-Quelle in ausreichender Menge vorhanden ist. Bei Kohlenstoffmangel kann dieser Speicherstoff kontrolliert abgebaut und seine Komponenten in den Metabolismus eingeschleust werden. Der Auf- und Abbau von Glykogen erfolgt auf getrennten Stoffwechselwegen. In Bakterien dient ADP-Glukose als Ausgangspunkt beim Aufbau des Glykogens. Der aktivierte Zucker wird durch die ADP-Glukose-Pyrophosphorylase in einer streng allosterisch regulierten Reaktion synthetisiert. Die Glykogensynthese katalysiert die Bildung einer glykosidischen Bindung zwischen dem C1-

Atom der aktivierten Glukose und dem nicht reduzierenden C4-Ende der wachsenden Glykogenkette, die als ‚Primer‘ fungiert. Die Bildung der α -1,6-Verzweigungen wird durch das sogenannte Verzweigungsenzym (*branching enzyme*), einer (α -1,4 \rightarrow α -1,6)-Transglukosylase, katalysiert, die α -1,4-Bindungen im wachsenden Polysaccharid spaltet und die Oligosaccharidreste an einer anderen Stelle des Polymers α -1,6-glykosidisch anknüpft (Lengler *et al.*, 1999).

Der Abbau des Glykogens erfolgt vom nicht-reduzierenden Ende her durch die Glykogen-Phosphorylase, die die α -1,4-Bindung phosphorolytisch spaltet. Dabei wird im Gegensatz zur hydrolytischen Spaltung der Amylasen ein Glykosylrest auf ein Phosphat-Molekül statt eines H₂O-Moleküls übertragen. Es entsteht Glukose-1-Phosphat, welches durch die Phospho-Glukomutase zu Glukose-6-Phosphat isomerisiert und so in den Zuckerstoffwechsel eingeschleust wird. Die durch die Glykogen-Phosphorylase katalysierte Reaktion ist zwar reversibel, ist aber nicht am α -Glukan Aufbau beteiligt. An den Verzweigungspunkten werden die α -1,6-Bindungen durch eine α -1,6-Glukosidase abgebaut. Der Unterschied zum extrazellulären Polysaccharidabbau besteht neben der Bildung von Glukose-1-Phosphat an Stelle von nicht-phosphorylierten Maltodextrinen darin, daß die Degradation des Glykogens streng kontrolliert wird und das angegriffene Polymer weitestgehend intakt bleibt (Lengler *et al.*, 1999).

3. Zielsetzung der Arbeit

Die intrazelluläre α -Amylase AmyB-Tm aus *T. maritima* sollte biochemisch untersucht, und mit dem ihr auf Aminosäuresequenz-Ebene ähnlichen Enzym AmyB-Tt aus *T. thermophilus* verglichen werden. Durch die Kristallisation und Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von AmyB-Tm, in Zusammenarbeit mit der Abteilung Molekulare Strukturbiologie (Prof. Dr. R. Ficner) sollten Erkenntnisse über den Aufbau und das katalytische Zentrum dieser neuartigen α -Amylase gewonnen werden.

Weiterhin sollten zwei α -Amylasen aus *A. gottschalkii* hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften und damit hinsichtlich ihrer Anpassung an ihre unterschiedliche Lokalisierung in der Zelle verglichen werden.

II. Material und Methoden

1. Organismen und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tabelle 1 bzw. 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete *E. coli*-, *T. maritima*- und *C. glutamicum*- Stämme.

| Stamm | Beschreibung ¹⁾ | Referenz |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| BL21(DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) | Novagen, Darmstadt |
| B834(DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdSB (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met</i> (DE3) | Novagen, Darmstadt |
| JM83 | <i>ara Δ(lac-proAB) rpsL Φ80lacZΔM15</i> | Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985 |
| Rosetta 2 (DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1</i> (DE3) pRARE2 (Cm ^R) | Novagen, Darmstadt |
| XL1-Blue | <i>recA⁻ thi hsdR1 supE44 relA1 lacF['] proAB lacI^f lacZΔM15 Tn10[Tet]</i> | Bullock <i>et al.</i> , 1987 |
| <i>Thermotoga maritima</i> | | |
| MSB8 | Typstamm (=DSMZ 3109) | DSMZ 3109, Huber <i>et al.</i> , 1986 |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> | | |
| DSMZ 20300 | Typstamm (=ATCC 13032) | DSMZ 20300 |
| R163 | <i>C. glutamicum</i> ASO19 restriktionsdefiziente Mutante, <i>tru⁻</i> | Liebl <i>et al.</i> , 1989 |

¹⁾ Geno- und Phänotypbezeichnungen: s. Bachmann (1987)

Tabelle 2: Verwendete Plasmide.

| Stamm | Größe | Beschreibung ¹⁾ | Referenz |
|------------------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| pDRIVE | 3,85 kb | <i>oriEc</i> (pUC) <i>P_{lac}</i> <i>lacZ</i> Kan ^R Amp ^R | Qiagen, Hilden |
| pET21c | 5,44 kb | T7 Promotor <i>lacI</i> Amp ^R | Novagen, San Diego, CA, USA |
| pET24c | 5,44 kb | T7 Promotor <i>lacI</i> Kan ^R | Novagen, San Diego, CA, USA |
| pWLQ2 | 8,46 kb | <i>C. glutamicum</i> / <i>E. coli</i> Schaukelvektor, <i>lacI</i> ^d <i>P_{lac}</i> <i>rrnB</i> <i>mob</i> <i>oriEc</i> (<i>colE1</i>) <i>oriCg</i> (pSR1) Amp ^R Kan ^R | Liebl <i>et al.</i> , 1992 |
| pTAA31 | 7,76 kb | Amp ^R , Tet ^R , <i>cl'</i> , pUN121 Plasmid mit <i>BclI</i> klonierter, chromosomaler <i>T. maritima</i> DNA (inkl. <i>amyB</i> Gen) | W. Liebl, pers. Mitteilung, und Fütterer, 2001 |
| tthi77 | 5,18 kb | Amp ^R pTZ19R Plasmid mit <i>Hinc</i> II klonierter, chromosomaler <i>Thermus thermophilus</i> HB27 DNA (inkl. <i>amyB</i> Gen) | Henne <i>et al.</i> , 2004 |
| pET24c::AB | 7,00 kb | pET24c Expressionsvektor mit dem <i>T. maritima amyB</i> Gen, mittels <i>Bam</i> H1, <i>Nde</i> I kloniert | Fütterer, 2001 |
| pET24c::ABCys186 | 7,00 kb | pET24c Expressionsvektor mit dem <i>T. maritima amyB</i> Gen mit Punktmutation (As-Austausch C186 → S186), mittels <i>Bam</i> H1, <i>Nde</i> I kloniert | diese Arbeit |
| pET21c::TT-AB | 6,97 kb | pET24c Expressionsvektor mit dem <i>T. thermophilus</i> HB27 <i>amyB</i> Gen, mittels <i>Nde</i> I und <i>Hind</i> III kloniert | diese Arbeit |
| pWLQ2::AB | 10,02 kb | pWLQ2 Expressionsvektor mit dem <i>T. maritima amyB</i> Gen, mittels <i>Sma</i> I und <i>Sal</i> I kloniert | diese Arbeit |

¹⁾ Phänotypbezeichnungen: Amp^R, Ampicillin-Resistenz; Kan^R, Kanamycin-Resistenz; Tet^R, Tetracyclin-Resistenz;

Genotypbezeichnungen: *lacI*, Repressor des Lactose Operons; *lacPOZ'*, Promotor-Operator-Region des Lactose-Operons und α -Peptid der β -Galactosidase; *cl'*, *cl*-Strukturgen; *oriEc*, *origin of replication* in *E. coli*; *oriCg*, *origin of replication* in *C. glutamicum*; *mob*, P-Typ spezifische *recognition site* für den konjunkionalen Transfer aus *E. coli* Donorstämmen wie z.B. S17-1; *P_{lac}*, *lac* Promotor; *P_{lac}*, fusionierter *trp*/*lacUV5* Promoter; *rrnB*, Terminations-Region der Replikation des *rrnB* Operons in *E. coli*.

2. Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Oxoid (Basingstoke, England), Roth (Karlsruhe), Biomol (Hamburg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) mit den Reinheitsgraden „pro analysis“ und „reinst“ verwendet. Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

3. Zellanzucht

3.1. Medien und Zusätze

3.1.1. Nährmedien für *E. coli*

Standardmäßig wurden *E. coli*-Kulturen in Luria-Bertani (LB)-Vollmedium angezogen, welches durch 20 minütiges Autoklavieren bei 120 °C sterilisiert wurde. Zur Herstellung von Festmedium wurden 12 g/l Agar zugefügt. Zu Platten, die der Selektion auf amylolytische Aktivität dienen sollten, wurde 0,5 % (w/v) Stärke zugefügt.

LB-Medium

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Trypton | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 1000 ml |

Für die Produktion von Selenomethionin-haltigem AmyB-Protein wurde *E. coli* B834 in M9-Flüssigmedium kultiviert.

M9-Medium (vereinfacht):

| | | | |
|-------------------------------------|-----------|------------------------------------|-------|
| Na ₂ HPO ₄ | 6 g | nach dem Autoklavieren hinzufügen: | |
| KH ₂ PO ₄ | 3 g | Glukose [40 % (w/v)] | 10 ml |
| NH ₄ Cl | 1 g | MgSO ₄ (1 M) | 1 ml |
| NaCl | 0,5 g | CaCl ₂ (0,1 M) | 1 ml |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 980 ml | Biotin (1 mg/ml) | 2 ml |
| | | Thiamin (1 mg/ml) | 2 ml |
| | | L-Methionin (25 mg/ml) | 2 ml |

Alle Medienzusätze wurden getrennt angesetzt und sterilfiltriert.

Semi-anaerobe *E. coli*-Kulturen wurden in M1-Flüssigmedium, einer Kombination von M9- und LB-Medium, angezogen. Das zunächst aerobe Medium wurde mit *E. coli* inokuliert. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurde das Kulturgefäß mit einem Gummistopfen verschlossen. Die Kulturen anaerobisierten sich im weiteren Verlauf des Wachstums durch ihre Stoffwechselfähigkeit. Die Ernte erfolgte nach einer Kultivierung von 1-2 Tagen.

M1-Medium:

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Trypton | 32 g |
| Hefeextrakt | 20 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 6 g |
| KH ₂ PO ₄ | 3 g |
| NaCl | 0,5 g |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 1000 ml |

nach dem Autoklavieren hinzufügen:

| | | |
|-------------------|--------------|-------|
| Glukose | [40 % (w/v)] | 10 ml |
| MgSO ₄ | (1 M) | 1 ml |
| CaCl ₂ | (0,1 M) | 1 ml |

Alle Medienzusätze wurden getrennt angesetzt und sterilfiltriert.

Zur positiven Selektion plasmidhaltiger Mikroorganismen wurden den Medien Antibiotika zugefügt. Zu Agarplatten, die der Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone mit dem Plasmid pBlueskript SK⁺ dienen sollten, wurden außerdem x-Gal und IPTG zugesetzt. Die Zugabe des Antibiotikums sowie der weiteren hitzelabilen Medienbestandteile in den in Tab. 3 aufgeführten Konzentrationen erfolgte nach dem Autoklavieren bei einer Temperatur von 55 °C oder darunter bzw. bei Flüssigmedien kurz vor dem Animpfen. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden alle Stammlösungen sterilfiltriert.

Tab. 3: Konzentrationen der verwendeten Medienzusätze

| Substanz | Lösungsmittel | Stammlösung [mg/ml] | Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] |
|-----------------|--------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| Ampicillin | H ₂ O bidest. | 50 | 50 |
| Kanamycin | H ₂ O bidest. | 25 | 25 |
| Chloramphenicol | Ethanol [50 % (v/v)] | 34 | 34 |
| IPTG | H ₂ O bidest. | 24 | 24 |
| x-Gal | Dimethylformamid | 20 | 64 |

3.1.2. Nährmedien für *C. glutamicum*

Für die Kultur von *C. glutamicum* wurde standardmäßig LB-Fest- und Flüssigmedium mit Antibiotikazusatz verwendet. Nach der Elektroporation jedoch wurde für die Anzucht ein Spezialmedium nach Liebl *et al.* (1989) benutzt.

BHIS-Medium

2x BHI-Medium:

Brain-Heart-Infusion (Difco) 3,7 g
H₂O_{bidest.} ad 50 ml

2x Sorbitol-Lösung:

D-Sorbitol 9,3 g
H₂O_{bidest.} ad 50 ml

MgSO₄ 1 M

Alle Lösungen wurden separat autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die BHI- und Sorbitol-Lösungen vereint und 2 ml MgSO₄-Lösung wurde hinzugefügt.

LBHIS-Festmedium:

2x BHI-Medium:

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| Brain-Heart-Infusion (Difco) | 18,5 g |
| Trypton | 5 g |
| Hefeextrakt | 2,5 g |
| NaCl | 5 g |
| Agar | 14 g |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 500 ml |

2x Sorbitol:

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| D-Sorbitol | 93 g |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 500 ml |

| | |
|-------------------|-----|
| MgSO ₄ | 1 M |
|-------------------|-----|

Alle Lösungen wurden separat autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die BHI und Sorbitol-Lösungen vereint und 20 ml MgSO₄-Lösung sowie die entsprechenden Antibiotika für die Selektion hinzugefügt.

3.1.3. Nährmedium für *T. maritima*

Zur anaeroben Anzucht von *T. maritima* diente ein sogenanntes „vereinfachtes Medium“ (VM, Winterhalter, 1995), ein Komplexmedium, dem gegebenenfalls 0,5 % (w/v) Stärke oder 0,5 % (w/v) Glukose als C-Quelle zugesetzt wurden. Als Redoxindikator wurde dem Medium vor dem Autoklavieren (20 min, 120 °C) Resazurin beigelegt, welches an der Luft blau ist und im vollständig reduzierten Medium farblos ist.

VM:

| | |
|------------------------------|------------|
| Caseinpepton | 5 g |
| Hefeextrakt | 1 g |
| „Instant Ocean“ Aquariensalz | 25 g |
| Stammlösung Resazurin | 1 ml |
| Stammlösung Titancitrat | 200 µl |
| Leitungswasser | ad 1000 ml |
| | pH7,6 |

Stammlösungen:

Resazurin (0,1 %): Resazurin 100 mg
 H₂O_{bidest.} ad 100 ml

Das Medium wurde vor dem Autoklavieren durch dreimaliges Ent- bzw. Begasen mit Stickstoff bei einem Druck von 1 bar anaerobisiert, wobei am Ende ein geringer Überdruck in den Flaschen belassen wurde. Unmittelbar vor dem Animpfen wurde das Reduktionsmittel Titancitrat sowie gegebenenfalls wäßrige Glukosestammlösung [40 % (w/v)] steril zugegeben, da Glukose im Gegensatz zu Stärke vom Medium getrennt autoklaviert und anaerobisiert werden muß. Der anfänglich eingestellte pH-Wert von 7,6 stellt sich nach Zugabe aller Medienbestandteile bei 80 °C auf pH 6,8- 7,3 ein. Titancitrat wurde statt des einfacher zu handhabenden Natriumsulfids als Reduktionsmittel verwendet, da Natriumsulfid mit dem Medium ausfällt und so eine optische Messung der Zelldichte in der Kultur erschwert.

Titan(III)citrat-Lösung (nach Zehnder und Wuhrmann, 1976):

Kaliumcitrat (0,2 M) 50 ml
Titan(III)chlorid [15 % (w/v)] 5 ml

Lagerung im Dunkeln und bei RT in einer Serumflasche unter N₂-Atmosphäre

Beide Stammlösungen wurden unter anaeroben Bedingungen hergestellt. Der pH-Wert der Kaliumcitrat-Lösung wurde mit gesättigter K₂CO₃-Lösung auf pH 7,0 eingestellt, wobei ständig mit N₂ begast, nicht aber durchgast wurde, da der pH-Wert sonst nicht stabil blieb. Nach Zugabe der Titan(III)chlorid-Lösung wurde der pH-Wert erneut auf 7,0 eingestellt.

3.2. Anzuchtbedingungen

3.2.1. Anzucht von *E. coli* und *C. glutamicum*

Alle *E. coli*- und *C. glutamicum*-Stämme wurden aerob bei 37 °C bzw. 30 °C schwenkend auf einem Rundschtüttler (Infors HT, Bottmingen, CH) in Flüssigkulturen unter Selektionsdruck angezogen. Dabei wurden Reagenzgläser oder Erlenmeyerkolben verwendet, deren Volumina dem Zehnfachen des Kulturvolumens entsprachen. Für die Großanzucht zur Gewinnung rekombinanter Proteine wurden 2 l LB-Flüssigmedium auf zwei 5 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen verteilt und aus einer Vorkultur 1 %ig (v/v) angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,7 wurden die Kulturen mit 1 mM IPTG induziert. Geerntet wurden die Zellen durch 15minütige

Zentrifugation bei 8000 Upm in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C (Sorvall[®] RC-5B, Dupont). Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen auf LB-Platten erfolgte bei 37 °C über Nacht, die Kultivierung von *C. glutamicum*-Stämmen ebenfalls auf LB-Platten bei 30 °C. *C. glutamicum* R163 wurde aufgrund seines langsameren Wachstums über 2-3 Tage kultiviert.

Die Kulturen wurden regelmäßig mikroskopisch (Olympus BX41) auf ihre Homogenität untersucht, insbesondere um eine Kontamination der *C. glutamicum*-Kulturen mit *E. coli* auszuschließen.

3.2.2. Anzucht von *E. coli* B834 zur Inkorporation von Selenomethionin

Zur *de novo* Lösung der Struktur von AmyB wurden *multiwavelength anomalous diffraction* (MAD)-Experimente durchgeführt, für die Protein benötigt wird, bei dem alle Methionin-Reste durch Selenomethionin substituiert sind. Zu diesem Zweck wurde der Methionin-auxotrophe Stamm *E. coli* B834 (DE3) mit dem Plasmid pET24c::AB transformiert und in Methionin-supplementierten M9-Medium kultiviert. Die Großanzucht zur rekombinanten Gewinnung Selenomethion-haltigen AmyB-Proteins erfolgte in 1 l M9-Flüssigmedium in einem 5 l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Die Kultur wurde 2 %ig aus einer 30 ml Vorkultur angeimpft und bei 30 °C auf einem Rundschtüttler (Infors HT, Bottmingen, CH) bei 120 Upm inkubiert. Neben Kanamycin zur Selektion plasmidhaltiger Zellen wurde zunächst auch L-Methionin (50 mg/l) der Kultur zugefügt. Nach 3,5 h Wachstum wurde bei einer OD₆₀₀ von ~0,8 die Inkubation unterbrochen und die Zellen durch Zentrifugation (7000 Upm, 20 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 1 l M9-Medium ohne L-Methionin aufgenommen und die Inkubation bei 30 °C fortgesetzt. Nach 1 h, in der im Medium eventuell noch vorhandene L-Methionin-Reste verbraucht werden sollten, wurde 50 mg/l DL-Selenomethionin der Kultur zugesetzt, und nach weiteren 30 min Inkubation wurde die Überexpression von AmyB durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach Wachstum über Nacht wurde die Kultur durch Zentrifugation (7000 Upm, 15 min, 4 °C) geerntet, die Zellen in 20 mM Tris-Puffer (pH 8,0, mit 5 mM DTT) gewaschen und in 6 ml des gleichen Puffers aufgenommen.

3.2.3. Anzucht von *T. maritima*

Die Anzucht von *T. maritima* erfolgte in mit Gummistopfen verschlossenen Serumflaschen (bis 100 ml) und Müller-Krempel-Flaschen (bis 500 ml). Vor dem Animpfen wurde das Medium auf 80 °C vorgewärmt. Alle Inokulierungen, Probenahmen und Zusätze von

Lösungen wurden mit sterilen Spritzen und Kanülen durchgeführt, wobei versucht wurde, den Sauerstoffeintrag in die Kultur so gering wie möglich zu halten. Die Gummistopfen wurden vor dem Durchstechen mit der Kanüle mit 70 %igen Ethanol abgeflammt. Kulturen für die Stammhaltung und für Passagen in ein anders Medium wurden 5 %ig angeimpft, Kulturen für die Aufnahme der Wachstumskurve wurden 7,5 %ig angeimpft. Die Inkubation erfolgte auf einem Rundschüttler (Innova 440 Incubator Shaker, New Brunswick, Nürtingen) bei 100 Upm, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Medium zu gewährleisten. Die Zellernte erfolgte unter aeroben Bedingungen durch Zentrifugation bei 8000 Upm in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C (Sorvall[®] RC-5B, Dupont).

3.3. Stammhaltung

E. coli- und *C. glutamicum*- Stämme wurden bis zu vier Wochen auf LB-Platten bei 4 °C gelagert. Für eine langfristige Konservierung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden frische Übernachtskulturen mit sterilem Glycerin (87 %) im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -70 °C eingefroren. Anaerobe Kulturen von *T. maritima* wurden bis zu einem Jahr in einer Serumflasche bei 4 °C aufbewahrt.

3.4. Messung der optischen Dichte

Die optische Dichte von Flüssigkulturen wurde in Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt (Ultraspec 3300 pro, Pharmacia Biotec), wobei als Nullwert unbeimpftes Medium verwendet wurde.

3.5. Zellzahlbestimmung

Die Gesamtzellzahl in Flüssigkulturen wurde durch Auszählen der Bakterienzellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Neubauer, Hamburg) unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX41, Objektiv Plan 40x/0.65 Ph2, Okular 10x) bestimmt. Hierbei wurde auch die Reinheit der Kultur kontrolliert und die Zellmorphologie beobachtet.

Die verwandte Zählkammer bestand aus 9 b-Feldern, die wiederum in 16 c-Felder mit einer Fläche A von je 0,0025 mm² unterteilt waren. Der Abstand d vom Objektträger zu Deckglas betrug 0,01 mm. Die Zellzahl pro ml errechnet sich durch:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{durchschnittliche Zellzahl pro c-Feld} \times \frac{1}{V_c}$$

Dabei gilt für das Volumen eines c-Feldes V_c :

$$\begin{aligned} V_c &= A \cdot d \\ &= 0,0025 \cdot 0,01 \text{ mm}^3 \\ &= 2,5 \cdot 10^{-8} \text{ ml} \end{aligned}$$

Die Zellzahl jeder Probe wurde dreifach bestimmt, wobei pro Zellzahlbestimmung 10 b-Felder ausgezählt wurden, um statistisch signifikante Werte zu erhalten.

4. Molekulargenetische Arbeitsmethoden

4.1. Grundlegende Techniken

4.1.1. Behandlung von Materialien und Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

Um eine Kontamination durch Nukleasen zu vermeiden, wurden alle thermostabilen Lösungen, Glaswaren und anderen Materialien, die für das Arbeiten mit Nukleinsäuren notwendig waren, autoklaviert oder gegebenenfalls abgeflammt. Thermolabile Medienzusätze wie Antibiotika wurden sterilfiltriert. Des Weiteren wurde die Arbeitsfläche regelmäßig mit 70 %igem (v/v) Ethanol gesäubert.

4.1.2. Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen und anderen Verunreinigungen aus DNA-Lösungen wurden diese 1:1 mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch [25:24:1 (v/v/v)] versetzt und kräftig gemischt. Zur Phasentrennung wurden die Proben 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert (Minispin plus, Eppendorf, Hamburg) und die wässrige, DNA-haltige Phase vorsichtig abgehoben. Zur Entfernung von Phenolresten wurde anschließend die Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol [24:1 (v/v)] wiederholt.

4.1.3. DNA-Fällung mit Isopropanol und Ethanol

Die DNA-Lösungen wurden mit 0,1 Vol. einer 3 M Natrium-Acetat-Lösung (pH 5,2) und 0,7 Vol. Isopropanol oder 3,5 Vol. eiskaltem, unvergälltem Ethanol (96 % (v/v)) versetzt. Die DNA wurde dann mit Isopropanol 15 min bei RT bzw. mit Ethanol 30 min bis 12 h bei -20°C gefällt. Die gefällte DNA wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 13000 Upm und 4°C pelletiert (Biofuge fresco, Kendro, Osterode). Das Pellet wurde anschließend mit 70 %igem (v/v) Ethanol (mind. 500 μl) gewaschen, in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac[®] Plus SC110A, Savant) getrocknet und in 30-50 μl sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ aufgenommen.

4.2. Isolierung von Plasmid-DNA

4.2.1. Schnelle Plasmidisolierung aus *E. coli* (*Cracking*)

Diese Methode dient ausschließlich der schnellen Analyse von *E. coli*-Transformanten, deren *high-copy* Plasmide durch Agarose-Gelelektrophorese (II.4.3.1) hinsichtlich ihrer Größe charakterisiert werden sollen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß als Ausgangsmaterial keine ÜN-Flüssigkultur benötigt wird, sondern daß die Plasmid-DNA direkt aus einer Kolonie von einer Agarplatte gewonnen wird.

Durchführung:

Eine frische Kolonie ausreichender Größe wurde mit einem Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und in 20 µl 10 mM EDTA (pH 8) resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 20 µl frisch angesetztem Aufschluß-Puffer (aus Stammlösungen) und eine fünfminütige Inkubation bei 70 °C. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 1,5 µl 4 M KCl und 1,0 µl DNA-Auftragspuffer (II.4.3.1) zugegeben. Alternativ konnte statt des DNA-Auftragspuffers auch 1 %ige (w/v) Bromphenolblau-Lösung verwendet werden. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 13000 Upm (4 °C) zentrifugiert. Zur Agarose-Gelelektrophorese (II.4.3.1) wurden 20 µl des Überstandes direkt eingesetzt.

Aufschluß-Puffer:

| | | |
|---------|-------------------------------------|--------------------|
| 250 µl | NaOH | (Stammlösung 4 M) |
| 2,5 ml | Saccharoselösung | (Stammlösung 40 %) |
| 500 µl | SDS | (Stammlösung 5 %) |
| ad 5 ml | H ₂ O _{bidest.} | |

4.2.2. Plasmidisolierung durch alkalische Lyse

Grundlegend für diese Methode der Plasmidisolierung (nach Birnboim und Doly, 1979, mod.) ist, daß chromosomale DNA in einem pH-Bereich zwischen 12 und 12,5 denaturiert, während die als ccc-Form vorliegende Plasmid-DNA weitestgehend erhalten bleibt. Unter Einwirkung von SDS und NaOH (Puffer 2) erfolgt bei niedrigen Temperaturen eine Lyse der Bakterienzellwand und Denaturierung der hochmolekularen chromosomalen DNA. DNase-Aktivität wird durch den hohen pH-Wert sowie durch das EDTA in Puffer 1 verhindert. Durch Zugabe von Puffer 3 erfolgt eine Neutralisierung, welche eine Aggregation der chromosomalen DNA bewirkt. Weiterhin kommt es zur Präzipitation von Protein-SDS-Komplexen und hochmolekularer RNA. Durch Zentrifugation sedimentieren die

Makromoleküle und hochmolekularen Komplexe, während die Plasmid-DNA im Überstand bleibt, aus dem sie mit Hilfe von Isopropanol gefällt werden kann (II.4.1.3).

Durchführung:

Eine 5 ml Kultur wurde unter Selektionsdruck bei 37 °C über Nacht angezogen. Anschließend wurden die Zellen in einem Eppendorf-Cup durch Zentrifugation (13000 Upm, 30 s) (Minispin plus, Eppendorf, Hamburg) geerntet. Das Pellet wurde in 200 µl P1 (mit RNase) vollständig resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl P2 und 2x Schwenken wurden die Zellen lysiert. Es erfolgte gegebenenfalls eine 2 minütige Inkubation bei RT, bis die Lösung klar wurde. Zur Fällung von Proteinen und chromosomaler DNA wurde der Ansatz mit 200 µl P3 neutralisiert und nach 2x Schwenken für 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurde die Probe bei 13000 Upm (4 °C, 30 min) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt, bei Bedarf mit Phenol extrahiert (II.4.1.2), und anschließend mit Isopropanol gefällt (II.4.1.3).

Lösungen:

P1 (TE-Puffer):

Tris-HCl 50 mM

EDTA 10 mM

RNase A 200 µg/ml (Stammlösung 10 mg/ml)

pH 8,0

Zugabe der RNase-Lösung nach dem Autoklavieren, Lagerung bei 4 °C.

P2 (Lysis-Puffer):

NaOH 0,2 M

SDS 1 % (w/v)

P3 (Neutralisationspuffer):

Kaliumacetat 3 M

pH 5,5

RNase Stammlösung (50x):

RNase A 10 mg/ml gelöst in Tris-HCl 50 mM
EDTA 10 mM
pH 8,0

Die RNase Stammlösung wurde 15 min im Wasserbad gekocht. Nach dem Abkühlen erfolgte die Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.3. Plasmidisolierung durch „QIAprep Spin Miniprep“

Das Plasmidisolierungskit der Firma Qiagen (Hilden) ermöglicht die Präparation von etwa 20 μg hochreiner DNA. Diese Methode basiert ebenfalls auf der alkalischen Lyse, verbunden mit der Verwendung einer Säule, an welche während der Aufreinigung die Plasmid-DNA selektiv bindet. Die Durchführung dieser Plasmid-Isolierung erfolgte gemäß der vom Hersteller mitgelieferten Versuchsvorschrift.

4.2.4. Plasmidisolierung aus *C. glutamicum*

Die dicke Zellwand der Gram-positiven *C. glutamicum*-Zellen erforderte einen Abbau der Zellwand vor der alkalischen Lyse. Dafür wurde das geerntete Zellpellet in 80 μl TE-Puffer gelöst (II.4.2.2). Es wurden 10 μl einer wässrigen Lysozymlösung (100 mg/ml) zugesetzt und der Ansatz 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 10 μl 0,5 M EDTA-Lösung hinzugegeben. Nach der Zugabe von weiteren 100 μl TE-Puffer wurde die alkalische Lyse wie unter II.4.2.2 und II.4.2.3 fortgeführt.

0,5 M EDTA:

EDTA 18.61 g
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ 100 ml
pH 8,0

4.3. Agarose-Gelelektrophorese

4.3.1. Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Migrationsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente von mehreren Faktoren abhängt, z.B. der Größe der Gelporen (bestimmt durch die Agarosekonzentration), der angelegten Spannung und der Salzkonzentration des Puffers. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt entsprechend ihrer Größe, da die Laufgeschwindigkeit der Fragmente umgekehrt proportional zu ihrer Molekularmasse ist.

Durchführung:

Für die gelelektrophoretische Auftrennungen von Nukleinsäuren wurden horizontale Elektrophoresekammern (Hofer® HE33 Mini Horizontal Submarine Unit; Pharmacia Biotech) verwendet. Die Agarose-Gele bestanden aus 0,8 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer, welcher auch als Elektrophoresepuffer benutzt wurde. Die DNA-Proben wurden 5:1 mit DNA-Auftragspuffer gemischt, der sowohl zur Beschwerung der Proben als auch zur Markierung der Lauffront bei ~ 500 bp diente. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70-100 V. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Nukleinsäuren im Gel in einer wäßrigen Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) 10-20 min gefärbt und anschließend im Wasserbad kurz entfärbt. In der Gel-Dokumentationsanlage (BioRad® GelDoc 1000) wurde die DNA bei UV-Licht durch das eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar gemacht, fotografisch dokumentiert und eventuell nachträglich bearbeitet (Multi-Analyst-V.1.1.1.-Dokumentationsprogramm). Die Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten erfolgte nach an Hand der Laufstrecken eines mitaufgetrennten internen Standards. Als Größenstandard diente dabei eine 1 kB-Leiter (Gene Ruler™ 1kB DNA Ladder, MBI Fermentas), welche in einer Konzentration von 0,05 µg/µl eingesetzt wurde.

Lösungen:

Ethidiumbromid-Färbebad:

250 µl einer 2 mg/ml Ethidiumbromidlösung in 500 ml H₂O_{bidest.}

50x TAE-Puffer:

| | |
|------------------------------------------|-----------|
| Tris-HCl | 242 g |
| Eisessig | 57,1 ml |
| Na ₂ EDTA* 2 H ₂ O | 37,2 g |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 1000ml |
| pH 8,5 | |

10x DNA-Auftragspuffer (Beschwerlösung):

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Ficoll 400 | 7,5 g |
| Bromphenolblau | 50 mg |
| EDTA (0,5M) | 10 ml |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 50 ml |

4.3.2. Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Prinzipiell wurde bei der präparativen Gelelektrophorese wie bei dem unter II.4.3.1 beschriebenen analytischen Verfahren vorgegangen. Um Interkalations- und UV-induzierte Schäden zu minimieren, wurden der Färbeschritt und die anschließende UV-Exposition möglichst kurz gehalten. Nach der Elektrophorese wurden definierte Banden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Zur Präparation der DNA aus dem Gelstück wurde das „QIAQuick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN, Hilden) verwendet. Alle benötigten Protokolle und Reagenzien lagen dem Kit bei.

4.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**4.4.1. Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR**

Bei der PCR wird ein DNA-Molekül *in vitro* vervielfältigt. Falls erforderlich, werden die zu amplifizierenden DNA-Bereiche mit neuen Restriktionsschnittstellen versehen, weshalb die Primer entsprechend der neuen Schnittsequenzen Fehlpaarungen zum DNA-Matrizenstrang aufweisen können. Die Hybridisierungs (*annealing*)-Temperatur bei der PCR-Reaktion ist abhängig von der Länge und Zusammensetzung der Oligonukleotid-Primer. Je größer der G+C-Gehalt ist, desto höher liegt die Hybridisierungstemperatur. Es gilt die Näherung

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

wobei A, T, C und G Platzhalter für die Anzahl der jeweiligen Basen sind. Zur Durchführung der PCR-Läufe wurden programmierbare Thermoblöcke (Primus 25, MWG-Biotech,

Ebersberg, oder MJ Research PTC-200 Gradient Cycler, Biozym, Hess. Oldendorf) verwendet. Die Primer wurden bei der MWG-Biotech AG (Ebersberg) in Auftrag gegeben.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation der zu klonierenden DNA und zur späteren Überprüfung der Klone eingesetzt. Für die Amplifikation der zu klonierenden Gene wurde *Pfu*-Polymerase (Promega, Mannheim) verwendet, da diese die Fähigkeit zum *proof-reading* hat und somit eine geringere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase besitzt. Zur Überprüfung von rekombinanten Klonen wurde die PCR mit *Taq*-Polymerase (Eigenherstellung) durchgeführt. Dabei wurden entweder spezifische Primer oder T7-Primer verwendet, die für Regionen vor und nach der MCS des pET21/24c Vektors spezifisch sind. Die Sequenzen der Primer-Paare sind in Tab. 4 aufgeführt.

Die Reinigung der PCR-Amplifikate, die zur Klonierung eingesetzt werden sollten, von Primern, Polymerase und evtl. Nebenprodukten erfolgte durch präparative Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung mit Hilfe eines Kits (II.4.3.2).

Tab. 4: Für die PCR verwendete Primer. Bei der Amplifikation eingefügte Schnittstellen zur Klonierung sind unterstrichen.

| Bezeichnung | Sequenz | Schnittstelle |
|------------------------|----------------------------------|----------------|
| T7_fwd | TAATACGACTCACTATAGG | |
| T7_rev | CTAGTTATTGCTCAGCGG | |
| amyB_ctrl_fwd (=APM V) | CCAGAGGTGGTGAACG | |
| amyB_ctrl_rev (=APM R) | GAAAACACCACTTGGCGTC | |
| amyB_pWLQ2_fwd | GGCCCGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC | <i>SmaI</i> |
| amyB_pWLQ2_rev | GCTTGTTCGACGGAGCTCGAAT | <i>SalI</i> |
| pWLQ2_ctrl_fwd | TGCGCCGACATCATAACGGTTCTGG | |
| pWLQ2_ctrl_rev | TGATGCCTGGCAGTTCCTACTCTC | |
| Tt_amyB_fwd | ACCGTGGTACGCTAGGCATATGGCGCGCTTCG | <i>NdeI</i> |
| Tt_amyB_rev | GAACTGAAGCTTGGCGTGGCGCACCTCGG | <i>HindIII</i> |

4.4.2. Kolonie-PCR zur Klonüberprüfung

Als schnelle Alternative zur herkömmlichen PCR, bei der als *template* isolierte DNA eingesetzt wurde, erfolgte die PCR-Überprüfung großer Zahlen rekombinanter *E. coli*-Klone durch Kolonie-PCR. Dabei wurden PCR-Ansätze im 35 µl Maßstab vorbereitet. Die gut gewachsenen Kolonien der zu testenden Klone wurden mit einem Zahnstocher von der

Agarplatte abgenommen und in die PCR-Reaktionsgefäße überführt. Dabei genügte ein leichtes Abstreifen der Zahnstocherspitze an der Wand, um genügend Zellmaterial für die PCR in den Ansatz zu bringen.

Mastermix für die Kolonie-PCR

| | |
|-------------------------------------|--------|
| <i>Taq</i> -Puffer (10x) | 100 µl |
| Vorwärts-Primer (100 pmol/µl) | 10 µl |
| Rückwärts-Primer (100 pmol/µl) | 10 µl |
| dNTP-Mix (je 10 mM) | 10 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | 870 µl |

Σ = 1 ml, ausreichend für 28 Ansätze à 35 µl

pro Ansatz: 0,5 µl *Taq*-Polymerase

+1 Kolonie

4.4.3. Ortsspezifische Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen und damit zum gezielten Aminosäureaustausch wurde der QuikChangeSite-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Dem Kit liegt folgendes Prinzip zugrunde: Zwei synthetische Primer (mit der gewünschten Mutation in der Mitte) sind jeweils komplementär zu den antiparallelen DNA-Strängen des Vektors mit dem Zielinsert und werden mittels der *Pfu*Turbo-DNA-Polymerase (Stratagene) verlängert (Tab. 5). Der Einbau der Oligonukleotid-Primer erzeugt ein mutiertes Plasmid mit Strangbrüchen. Nach der PCR wird das parentale DNA-Template mittels der *DpnI*-Endonuklease, die spezifisch für (halb-) methylierte DNA ist, abgedaut. Die DNA aus fast allen *E. coli*-Stämmen ist Dam-methyliert und dem Angriff durch die Nuklease ausgesetzt, so daß letztlich eine Selektion für mutierte, nichtmethylierte, weil synthetisch entstandene, DNA erfolgt. Die verbleibende neue (mutierte) zirkuläre DNA wird in *E. coli* XL1-Blue transformiert und in den Zellen dann die Strangbrüche des mutierten Plasmides repariert. Die eigentliche Durchführung erfolgte nach dem vom Hersteller beigefügten Protokoll.

PCR-Bedingungen:

| | | |
|-----|-------|--------------|
| | 95 °C | 30 s |
| 20x | ⎧ | 94 °C 30 s |
| | | 60 °C 1 min |
| | | 68 °C 10 min |
| | | 68 °C 2 min |

PCR Ansatz:

| | |
|-------------------------------------|---------------|
| <i>Pfu</i> -Turbo Puffer (10x) | 5 µl |
| template DNA (pET24c::AB) | 1 µl (100 ng) |
| Primer (100 pmol/µl) | je 0,1 µl |
| dNTP-Mix (10 mM) | 1 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 50 µl |
| <i>Pfu</i> -Turbo Polymerase | 0,5 µl |

Tab. 5: Für die Cystein 186-Mutagenese verwendete Primer. Die eingefügte *Bg*/III Schnittstelle ist unterstrichen, das zum C186/S186 Austausch führende Codon ist fett gedruckt.

| Bezeichnung | Primer-Sequenz |
|------------------|------------------------------------------------------------|
| AmyB_C186Mut_fwd | TTTGGCTTGC GGAA AG CGGATACTATCAGGGGCT <u>AGATCT</u> |
| AmyB_C186Mut_rev | <u>AGATCTAG</u> CCCTGATAGTATCC GCT TTCCGCAAGCCAAA |

4.5. Enzymatische Modifikation von DNA

4.5.1. Restriktionsverdau

Diese Methode des Schneidens von DNA beruht auf der hohen Spezifität der aus Prokaryoten isolierten Restriktionsendonukleasen (Typ II) gegenüber ihrer meist palindromischen Erkennungssequenz im DNA-Doppelstrang. Die Enzyme hydrolysieren an definierten Stellen die Phosphodiester-Bindungen zwischen zwei Basen in beiden Strängen, woraus überhängende oder glatte Enden resultieren können.

Durchführung:

Die DNA-Lösungen wurden mit 1/10 Volumen des vom Hersteller empfohlenen 10fach konzentrierten Restriktionspuffers und mit dem gewünschten Restriktionsenzym (1-5 U/µg DNA) versetzt und für 1-2 h inkubiert. Bei Doppelverdauansätzen wurde ein Puffer verwendet, in dem beide Enzyme gut schneiden. Die Inkubationstemperatur lag bei 37 °C.

Standard- Restriktionsansatz:

| | |
|-------------------------------------|---------|
| DNA-Lösung | x µl |
| Restriktionspuffer (10x) | 2 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | 18-x µl |
| + 1-5 U Restriktionsenzym /µg DNA | |

4.5.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung von Selbstligationen restriktionsverdauter Vektor-DNA konnten gegebenenfalls die 5'-Phosphatgruppen enzymatisch mit alkalischer *shrimp* oder *antarctic* Phosphatase (Boehringer Mannheim, bzw. New England Biolabs, Frankfurt) abgespalten werden. Hierzu wurden direkt zum Restriktionsverdau-Ansatz (II.4.5.1) 2 µl Phosphatase-Puffer (10x) (Boehringer Mannheim) und 1,5 µl Phosphatase gegeben. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C wurde nochmals 1 µl Phosphatase zugegeben. Eine weitere Inkubation von 30 min schloß sich an. Nach einer Hitzeinaktivierung für 10 min bei 75 °C und einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion mit anschließender Ethanol-fällung (II.4.1.2, 4.1.3) konnte der Ansatz zur Ligation verwendet werden.

4.5.3. Generierung von A-Überhängen

Zur Ligation in den pDrive Vektor war es nötig, an die Produkte der PCR mit *Pfu*-Polymerase, die glatte Enden hatten, A-Überhänge am 3'-Terminus anzufügen. Dazu wurde das PCR-Produkt gereinigt (II.4.3.2) und einer Verlängerungsreaktion mit *Taq*-Polymerase bei 72 °C für 20 min in einem Thermocycler (MWG, Ebersberg) unterworfen. Die Ligation des aufgereinigten PCR-Produkts in den Vektor pDrive erfolgte nach Anleitung des Herstellers (Novagen).

Reaktionsansatz:

| | |
|----------------------------------------|----------|
| aufgereinigtes <i>Pfu</i> -PCR Produkt | 15 µl |
| <i>Taq</i> -Puffer | 5 µl |
| dNTPs (2 mM) | 4 µl |
| dATP (2 mM) | 2 µl |
| <i>Taq</i> -Polymerase | 0,5 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 50 µl |

4.5.4. Ligation von DNA

Die T4-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden von DNA. Das Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA sollte dabei idealerweise 5:1 betragen. Vor der Ligation wurden die Restriktionsenzyme in den DNA-haltigen Lösungen durch eine Hitzebehandlung (10 min, 70 °C) inaktiviert, oder es wurden Fragmente verwendet, die in einem präparativen Agarosegel aufgereinigt worden waren (II.4.3.2) Dem Ligationsansatz (20 µl) wurden

1/10 Vol. eines zehnfach konzentrierten ATP-haltigen Ligationspuffers und 0,5 µl (1 Unit) T4-DNA-Ligase (beides Promega) zugesetzt. Ligationen von DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden erfolgten bei 16 °C und von Fragmenten mit glatten Enden (Zugabe von 0,1 Vol. 50 %igem (v/v) Polyethylenglykol (PEG) zur Erhöhung der Viskosität) bei Raumtemperatur jeweils über Nacht.

4.6. Transformationsverfahren

4.6.1. Herstellung kompetenter Zellen für die Transformation

Eine Hauptkultur (250 ml SOB-Medium, in 1 l Schikanekolben) wurde mit 1 ml einer exponentiell wachsenden *E. coli*-LB-Vorkultur angeimpft und bei 18 °C im Schüttelwasserbad (Gyrotory, Modell G76, New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,7 etwa 24 h angezogen. Nach 10minütiger Abkühlung auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 5000 Upm, 4 °C, GSA-Rotor) geerntet, in 80 ml eiskaltem TB-Puffer vorsichtig resuspendiert, weitere 10 min auf Eis gestellt und nochmals abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml kaltem TB-Puffer aufgenommen, mit 1,4 ml DMSO (Endkonzentration: 7 % (v/v)) versetzt, sorgfältig gemischt, erneut 10 min auf Eis gestellt und in Aliquots à 200 µl auf vorgekühlte Eppendorf-Cups aufgeteilt. Die Zellen wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Lösungen:

SOB-Medium (nach Hanahan, 1983):

| | |
|-------------------|-------------|
| Trypton | 2,0 % (w/v) |
| Hefeextrakt | 0,5 % (w/v) |
| NaCl | 10 mM |
| KCl | 2,5 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| MgSO ₄ | 10 mM |

Die Magnesiumsalze wurden aus getrennt autoklavierten Stammlösungen (1 M MgCl₂ / 1 M MgSO₄) zugegeben.

TB-Puffer:

| | |
|-------------------|-------------------------------|
| Pipes-Puffer | 10 mM |
| MnCl ₂ | 55 mM (getrennt autoklaviert) |
| CaCl ₂ | 15 mM |
| KCl | 250 mM |
| pH 6,7 | |

4.6.2. Transformation durch Hitzeschock

Die kompetenten Zellen (*E. coli* XL1-blue oder DH5 α) wurden 5 min auf Eis aufgetaut, mit 5 μ l Ligationsansatz (10-150 ng DNA) pro 100 μ l Zellen gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Bei einem Hitzeschock von 90 s bei 42 °C erfolgte dann die Aufnahme der DNA. Im Anschluß wurden die Zellen nochmals 3 min auf Eis inkubiert, bevor 800 μ l LB-Medium dazugegeben wurden. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C zur Ausprägung der Selektivmarker inkubiert, auf Agarplatten unter Selektivbedingungen ausplattiert (100 μ l) und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.6.3. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die Elektroporation

Vornehmliches Ziel der Zellpräparation ist die Beseitigung von Salzen aus der Zellsuspension, da diese die Elektroporation stören. Aus einer gut angewachsenen *E. coli*-Vorkultur wurden 500 ml LB-Medium 1 %ig angeimpft und auf dem Rundschtüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Nach dem Abkühlen des Mediums in Eiswasser (ca. 10 min) wurden die Zellen in sterilen GSA-Zentrifugenbechern geerntet (5000 Upm, 20 min, 4 °C). Das Pellet wurde in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert und mit eiskaltem, sterilem H₂O_{bidest.} gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (5000 Upm, 20 min, 4 °C) wurde das Pellet in 40 ml eiskaltem, 10 %igem (v/v) Glycerin aufgenommen. Im Anschluß an eine erneute Zentrifugation (5000 Upm, 10 min, 4 °C) wurde das Volumen des Pellets abgeschätzt, und die Zellen mit dem gleichen Volumen 10 %igen (v/v) Glycerin versetzt. Die Zellen wurden aliquotiert (60 μ l) und entweder sofort für eine Transformation genutzt oder bei -70 °C gelagert.

4.6.4. Herstellung kompetenter *C. glutamicum*-Zellen für die Elektroporation (nach Van der Rest *et al.*, 1999)

Eine 10 ml LB-Vorkultur mit 2 % Glukose wurde mit einer Einzelkolonie *C. glutamicum* angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Hauptkultur erfolgte in einem 1l-Erlenmeyerkolben in 100 ml LB-Medium unter Zusatz von 20 ml frisch angesetzter Epo-Additiv-Lösung, wobei die Hauptkultur mit der gesamten 10 ml-Vorkultur inokuliert wurde. Die Inkubation erfolgte bei 18 °C und 120 Upm auf einem Rundschüttler. Die suboptimale Wachstumstemperatur und die Anwesenheit von Isoniazid, einem Inhibitor der Mycolsäure-Synthese, behindern das Wachstum derart, daß die finale OD₆₀₀ der Kultur 0,6 nicht überschreitet. Nach 28 h Inkubation wurde die Kultur 20 min auf Eis gekühlt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (500 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde viermal in 50 ml eiskaltem, 10 %igem (v/v) Glycerin gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (500 Upm, 10 min, 4 °C) wurde das Volumen des Pellets abgeschätzt, und die Zellen mit dem gleichen Volumen 10 %igen (v/v) Glycerin versetzt. Die Zellen wurden aliquotiert (100 µl) und entweder sofort für eine Transformation genutzt oder bei -70 °C gelagert.

Epo-Additiv-Lösung:

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Isoniazid | 400 mg |
| Glycin | 2,5 g |
| Tween 80 | 100 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 20 ml |

Unmittelbar vor der Inokulation frisch ansetzen.

4.6.5. Elektroporation

Setzt man biologische Membranen einem starken elektrischen Feld aus, werden sie porös. DNA, die sich außerhalb der Zellmembran befindet, kann während eines elektrischen Impulses durch die entstehenden Poren in die Zellen eindringen. Die Elektroporation ist empfindlich gegenüber Salz-Ionen. Falls DNA-Lösung aus einem Ligationsansatz direkt für die Elektroporation eingesetzt wird, muß diese vorher in einer Mikrodialyse mit Hilfe von auf H₂O_{bidest.} schwimmenden Membranfiltern (0,025 µm, VSWP01300, Millipore, Eschborn) 20 min dialysiert werden. Die Elektroporation erfolgte bei *E. coli* und *C. glutamicum* nach

demselben Protokoll, wobei die *C. glutamicum*-Zellen in einem speziellen Regenerationsmedium aufgenommen wurden.

Durchführung:

Die eingefrorenen Zellen (II.4.6.3, 4.6.4) wurden schonend auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 0,1-1 µg DNA-Lösung (2-5 µl) wurde der Ansatz in vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvetten pipettiert und für 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann in einem Elektroporationsgerät (Gene-Pulser[®] II, Bio-Rad GmbH, München) unter den folgenden Bedingungen elektroporiert:

Kapazität: 25 µF

Spannung: 2,5 kV

Widerstand: 200 Ω

Die sich ergebenden Entladungszeiten sollten zwischen 4,5 und 5 ms liegen. Sofort nach erfolgter Elektroporation wurde bei *E. coli*-Zellen 1 ml LB-Medium und bei *C. glutamicum*-Zellen 1 ml auf 30 °C vorgewärmtes BHIS-Medium zugesetzt. Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37 °C bzw. 30 °C zur Expression der Selektionsmarker und zur allgemeinen Regeneration inkubiert. Danach erfolgte das Ausplattieren (20 - 100 µl) auf Selektivnährböden (LB bzw. LBHIS).

4.6.6. X-Gal Test zur Detektion rekombinater *E. coli*-Klone

Dieser Test wurde neben den plasmidkodierten Antibiotikaresistenzen zur Selektion rekombinanter Klone verwendet und basiert auf der Grundlage, daß die β-Galaktosidase x-Gal enzymatisch spaltet, und daß das Reaktionsprodukt durch Luftoxidation zu einem blauen Indigofarbstoff (5-Brom-4-chlor-indigo) umgewandelt wird. Das Plasmid pDrive beinhaltet das 5'-Ende des *lacZ*-Gens, welches für das α-Peptid der β-Galaktosidase kodiert. Die Plasmide der pBluescript-Reihe enthalten zusätzlich dazu auch den Promotor- und Operatorbereich des *lac*-Operons. Das *lacZ*-Genprodukt kann die durch Deletion verkürzte, inaktive β-Galaktosidase diverser *E. coli*-Klonierungsstämmen (DH5α, XL1-Blue) komplementieren. IPTG wird dabei als künstlicher Induktor der β-Galaktosidase-Gene in den Zellen verwendet. Für diesen Test wurden 100 µl einer transformierten *E. coli*-Suspension auf selektiven Nährböden ausplattiert, die IPTG und x-Gal enthielten. Nach dem Wachstum konnten die Kolonien anhand ihrer Färbung unterschieden werden. Blaue Kolonien enthielten das religierte Plasmid, während bei weißen Klonen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine

Insertion in der Multiklonierungsstelle (MCS) des *lacZ*-Gens stattgefunden hatte, so daß entweder kein vollständiges Transkript mehr gebildet wird (wenn die integrierte DNA einen Transkriptionsterminator trug) oder es zur Bildung eines Hybridproteins kommt, welches keine funktionelle α -Komplementation im Wirtsorganismus ermöglicht.

5. Proteinbiochemische Methoden

5.1. Standardtechniken

5.1.1. Quantitative Proteinbestimmung (Bradfordtest)

Für eine quantitative Proteinbestimmung wurde der „Protein Assay Kit“ von der Firma BioRad (München) verwendet, der auf der colorimetrischen Methode von Bradford (1976, mod.) basiert. Der anionisch vorliegende Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 bindet dabei an positiv geladene Aminosäuren der Proteine. Maximal können Proteinmengen von 10 μg bestimmt werden. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 1 μg .

Durchführung:

Die Proteinlösung wurde mit 1 ml der nach Angaben des Herstellers (Konzentrat-Verdünnung 1:5 mit H_2O) angefertigten Färbelösung versetzt, der Ansatz gut gemischt und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach nochmaligem Durchmischen erfolgte die Messung der OD bei 595 nm gegen eine Nullprobe ohne Protein. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Eichgeraden, die mit BSA im Bereich von 0-20 μg Protein/Ansatz erstellt wurde.

5.1.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970, mod.) lassen sich Proteine entsprechend ihrer molaren Massen auftrennen, wobei Dimere bzw. Multimere in ihre Untereinheiten zerteilt werden. Die meisten Proteine binden SDS in einem konstanten Verhältnis. Dodecylsulfat überträgt auf die Proteine eine sehr hohe negative Ladung, wodurch die eigentliche Ladung des Proteins maskiert wird. SDS-beladene Proteine liegen somit in einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis vor. Für die Trennleistung in einem bestimmten Molekularmassenbereich ist der Vernetzungsgrad des Acrylamid/Bisacrylamid-Gels entscheidend. Zur Auftrennung von Proteinen mit Molekularmassen im Bereich von 10-180 kDa wurde ein 10 %iges Gel verwendet.

Lösungen:**Acrylamid-Stammlösung (AA):**

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (24:1) 40 % (w/v)

Trenngel-Stammlösung (TG):

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| Tris | 18,2 g |
| SDS | 0,4 g |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 100 ml |
| pH 8,8 | |

Sammelgel-Stammlösung (SG):

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| Tris | 6,1 g |
| SDS | 0,4 g |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 100 ml |
| pH 6,8 | |

10 x Elektrophorese-Puffer :

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Tris | 30,3 g |
| Glycin | 144,1 g |
| SDS | 10,0 g |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 1000 ml |
| pH 8,4 | |

4 x Probenpuffer:

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Glycerin [87 % w/v] | 7,5 ml |
| β-Mercaptoethanol | 2,5 ml |
| SDS | 1,2 g |
| Bromphenolblau [2 % (w/v)] | 0,5 ml |
| Tris-HCl | 0,4 g |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 50 ml |

Ammoniumpersulfat (APS):

10 % APS (w/v) in H₂O_{bidest.}

Durchführung:

Herstellung der Gele:

Zunächst wurden die Glasplatten und Spacer gründlich mit 70 %igem (v/v) EtOH gereinigt und in den Gießstand eingespannt. Das Trenngel wurde nach dem unten aufgeführten Pipettierschema ohne APS und TEMED zusammenpipettiert und gründlich durchmischt. Nach Zugabe von APS und TEMED und wiederholtem Mischen wurde der Ansatz bis 2 cm unter den oberen Rand der Glasplatten gegossen. Um einen luftblasenfreien Abschluß des Trenngels zu erhalten, wurde es bis zum Rand der Glasplatten mit EtOH (70% (v/v)) oder H₂O_{bidest.} überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel ebenfalls nach dem unten aufgeführten Pipettierschema vorbereitet und auf das Trenngel gegossen. Danach wurde der Kamm möglichst ohne Luftblasen eingesetzt.

Pipettierschema (für ein Gel):

| Lösung | Trenngel 10 % | Sammelgel 3 % |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|
| AA (40 %ig (w/v)) | 1 ml | 0,2 ml |
| TG | 1 ml | -- |
| SG | -- | 0,48 ml |
| H ₂ O _{bidest.} | 2 ml | 1,32 ml |
| TEMED | 3 µl | 2 µl |
| APS | 30 µl | 15 µl |

Probenvorbereitung:

Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer gemischt (1:4) und anschließend mindestens 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach erfolgte eine kurze Zentrifugation mit 13000 Upm, um das Kondenswasser aus dem Deckel des Eppendorf-Cups zu entfernen.

Elektrophorese:

Das Gel wurde in der Elektrophoresekammer fixiert (BioRad Mini-PROTEAN II Cell 10/0,75 cm). Sowohl Anoden- als auch Kathodenraum wurden mit 1 x Elektrophoresepuffer befüllt. Die Geltaschen konnten nach vorsichtigem Herausziehen des Kamms mit bis zu 20 µl Probe beladen werden. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von zunächst 15 mA, später 30 mA pro Gel in der Kammer durchgeführt, bis die blaue Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte (etwa 45-60 min).

5.1.3. Nativ-Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE)

Bei dieser Methode erfolgt die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Ladung und Größe bei gegebenem pH-Wert des Elektrophoresepuffers und gegebenem Vernetzungsgrad des Polyacrylamids. Die nativen Proteingele wurden auf dieselbe Weise wie die SDS-Gele (II.5.1.2) angefertigt und bestehen ebenfalls aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Anstelle von SDS-haltigen Lösungen wurden die unter II.5.1.2 aufgeführten Lösungen ohne SDS eingesetzt.

Durchführung:

Die Proteinproben wurden 4:1 mit Probenpuffer versetzt und ohne vorherige Denaturierung in die Geltaschen gefüllt. Nach einem Vorlauf von 15 min bei 50 V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei 100 V.

4 x Probenpuffer für native Gele:

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Glycerin [87 % (v/v)] | 7,5 ml |
| Bromphenolblau [2 % (w/v)] | 0,5 ml |
| Tris-HCl | 0,4 g |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 25 ml |

pH 6,8

5.1.4. Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen

Die SDS-Gele wurden nach Beendigung der Elektrophorese kurz mit H₂O gespült und dann für 30 min in der Färbelösung unter Schwenken gefärbt. Nach Spülen mit Wasser wurde das Gel in Entfärbelösung, welche mehrmals erneuert wurde, geschwenkt, bis der Hintergrund des Gels farblos war. Die fertigen SDS-Gele konnten danach zur dauerhaften Konservierung luftblasenfrei zwischen zwei Lagen Cellophanfolie im Gel-Air-Dryer (BioRad, München) für eine Stunde getrocknet werden.

Lösungen:**Coomassie-Färbelösung:**

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Coomassie-Brilliant-Blue R 250 | 1,5 g |
| Methanol | 455 ml |
| Eisessig | 80 ml |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 1000 ml |

mehrfach verwendbar

Entfärbelösung:

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Methanol | 250 ml |
| Eisessig | 350 ml |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 1000 ml |

5.1.5. Größenbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteingrößen erfolgte nach Auftrennung in der SDS-PAGE (II.5.1.2) im Vergleich zur Laufstrecke eines im gleichen Gel aufgetrennten internen Standards. Als Größenstandard diente dabei der „High Molecular Weight Standard“ (Sigma), welcher aus folgenden sechs Proteinen besteht:

| Markerproteine: | Molekularmasse [Da] |
|----------------------------------------|----------------------------|
| Myosin, Kaninchenmuskel | 205000 |
| β -Galactosidase, <i>E. coli</i> | 116000 |
| Phosphorylase b, Kaninchenmuskel | 97400 |
| Albumin, Rind | 66000 |
| Albumin, Hühnerei | 45000 |
| Carboanhydrase, Rinder- Erythrocyten | 29000 |

5.1.6. Amylase-Aktivitätsfärbung nach SDS-PAGE

Die Aktivitätsfärbung im SDS-PAGE-Gel beruht auf der Möglichkeit der Renaturierung der in der SDS-PAGE (II.5.1.2) aufgetrennten Proteine und der dadurch möglichen Rekonstitution der enzymatischen Aktivität. So können mit geeigneten Detektionsverfahren die Positionen der enzymatisch aktiven Proteinbanden im SDS-Gel bestimmt werden und Rückschlüsse auf deren Molekularmasse gezogen werden.

Durchführung:

Nach der Elektrophorese wurde das SDS-PAGE-Gel in kurz gewässert und anschließend in 200-400 ml Puffer I überführt. Nach 45 min Inkubation bei RT wurde das Gel in über Nacht in 200-400 ml Puffer II inkubiert. Im gleichen Puffer wurde das Gel dann je nach Enzymaktivität für 15 min - 3 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Für AmyA-Ag und AmyB-Ag waren dies 15 min bei 75 °C. Das Gel wurde kurz gewässert und die Aktivitätsbanden dann durch Zugabe von Lugol'scher Lösung in Form von hellen Höfen sichtbar gemacht.

Lösungen:

Puffer I:

Phosphatpuffer (pH 7,0) (abhängig vom Enzym) 0,2 M

Puffer II:

Phosphatpuffer (pH 7,0) (abhängig vom Enzym) 0,2 M

lösliche Stärke 1 % (w/v)

Lugol'sche Lösung:

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| I ₂ | 1 g |
| KI | 2 g |
| H ₂ O _{dest.} | ad 300 ml |

5.1.7. Umpufferung durch Dialyse

Entsalzung und Umpufferung von Proteinlösungen wurden durch Dialyse in Dialyseschläuchen durchgeführt (VISKING[®] Dialysis Tubing, Serva, Heidelberg). Zunächst wurde ein angemessen großes Schlauchstück abgeschnitten, wobei 1 cm Dialyseschlauch ca. 2,5 ml Flüssigkeit aufnehmen kann. Der Schlauch wurde in H₂O_{bidest.} für 15 min ausgekocht, anschließend mit der Proteinlösung befüllt und an beiden Enden mit Dialyseklammern abgedichtet. Die Dialyse erfolgte über Nacht unter leichtem Rühren gegen 2-5 l Puffer bei 4 °C im Kühlraum.

5.1.8. Konzentration von Proteinlösungen

Um Proteinlösungen einzuengen, wurden Mikrokonzentratoren (Amicon Ultra, Millipore, Cork, Irland) mit einem Ausschlußgröße von 10 kDa bzw. 30 kDa verwendet. Dabei konnten Proteinlösungen von 14 ml auf 200 µl eingengt werden. Die Zentrifugation erfolgte in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5804, Eppendorf, Hamburg) bei 3000 Upm.

5.2. Zellernte und Rohextraktgewinnung**5.2.1. Zellernte**

Zur Gewinnung von Rohextrakten wurden *E. coli*-, *C. glutamicum*- und *T. maritima*-Zellen in Flüssigkultur angezogen und, wie unter II.3.2 beschrieben, geerntet. Das Pellet wurde entsprechend den weiteren Erfordernissen in Puffer aufgenommen, i.d. R. 20 mM Tris-Puffer (pH 8,0). Dieser Puffer diente auch als Waschpuffer. Nach gegebenenfalls mehrmaligem Waschen durch Resuspendieren und Abzentrifugieren (15 min, 7000 Upm, 4 °C) wurde das Naßgewicht des Pellets bestimmt und die Zellen in 2-3 ml Puffer pro g Naßgewicht gründlich resuspendiert. Da *C. glutamicum* als Gram-positives Bakterium eine gegenüber mechanischer Belastung sehr widerstandsfähige Zellwand besitzt, wurde vor dem Aufschluß von *C. glutamicum* der Zellsuspension Lysozym (Endkonzentration 10 mg/ml) zugesetzt und die Suspension 1 h bei 37 °C inkubiert.

5.2.2. Zellaufschluß mit der „French Pressure Cell“

Der Aufschluß von Zellen in der „French Pressure Cell“ (American Instrument Company, Silver Spring, USA) erfolgt dadurch, daß die Zellsuspension zunächst einem Druck von 6,9 MPa ausgesetzt wird, der absinkt, wenn ein kleines Ventil geöffnet wird, und die Zellen hindurchgepreßt werden. Der plötzliche Druckabfall bewirkt das Platzen und somit die Lyse der Zellen. Das zähflüssige Lysat wird aufgefangen und zentrifugiert, wobei Zelltrümmer sedimentieren und von dem cytoplasmatischen Überstand getrennt werden. Der Überstand mit löslichen, intrazellulären Proteinen wird als Rohextrakt bezeichnet. Diese Methode wurde ausschließlich bei größeren Kulturvolumina eingesetzt.

Durchführung:

Die Zellsuspension wurde durch zweimalige Passage durch die „French Pressure Cell“ aufgeschlossen. Das zähflüssige Lysat wurde in SS34-Röhrchen aufgefangen und 20 min zentrifugiert (SS34-Rotor, 15000 Upm, 4 °C).

5.2.3. Zellaufschluß durch Ultraschall

Kulturvolumina von ≤ 5 ml wurden durch Ultraschallaufschluß unter Verwendung einer Ultraschall-Sonde (Ultraschallprozessor UP 200S, 24 kHz, 200 W, Fa. Dr. Hielscher GmbH, Teltow; Sonotrode S2, 2 mm) lysiert. Diese Methode wurde nur angewendet, um kleine Mengen Proteinextrakt zu gewinnen, so daß rasch variable Parameter überprüft und optimiert werden konnten. Die Zellsuspension wurde in einem Eppendorf-Cup 5 min beschallt (35 %ige Amplitude, Cycle 0,5). Obwohl mit thermostabilen Enzymen gearbeitet wurde, wurden die Zellen beim Aufschluß mit Eis gekühlt. Das Abzentrifugieren der Zelltrümmer erfolgte bei 13000 Upm für 15 min in einer Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Kendro, Osterode). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Cup überführt.

5.2.4. Abtrennung thermolabiler Proteine durch Hitzedenaturierung

Zur ersten Anreicherung eines thermophilen Enzyms aus dem Rohextrakt eines mesophilen Wirtes eignet sich besonders die Denaturierung der thermolabilen Wirtspoteine durch einen Hitzeschritt. Dazu wurde der aus dem Zellaufschluß gewonnene klare Überstand in einem SS34-Röhrchen im Wasserbad für 20 min bei dem rekombinanten Protein angemessener Temperatur inkubiert. Die durch die Hitze denaturierten und präzipitierten Wirtspoteine wurden abzentrifugiert (13000 Upm, 15 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand abgenommen.

5.3. Proteinreinigung durch FPLC

Bei einer säulenchromatographischen Proteinreinigung mittels FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) wird das zu trennende Substanzgemisch in Lösung (mobile Phase) über eine Säule aus einer festen, porösen Matrix (stationäre Phase) geschickt. Die Wechselwirkungen der gelösten Bestandteile mit der stationären Phase verzögern die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Matrix in substanzspezifischer Weise. Auf diesem Wege wird im Idealfall z.B. der hitzegefällte Rohextrakt in separate Fraktionen reiner Proteine aufgetrennt.

Durchführung:

Alle Puffer und Proben wurden vor dem Auftragen filtriert, um eine Verunreinigung des Säulenmaterials mit Staubpartikeln zu vermeiden. Die Filtration der Proben erfolgte durch Einweg-Sterilfilter (Minisart 0,2 µm, Sartorius). Die Puffer wurden mit H₂O_{bidest.} hergestellt und anschließend mit einer Vakuumpumpe (Savant) durch Cellulosenitrat-Filter (0,45 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert. Um das Eindringen von Luftblasen in das Säulenmaterial zu verhindern, wurden alle Anschlüsse *drop to drop* verbunden. Die Säulen werden in 20 %igem (v/v) Ethanol gelagert. Direkte Umpufferung der Säulen von Ethanol zu einem salzhaltigen Puffer oder umgekehrt sollte durch Spülen mit MilliQ-Wasser vermieden werden.

Die verwendete ÄKTA-FPLC-Anlage besteht aus folgenden Komponenten (alle Amersham Biosciences, Freiburg):

- Geräte:** Monitor UPC-900
Pumpe P-920
In-line Mixer M-925
Motor Valve INV-907
Fraction Collector Frac-900
10 ml und 50 ml Superloop, 1 ml und 250 µl Probenschleifen
- Säulen:** SOURCE 30Q HR10/10
Superdex 200 prep grade XK 16/60

5.3.1. Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)

Das Trennprinzip der Ionenaustausch-Chromatographie beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den funktionellen Gruppen des Gelmaterials. Dabei treten geladene Gruppen auf der Oberfläche der Proteine mit entgegengesetzt geladenen Gruppen auf der Austauschermatrix in Interaktion und führen so zu einer Bindung an die Säule, wobei die Stärke dieser Bindung von den individuellen Ladungseigenschaften der einzelnen Polypeptide abhängt. Entscheidende Parameter sind die Ionenstärke (Salzkonzentration) und der pH-Wert. Die Elution erfolgt durch eine Erhöhung der Ionenstärke, wodurch die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Protein und Gelmaterial geschwächt wird.

Für die IEC wurde in dieser Arbeit der starke Anionenaustauscher SOURCE 30Q in einer selbstgepackten HR10/10 Säule (8,25 ml Säulenvolumen) verwendet. Das Material besteht aus monodispersen Partikeln mit 30 µm Durchmesser und einer kontrollierten Porenstruktur, die hohe Stabilität und geringen Rückdruck gewährleisten. Die funktionelle Gruppe der SOURCE 30Q ist ein quartäres Amin, das über einen hydrophilen Spacer an die Säulenmatrix gebunden ist. Die Proteinbindungskapazität beträgt bis zu 25 mg Protein pro ml Gelbett. Die empfohlene Flußrate wird mit 300-990 cm/h (4-13 ml/ min) bei einem maximalen Rückdruck von 5 MPa angegeben.

Durchführung:

Die Säule wurde zur Vorbereitung zunächst mit 1 Säulenvolumen (SV) Puffer A (= Niedrigsalzpuffer) und anschließend mit 2 Säulenvolumina Puffer B (= Hochsalzpuffer) gespült, um die funktionellen Gruppen mit Gegenionen abzusättigen. Dann wurde das Medium mit mindestens 8 SV Auftragungspuffer A auf die Startbedingungen äquilibriert. Die Probe (in Puffer A) wurde unter Niedrigsalzbedingungen auf die Säule aufgetragen und in einem ansteigenden Salzgradienten eluiert.

Puffer A: 20 mM Tris-HCl pH 8,0

Puffer B: 20 mM Tris-HCl pH 8,0 + 1000 mM NaCl

5.3.2. Gelfiltration (SEC)

Im Gegensatz zur Anionenaustausch-Chromatographie und zur hydrophoben Interaktions-Chromatographie handelt es sich bei der Gelfiltration um eine nicht-adsorbitive Methode, bei der die Trennung der Proteine aufgrund ihrer Größe erfolgt. Die inerte, poröse Matrix bietet den Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Größe ein mehr oder weniger großes Verteilungsvolumen, mit dem Resultat, daß größere Proteine, denen ein kleineres Verteilungsvolumen zur Verfügung steht, früher eluieren als kleine Proteine; daher der englische Name *Size Exclusion Chromatography* (SEC). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gelfiltration zur Ermittlung des Polymerisationsgrades von AmyB-Tm genutzt.

Es wurde dabei eine Superdex High Load 16/60-Säule verwendet. Die Matrix dieser Säule besteht aus in makroporöse, hochvernetzte Agarose-Partikel (mittlerer Durchmesser 34 µm) kovalent eingebundenen Dextranen. Nichtspezifische Interaktionen mit den Proteinen sind bei diesem Gelmaterial minimalisiert. Empfohlen wird eine Flußrate von 10–50 cm/h bei einem maximalen Rückdruck von 0,3 MPa.

Durchführung:

Damit die Gelfiltration zur Molekularmassenbestimmung von Enzymen verwendet werden konnte, mußten folgende Säulenparameter bekannt sein:

- A) das gesamte Säulenvolumen V_t
- B) das Ausschlußvolumen der Säule V_0
- C) das Elutionsvolumen des Proteins V_e

Anhand dieser Größen konnte der Verteilungskoeffizient K_{AV} eines Proteins ermittelt werden, der folgendermaßen definiert ist:

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Durch Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit Eichproteinen, Bestimmung des Säulenausschluß-Volumens, Ermittlung des jeweiligen Verteilungskoeffizienten und Auftragung des dekadischen Logarithmus der Molekularmasse gegen den K_{AV} -Wert wurde eine Eichgerade erstellt, aus der sich die Molekularmasse eines Proteins anhand seines Verteilungskoeffizienten berechnen ließ.

Auftragspuffer:

50 mM Tris-HCl (pH 8,0) +150 mM NaCl

5.4. Renaturierung von *inclusion bodies*

Bei der Expression, insbesondere der Überexpression, von rekombinanten Proteinen kann es zur Bildung größerer Mengen mißgefalteten Proteins kommen. Dieses formt in *E. coli* sogenannten *inclusion bodies*, d.h. unlöslichen Proteinagglomerate, die einen Großteil der Zellmasse ausmachen können. Die Renaturierung solcher mißgefalteten Proteine ist oft schwierig. In den meisten Renaturierungsprotokollen wird zunächst das unlösliche Protein durch Zugabe von Harnstoff oder chaotropen Salzen entfaltet, um dann in einem großen Volumen bei geringer Proteinkonzentration die Zusätze zu entfernen und so die spontane Faltung der Polypeptidkette in eine native Konformation zu veranlassen. Gelegentlich wird auch versucht, den Faltungsschritt durch Chaperone zu beeinflussen. Die hier verwendete Methode beruht ausschließlich auf der Zugabe und langsamen Entfernung einer hohen Harnstoff-Konzentration.

Durchführung:

Nach einer Überexpression des AmyB-Tm-Proteins in *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB wurden die Zellen geerntet, im Renaturierungspuffer aufgenommen und mit der French Pressure Cell aufgeschlossen (II.3.2.1, 5.2.1 und 5.2.2). Um nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen, wurde der Rohextrakt bei 4000 Upm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand erneut zentrifugiert (13000 Upm, 30 min, 4 °C). Das nun entstandene Pellet aus unlöslichen Zellbestandteilen wurde in 10 ml Puffer B resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur unter Schwenken wurde die Suspension 30 min bei 13000 Upm (4 °C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 10 ml Puffer B aufgenommen und der Inkubationsschritt und die folgende Zentrifugation wiederholt. Das Pellet wurde nun in 5-20 ml Renaturierungspuffer mit 8 M Harnstoff sorgfältig gelöst. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung 30 min bei 13000 Upm (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues SS-34 Röhrchen überführt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde dann 3 h bei Raumtemperatur gegen 0,5 l Renaturierungspuffer mit 1 M Harnstoff dialysiert. In einem zweiten Dialyseschritt wurde der Überstand über Nacht gegen 1 l Renaturierungspuffer ohne Zusatz von Harnstoff dialysiert. Das Dialysat wurde bei 13000 Upm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Erfolg wurde gelelektrophoretisch überprüft.

Renaturierungspuffer:

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Tris | 20 mM |
| K-Glutamat | 125 mM |
| Glycerin | 5 % (v/v) |
| DTT | 2 mM |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 1000 ml |

Vor Zugabe von DTT pH-Wert mit KOH auf pH 8,0 einstellen und Puffer filtrieren.

Puffer B:

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Lysozym (50 mg/ml Stammlösung) | 126 µl |
| Deoxycholat (100 mg/ml Stammlösung) | 300 µl |
| EDTA (0,5 M Stammlösung) | 60 µl |
| Renaturierungspuffer | ad 30 ml |

Frisch ansetzen.

6. Immunologische Methoden**6.1. Western-Blot** (Towbin *et al.*, 1979)

Nach der Auftrennung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten Proteine für immunologische Tests aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert werden. Die Übertragung erfolgte dabei elektrophoretisch unter Verwendung einer Western-Blot-Kammer (Eigenbau) nach dem Semi-Dry-Verfahren. Das Whatmanpapier und eine Nitrocellulosemembran (Protran BA83, Schleicher & Schuell, Dassel) wurden, nachdem sie auf Gelgröße zurechtgeschnitten waren, zusammen mit dem Gel in Transferpuffer gelegt. Anschließend wurden auf die Anodenplatte in folgender Reihenfolge drei Lagen Whatmanpapier, die Nitrocellulosemembran, das Gel und wiederum drei Lagen Whatmanpapier, jeweils unter Vermeidung von Luftblasen, aufgelegt. Nach der Entfernung überschüssigen Transferpuffers mittels saugfähigen Papiers legte man die Kathodenplatte auf und beschwerte die Apparatur. Die Proteine wurden bei konstanter Stromstärke mit 5 mA/cm² Membranfläche für 30-45 min übertragen.

Transferpuffer:

| | |
|-----------------------------------|------------|
| Tris (125 mM) | 15,14 g |
| Glycin (192 mM) | 14,40 g |
| Methanol, 100 % (v/v) | 200 ml |
| H ₂ O _{dest.} | ad 1000 ml |

pH 8,6; Lagerung bei 4 °C

6.2. Dot Blot für immunologischen Nachweis

Zur schnellen Überprüfung der Spezifität der verwendeten polyklonalen anti-AmyB-Tm-Antikörper (aus mit rekombinantem AmyB-Tm immunisiertem Kaninchen, Fütterer, 2001) wurden 0,1-2 µg aufgereinigtes AmyB-Tm-Protein direkt auf eine Nitrocellulosemembran pipettiert und getrocknet. Die weitere Behandlung der Membran erfolgte wie unter II.6.3 beschrieben.

6.3. Immundetektion von Proteinen mit alkalische-Phosphatase-konjugierten Antikörpern

Die Sichtbarmachung der auf einer Nitrocellulosemembran transferierten Proteine (II.6.1) mit den für sie spezifischen Antikörpern erfolgte mit Hilfe einer gekoppelten alkalischen Phosphatase-Reaktion. Die Membran wurde dabei zur Vermeidung unspezifischer Bindungen für 2 h bei RT mit einer wiederverwendbaren Blockierungslösung (TBST mit 3 % (w/v) BSA) abgesättigt. Dann erfolgte die Bindung der polyklonalen Antikörper an ihr Substrat (TBST + 1. Antikörper (Endblutung), Verhältnis 1:2500; Inkubation 1 h). Es folgten drei Waschschrte zu je 5 min in TBST zur Entfernung ungebundener Antikörper. Im nächsten Schritt wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen-Antikörper, IgG, mit alkalischer Phosphatase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH); Verhältnis 1:5000 in TBST) an die bereits gebundenen primären Anti-AmyB-Tm-Antikörper durch eine 30minütige Inkubation gekoppelt. Die Nitrocellulosemembran wurde 3 x in TBST (je 5 min) und 2 x in TBS (je 3 min) gewaschen. Anschließend erfolgte die Sichtbarmachung der Proteine durch Zugabe der Färbelösung. Die Farbreaktion wurde mittels H₂O_{demin.} abgestoppt und die Membran im Dunkeln gelagert.

TBS:

Tris-HCl 2,42 g
NaCl 8,7 g
H₂O_{demin.} ad 1000 ml
pH 7,5

TBST:

TBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20

Färbelösung:

Detektionspuffer 10 ml
NBT/BCIP stock solution 200 µl
(Roche Diagnostics, Mannheim)
Lösung vor Gebrauch frisch ansetzen.

Detektionspuffer:

NaCl (100 mM) 5,84 g
MgCl₂ (5 mM) 1,02 g
Tris (100 mM) 12,11 g
H₂O_{demin.} ad 1000 ml
pH 9,5; Lagerung des Puffers bei 4 °C

7. Nachweis von Enzymaktivitäten

7.1. DNSA-Test zur Bestimmung der Menge reduzierender Zucker (Standard-Test)

Bei der Hydrolyse von polymeren Zuckern werden Oligomere bzw. Monomere gebildet, wodurch sich die Zahl der reduzierenden Enden vervielfacht. Eine Quantifizierung der reduzierenden Aldehydgruppen, bzw. α -Hydroxysubstituenten bei Ketosen, wird durch den Einsatz von 3,5-Dinitrosalicylsäure ermöglicht. Wie in Abb. 4 dargestellt ist, wird in Gegenwart von Phenol und Natriumsulfit 3,5-Dinitrosalicylsäure durch die reduzierenden Enden zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert. Diese Reaktion verursacht bei 100 °C einen Farbumschlag von gelb nach braun. Die bräunliche Färbung des Testansatzes, die bei einer Wellenlänge von 575 nm photometrisch quantifiziert werden kann, ist proportional zur Bildung von 3-Amino-5-nitrosalicylsäure, deren Menge wiederum äquimolar zu der Anzahl der reduzierenden Enden ist.

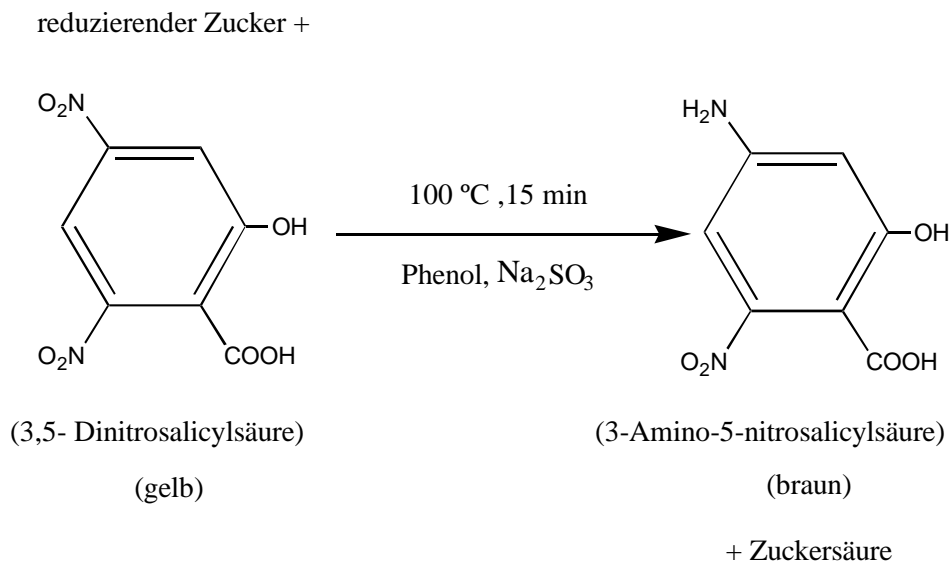


Abb. 4: Reaktionsmechanismus der 3,5- Dinitrosalicylsäure mit reduzierenden Zuckern.

Durchführung:

Der Reaktionsansatz wurde ohne Enzym bei der gewählten Inkubationstemperatur 5 min im Heizblock präinkubiert. Im Abstand von 20 s wurde dann das Enzym zugegeben, der Ansatz kurz gevortext und so schnell wie möglich wieder in den Heizblock zurückgestellt. Die Inkubation erfolgte für eine enzymabhängige Inkubationstemperatur und -zeit. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 750 μl DNSA-Reagenz gestoppt, wobei wieder 20 s Abstand zwischen den E-Cups eingehalten wurden, um eine gleich lange Inkubation zu gewährleisten. Nach kurzem Mischen wurden die Deckel der Eppendorf-Cups mit einer Nadel durchstochen. Die Ansätze wurden dann 15 min bei 98 °C im Heizblock inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Durch Messung der OD bei 575 nm (gegen einen Ansatz ohne Enzym) konnte mit einer aus definierten Maltosekonzentrationen hergestellten Eichgerade die Anzahl der reduzierenden Enden und somit auch die hydrolytische Aktivität des Enzyms bestimmt werden. Dabei entsprach 1 Unit der Enzymaktivität, die in 1 min zur Freisetzung von 1 μmol reduzierenden Enden führte. Alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen.

Enzymassay:

für AmyB-Tm

für AmyB-Tt

250 mM Tris-Puffer, pH 8,0 ^(90 °C)

100 µl

250 mM PIPES-Puffer, pH 6,5 ^(70 °C)

100 µl

Substrat (1 %)

250 µl

Substrat (1 %)

250 µl

DTT (1 M)

5 µl

DTT (0,1 M)

5 µl

H₂O_{bidest.}

150-x µl

H₂O_{bidest.}

150-x µl

Enzym

x µl

Enzym

x µl

Σ = 500 µl

Σ = 500 µl

Inkubation 1 h bei 90 °C

Inkubation 45 min bei 70 °C

für AmyA-Ag

für AmyB-Ag

200 mM McIlvaine-Puffer,

200 mM McIlvaine-Puffer,

pH 8,0 ^(60 °C)

100 µl

pH 6,0 ^(50 °C)

100 µl

Substrat (1 %)

250 µl

Substrat (1 %)

250 µl

H₂O_{bidest.}

150-x µl

H₂O_{bidest.}

150-x µl

Enzym

x µl

Enzym

x µl

Σ = 500 µl

Σ = 500 µl

Inkubation 20 min bei 60 °C

Inkubation 15 min bei 50 °C

Lösungen:

| | | |
|-----------------------|-----------------------------------------|------------|
| DNSA- Reagenz: | Dinitrosalicylsäure | 10 g |
| | Phenol | 2 ml |
| | Na ₂ SO ₃ | 0,5 g |
| | K-Na-Tartrat | 200 g |
| | NaOH | 10 g |
| | H ₂ O _{bidest.} | ad 1000 ml |
| | Vor Licht schützen und bei 4 °C lagern. | |

Substrat: Stärke in H₂O_{bidest.} 1 %
(potato starch, soluble, Sigma)

250 mM Tris-Puffer: Tris-HCl 2,42 g
H₂O_{bidest.} ad 1000 ml

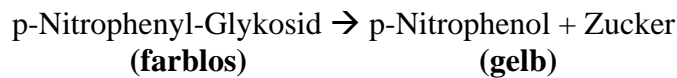
250 mM PIPES-Puffer: PIPES 75,6 g
H₂O_{bidest.} ad 1000 ml

MacIlvaine-Puffer: Na₂HPO₄ 200 mM
Zitronensäure 100 mM
H₂O_{bidest.} ad 1000 ml

Maltose-Stammlösung: Maltose (10 mg/ml) in H₂O_{bidest.} zur Erstellung einer Eichgerade im Bereich von 0,3 – 2 μ mol

7.2. Hydrolyse von para-Nitrophenylsubstraten

Para-Nitrophenyl (pNP)-Glykoside sind synthetische Testsubstrate für hydrolytische Enzyme. Durch die enzymatische Spaltung der Arylglykosidischen Bindung wird p-Nitrophenol freigesetzt, das sich durch seine gelbe Färbung photometrisch bei 420 nm bestimmen läßt.



Testansatz:

| | |
|-----------------------------------------------|-----------------|
| Probe | x μ l |
| 250 mM Tris-Puffer, pH 8,0 ^(90 °C) | 60 μ l |
| 1 M Dithiothreitol (DTT) | 3 μ l |
| H ₂ O _{bidest.} | 227 – x μ l |

nach 3 min Präinkubation bei 90 °C Zugabe von
pNP-Glykosid (0,1 M in DMSO) 10 μ l

Durchführung:

Die Reaktion wurde nach Präinkubation durch Zugabe des Substrats gestartet. Nach 25 min wurde die Reaktion auf Eis durch Zufügen von 500 μ l Na₂CO₃ (1 M) abgestoppt. Die Alkalisierung dient auch der Verstärkung der Gelbfärbung, deren Intensität bei 420 nm gegen eine Negativkontrolle ohne Enzym gemessen wurde. Mit p-Nitrophenol in Konzentrationen von 0 bis 150 nmol wurde eine Eichgerade unter Testbedingungen erstellt. Durch Multiplikation des erhaltenen Extinktionswerts der Testansätze mit dem reziproken Wert des

ermittelten Steigungsfaktors der Eichgeraden wurde die Menge an p-Nitrophenol (in μmol) bestimmt, die im Test freigesetzt wurde. Eine Unit entspricht der Enzymaktivität, die 1 μmol p-Nitrophenol in 1 min freisetzt.

7.3. Produktanalyse durch Dünnschichtchromatographie (TLC)

Die Dünnschichtchromatographie ist eine Form der Verteilungschromatographie zwischen einer hydrophilen (stationären) und einer hydrophoben (mobilen) Phase und dient zur Analyse von Stoffgemischen verschiedener organischer Verbindungen wie Zuckern, Aminosäuren und Nukleotiden. Auf einer mit Sorptionsmittel (Kieselgel, Cellulose) beschichteten Dünnschichtfolie werden wenige μl des zu analysierenden Stoffgemisches aufgetragen. In einer geschlossenen Kammer bewirken Kapillarkräfte das Aufsteigen eines Lösungsmittelgemisches aus einer wässrigen und einer organischen Komponenten (aufsteigende Chromatographie). Die wässrige Komponente bildet mit dem Sorptionsmittel eine gelartige stationäre Phase, während die organische Komponente als mobile Phase eine Auftrennung der Moleküle im Substanzgemisch gemäß ihrer Polarität bewirkt. Die Wanderungsgeschwindigkeiten der zu trennenden Substanzen erfolgt in Abhängigkeit von ihrer relativen Löslichkeit in der stationären und der mobilen Phase, wobei unpolare Moleküle schneller wandern als polare. Aufgetrennte Substanzen werden durch Besprühen des Chromatogramms mit Reagenzlösungen detektiert, welche mit den Molekülen gefärbte Produkte bilden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung von Mono- und Oligosacchariden genutzt, wie sie bei hydrolytischer Spaltung auftreten. Anhand eines Maltooligosaccharid-Standards (G1-G7) wurden die Produkte identifiziert. Als stationäre Phase dienten mit Kieselgel beschichtete Aluminium-Folien (Kieselgel 60, F₂₅₄, Merck, Darmstadt). Als mobile Phase wurden folgende Laufmittel verwendet:

| Laufmittel 1: | | Laufmittel 2: | | Laufmittel 3: | |
|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|---------|
| 1- Propanol | 60 % | 1- Propanol | 50 % | D/L-Laktat (85 % (w/v)) | 2,1 ml |
| Ethylacetat | 10 % | Nitromethan | 30 % | Isopropanol | 40 ml |
| H ₂ O _{bidest.} | 30 % | H ₂ O _{bidest.} | 20 % | Aceton | 40 ml |
| Laufzeit 2x 3 h | | Laufzeit 1x 2 h | | H ₂ O _{bidest.} | 17,9 ml |
| | | | | Laufzeit 1x 3 h | |

Weitere Lösungen:

Substratlösungen: 1 % (w/v) bzw. Maltooligosaccharide 0,1 M

Maltooligosaccharid-Standard: 0,1 % (w/v)

Stammlösung der

Entwicklungsreagenz:

Anilin 1 ml

Diphenylamin 1 g

Aceton 100 ml

Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C.

Entwicklungsreagenz: Stammlösung der Entwicklungsreagenz 5 ml

85 % (v/v) Ortho-Phosphorsäure 0,5 ml

Die Herstellung erfolgt kurz vor der Anwendung. Das Volumen ist ausreichend für die Entwicklung einer DC-Platte.

Durchführung:

Ansatz für den Enzymassay: Substratlösung (1 %ig) 10 µl

Puffer (enzymabhängig) 10 µl

Enzym x µl

H₂O_{bidest.} 20 – x µl

Der Testansatz wurde bei 90 °C für eine angemessene Zeit (meist 1 h) inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. In der Zwischenzeit wurden die Dünnschichtplatten und die Kammer für den Lauf vorbereitet. Aliquots der Testansätze von 2 µl wurden entlang einer Linie 1 cm vom unteren Rand der DC-Platte strichförmig aufgetragen (Abstand der einzelnen Proben mindestens 0,7 cm; Abstand zum Seitenrand der DC-Platte mindestens 1,5 cm). Wurden Proben in einem Umfang von mehr als 2 µl aufgetragen, mußten die Probenauftragsstriche zwischen den einzelnen Aufträgen 10 min bei RT oder mit einem Fön gut getrocknet werden.

Die Chromatographiekammer wurde mit Whatmanpapier ausgekleidet und die Schliffträger von Deckel und Kammer mit Vaseline gefettet. Anschließend wurden 100 ml des jeweiligen Laufmittels über das Whatmanpapier in die Kammer gefüllt. Die trockene DC-Platte wurde in die gut äquilibrierte Dünnschicht-Kammer eingesetzt, wobei sie, um eine gerade Lauffront zu bekommen, die Seitenstreben nicht berühren durfte.

Nachdem die Lauffront 2 cm unter dem oberen Plattenrand angekommen war, wurde die DC-Platte getrocknet (Lagerung bei -20 °C in Alufolie möglich) und mit frisch hergestellter Sprühhlösung (Entwicklungsreagenz +1/10 Vol. Phosphorsäure) besprüht. Die besprühte Platte wurde in Alufolie eingewickelt und für 12 min bei 140 °C inkubiert. Zur Aufbewahrung wurde die Platte anschließend in Schlauchfolie eingeschweißt. Eine eventuelle Dokumentation durch Einscannen der DC-Platten mußte sofort erfolgen, da diese nach einigen Wochen einen blauen Hintergrund entwickeln.

7.4. Quantitative Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen

Der Nicht-Häm-Eisen-Gehalt wurde colorimetrisch durch Bildung eines Ferrozin-Komplexes nachgewiesen (Fish, 1988). Mit saurer Kaliumpermanganat-Lösung wurde Fe^{3+} aus dem Protein gelöst und mit Ascorbinsäure zu Fe^{2+} reduziert, um anschließend komplexiert werden zu können.

Durchführung:

Es wurden 200 µl Lösung A mit 400 µl Probe oder Standardlösung (FeCl_3 in wäßriger Lösung) gemischt und für 2 h bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 40 µl Lösung B versetzt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 562 nm bestimmt. Die Eisenmenge im Ansatz wurde mit Hilfe einer Eichgerade kalkuliert, die mit 0,1-2 µg Fe^{3+} erstellt wurde.

Lösung A:

2,25 %ige Kaliumpermanganat-Lösung in 0,6 M HCl

Frisch ansetzen.

Lösung B:

Ferrospectral (Merck, Darmstadt)

(= 3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonat)-1,2,4-Triazin, Dinatriumsalz) 6,5 mM

Neocuproin (Merck) (= 2,9-Dimethyl-1,10-Phenanthrolin) 13,1 mM

Ascorbinsäure 2 M

Ammoniumacetat 5 M

Frisch ansetzen.

7.5. Photometrische Absorptionsbestimmung

Wellenlängenspektren wurden mit einem Zweistrahlphotometer (Varian, Darmstadt, CARY 100 Conc) im Bereich von 250 bis 600 nm mit Messungen im Abstand von 1 s aufgenommen. Dabei wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Volumen von 100 µl verwendet.

7.6. Charakterisierung der Enzymaktivität

7.6.1. pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität

Zur Ermittlung der amylolytischen Aktivität von AmyB-Tt in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde der Standard-DNSA-Test (II.7.1) mit variablem pH-Wert im Ansatz bei 70 °C durchgeführt. Da die Aktivität des Enzyms in MacIlvaine-Puffer, der auf ein breites Spektrum an pH-Werten eingestellt werden kann, nur gering war, wurden die Messungen in zwei Puffersystemen durchgeführt. Für pH-Werte im Bereich 7,0-9,0 wurde Tris-Puffer mit einer Endkonzentration von 50 mM verwendet, und im pH-Bereich 5,0-7,0 PIPES-Puffer, ebenfalls mit einer Enkonzentration von 50 mM. Bezogen auf die höchste gemessene Aktivität erfolgte die Angabe der Aktivitätswerte als relative Enzymaktivitäten.

7.6.2. Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität

Zur Ermittlung der amylolytischen Aktivität von AmyB-Tt in Abhängigkeit von der Temperatur wurde der Standard-DNSA-Test (II.7.1) bei Inkubationstemperaturen von 50 °C-90 °C durchgeführt. Der Tris-Puffer wurde dazu bei den jeweiligen Meßtemperaturen auf pH 8,0 titriert. Das Temperatur-Optimum wird durch zwei gegenläufige Faktoren bestimmt. Einerseits wird die Reaktion durch die steigende Temperatur thermodynamisch beschleunigt, andererseits wird die Umsetzung von Substraten durch die thermische Inaktivierung des Enzyms ab einer gewissen Temperatur begrenzt. Da die thermische Inaktivierung und somit die Lage des Temperatur-Optimums zeitabhängig ist, wurde die Inkubationszeit von 45 min beibehalten. Auch hier erfolgte die Angabe der Aktivität in relativen Enzymaktivitäten.

7.6.3. Einfluß von Metallionen und Chelatoren auf die Enzymaktivität

Der Einfluß ein- und zweiwertiger Kationen sowie von Chelatoren und potentiellen Regulatoren auf die Aktivität der rekombinanten Amylasen wurde durch den DNSA-Test (II.7.1) unter für die jeweiligen Enzyme als Standard festgelegten Bedingungen ermittelt. Aufgrund der Färbung einiger Additivilösungen bzw. deren Einfluß auf die Farbreaktion des DNSA-Tests wurde die Enzymaktivität jedes Ansatzes gegen eine eigene Nullprobe mit den

gleichen Zusätzen gemessen. Um bei Tests mit komplexierenden Zusätzen (z.B. EDTA) eine gleich lange Präinkubationszeit der Zusätze bei Testtemperaturen zu gewährleisten, wurden diese in 20 s Abständen zu den sich bereits auf den Heizblock befindenden Reaktionsansätzen hinzupipettiert. Nach entsprechender Präinkubationszeit wurden, wenn gewünscht, ebenfalls in 20 s Abständen reaktivierende Zusätze (z.B. Ca^{2+}) dem Ansatz zugefügt. Die eigentliche Inkubation erfolgte für die für das jeweilige Enzym standardmäßig verwendete Zeit.

8. Charakterisierung glykosidischer Speicherstoffe

8.1. Isolation des Speicherpolysaccharids

Zur Isolierung von Glykogen wurde *T. maritima* in 1 l vereinfachtem Medium unter Zusatz von 0,5 % Glukose kultiviert. Nach der Ernte durch Zentrifugation wurden die Zellen dreimal gründlich in Saline gewaschen, in 600 μl KOH (2 N) pro 100 mg Naßgewicht resuspendiert, und auf mehrere Eppendorf-Cups mit Schraubdeckeln aufgeteilt. Die Ansätze wurden 1,5 h lang im Heizblock gekocht. Danach wurden die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (20 min, 13000 Upm, 4 °C) entfernt und die Überstände mit 2,5 Vol. eiskaltem, 90 %igem Ethanol versetzt. Es folgte eine 20minütige Inkubation auf Eis zur Fällung des Glykogens. Nach dem Fällungsschritt wurden die Ansätze 30 min bei 13000 Upm und 4 °C zentrifugiert, die Überstände abgenommen und die entstandenen Pellets zweimal in 70 % Ethanol gewaschen. Nach Entfernen des Ethanols wurden die gelartigen Pellets in einer Vakuum-Zentrifuge (Speed Vac[®] Plus SC110A, Savant) getrocknet, bis sie weiß waren und sich von der Wand der Eppendorf-Cups lösten. Die Pellets wurden in insgesamt 750 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ durch Aufkochen (20 min) gelöst. Die Lösung wurde mit Serdolit[®] MB-3 (Serva, Heidelberg) entsalzt, und der pH-Wert wurde mit NaOH auf ~pH 6,0 eingestellt.

Saline: NaCl 9 g
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ad 1000 ml
 pH 7,0

8.2. Enzymatischer Verdau

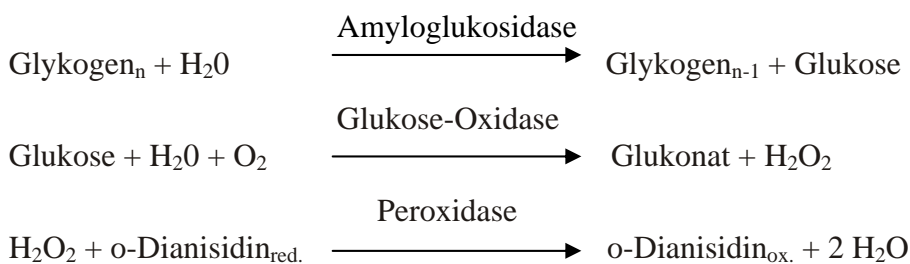
Das in H₂O gelöste Glykogen wurde enzymatisch verdaut, um einerseits durch eine dünnschichtchromatografische Analyse Aussagen über die Zusammensetzung treffen und andererseits die freiwerdende Glukose quantifizieren zu können. Der Verdau erfolgte mit Amyloglukosidase (aus *A. niger*, Boehringer, Mannheim), einem Enzym, welches sowohl α -1,4- als auch α -1,6-glykosidische Bindungen spaltet, und AmyA-Tm aus *A. gottschalkii*, einer α -1,4-spezifischen α -Amylase.

Verdauansatz für die Glukosebestimmung:

| | |
|------------------------------------|-------------|
| 0,1 M Citratpuffer (pH 4,8, 55 °C) | 250 μ l |
| Amyloglukosidase (10 mg/ml) | 100 μ l |
| Glykogenisolat | 150 μ l |

8.3. Quantitative Glukose-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung der durch den enzymatischen Verdau freigesetzten Glukose erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits der Firma Sigma (Glucose Kit 510-Da). Dieses basiert auf der Oxidation der durch den enzymatischen Verdau mit Amyloglukosidase aus Glykogen freigesetzten Glukose, gefolgt von einem zweiten Schritt, bei dem o-Dianisidin durch eine Peroxidase oxidiert wird. Oxidiertes o-Diansidin ist rot-braun und kann bei 450 nm photometrisch quantifiziert werden.



Durchführung:

Ein Aliquot des Amyloglukosidase-Verdauansatzes wurde mit Succinatpuffer und Dianisidin-Färbelösung nach Herstellerangaben 35 min bei 37 °C inkubiert. Die OD₄₅₀ wurde bestimmt, und die Menge an Glukose im Ansatz wurde mit Hilfe einer Eichgeraden kalkuliert, die mit 0-12 μ g Glukose erstellt wurde. Die Menge an Glukose und damit näherungsweise die

Glykogenmenge wurde aus der Differenz der gemessenen Glukosemenge zwischen Proben mit und ohne vorherigen Amyloglukosidase-Verdau errechnet.

Ansatz:

| | |
|---------------------------|--------|
| Verdauansatz (II.8.2) | 120 µl |
| 1 M Succinatpuffer, pH6,0 | 50 µl |
| H ₂ O | 330 µl |
| Dianisidin-Färbelösung | 500 µl |

(nach Herstellerangabe aus o-Dianisidinlösung
und PGO-Enzymegemisch frisch hergestellt)

9. Strukturaufklärung

9.1. Kristallisation biologischer Makromoleküle

Kleine anorganische und organische Moleküle können häufig durch einfache Methoden (z.B. kontrolliertes Abkühlen einer heißen gesättigten Lösung oder langsame Präzipitation) kristallisiert werden. Das Kristallwachstum von Proteinmolekülen hingegen ist ein Prozeß, der von vielen verschiedenen Faktoren (z.B. Temperatur, Konzentration und Reinheit des Proteins, Art und Konzentration von Puffern und Fällungsmitteln) abhängig ist.

Zur anfänglichen Prüfung der Kristallisationsbedingungen gibt es Initial-Screens (Sparse-Matrix-Screens), deren Zusammensetzung statistisch aus bereits bekannten Kristallisationsbedingungen ermittelt wurde. Auf diese Weise erhält man in ersten Kristallisationsexperimenten Hinweise auf eine mögliche Zusammensetzung der Kristallisationslösung (Mutterlösung). Durch Variation der Komponentenkonzentrationen, dem Austausch gleichwertiger Ionen und der Konzentrationsänderung des Proteins können die Kristallisationsbedingungen optimiert werden.

Die verwendete Dampfdiffusion, durchgeführt als hängender oder sitzender Tropfen, ist die häufigste Methode zur Herstellung von Kristallen. Zu Beginn der Experimente werden die Tropfen in einem 1:1-Verhältnis von Proteinlösung zu Kristallisationslösung gemischt und in einem abgeschlossenen System durch die Platzierung auf einem Stempel oder unter dem Deckel von der Reservoirlösung räumlich getrennt. Ein Konzentrationsgradient wird aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen des Fällungsmittels in Tropfen und Reservoir aufgebaut. Das heißt, daß der Partialdruck des Wassers erhöht ist, da die Reservoirlösung im Tropfen durch die Proteinlösung verdünnt vorliegt. Daraufhin diffundiert das Wasser aus dem

vergleichsweise kleinen Tropfenvolumen, und sowohl die Konzentration der Proteinlösung als auch des Fällungsmittels werden erhöht.

Durchführung:

Zur Kristallisierung des Proteins wurden Cryschem™-Platten (sitzender Tropfen; Hampton Research, Riverside, CA, USA) verwendet. Im Reservoirbehälter befand sich 1 ml Kristallisationslösung, von der 1 µl mit 1 µl Protein-Lösung vermischt wurde. Die Cryschem™-Platten, die einen Stempel pro Reservoirbehälter besitzen, auf dem die Tropfen platziert werden, wurden mit lösungsmittelbeständigem Klebeband (Crystal Clear Sealing Tape, Hampton Research) abgedichtet. Die eingesetzte Proteinlösung (AmyB-Tm, ~ 8 mg/ml in 20 mM Tris-Puffer, pH 8,0) wurde scharf abzentrifugiert, um Fremdpartikel und denaturiertes Protein zu entfernen. Für die ersten Kristallisationsversuche wurden kommerzielle Screens der Firma Hampton Research (Crystal Screen I + II) mit jeweils 50 Präzipitationslösungen verwendet, zu denen DTT (Endkonzentration 2 mM) hinzupipettiert wurde. Die Präzipitationslösungen wurden dem Erfolg der Kristallisation entsprechend optimiert. Für die Kristallisation von AmyB-Tm wurde ein Ansatz mit 4 M Na-Formiat, 5 % Isopropanol und 2 mM DTT als optimal ermittelt. Alle Ansätze wurden in einer Klimakammer bei 20 °C aufbewahrt.

9.2. Kontrolle der Kristallisationsansätze

Mit Hilfe eines Leica MZ125-Stereomikroskops wurden die Ansätze in regelmäßigen Abständen kontrolliert und alle Veränderungen (Präzipitation, Kristallbildung) genauestens protokolliert. Um entstandene Proteinkristalle von Salzkristallen unterscheiden zu können, wurden die Ansätze durch einen Polfilter vor dem Binokular betrachtet. Während Salzkristalle weiterhin farblos erscheinen, glühen die Proteinkristalle geradezu in leuchtend-bunten Farben. Zusätzlich war es möglich, die Proteinkristalle mit Coomassie-Lösung anzufärben, da sie durch ihre flüssigkeitsgefüllten Kanäle, im Gegensatz zu den eng gepackten Salzkristallen, organische Farbstoffe einlagern können. Außerdem wurden einzelne Kristalle mit Hilfe einer Nylonschleife aus dem Kristallisationsansatz entfernt, in einem kleinen Volumen H₂O gelöst und durch SDS-PAGE kontrolliert.

9.3. Kryo-Konservierung und Montage der Kristalle zur Datensammlung

Die Analyse der Kristalle im Röntgenstrahl findet bei tiefen Temperaturen (100 K) statt. Dadurch wird die Diffusion freier Hydroxylradikale, die innerhalb des Kristalls durch Absorption der Strahlen entstehen, stark vermindert. Hydroxylradikale führen zu Schäden im Kristallgitter und bewirken damit eine Verschlechterung der Diffraktionseigenschaften. Um die Kristalle tiefzukühlen, ist ein Frostschutzmittel (Kryoprotektant) nötig, das das in den Kristallen vorhandene Wasser, das Kanäle und große Zwischenräume füllt, verdrängt. Ein Tiefkühlen der Kristalle ohne Frostschutzmittel würde in den meisten Fällen zur Eisbildung innerhalb des Kristalls und damit zu seiner mechanischen Zerstörung führen. Neben der Möglichkeit, größere Datenmengen eines einzelnen Kristalls durch Reduzierung der Strahlungsschäden aufnehmen zu können, und der Unterdrückung des Hintergrundrauschens durch Reduzierung der Streustrahlung, bietet das Tiefkühlen von Kristallen zusätzlich den Vorteil einer einfacheren Handhabung und Lagerung in flüssigen Stickstoff.

Durchführung:

Mit einer Nylonschlaufe (0,05-1 mm Durchmesser), die bereits für die Montage in der *beamline* auf einem Stab mit Magnetkappe befestigt ist, wurde ein AmyB-Tm-Kristall aus dem Kristallisationsansatz gehoben und in frischer Präzipitationslösung (4 M Na-Formiat, 5 % Isopropanol 2 mM DTT) mit dem Zusatz von 30 % PEG 200 als Kryoprotektant geschwenkt. Der Kristall wurde dann aus dem Kryopuffer in ein Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff überführt, wo dieser samt dem ihn umgebenden Film von Kryopuffer gefror. Unter flüssigem Stickstoff wurde die Nylonschlaufe luftblasenfrei in ein spezielles Plastikgefäß für den Transport verpackt. Im Laufe der Messungen stellte sich heraus, daß für die AmyB-Tm-Kristalle ein spezielles Frostschutzmittel unnötig war, so daß bei späteren Datenerhebungen auf den Zusatz von PEG 200 verzichtet wurde, und die Kristalle direkt aus dem Kristallisationsansatz tiefgefroren wurden.

9.4. Datenerhebung

Die Kriterien für die Streuungsqualität eines Kristalls im Röntgenstrahl sind die Auflösung, die Form der Streupunkte auf dem Detektor (*spot shape*) und die Mosazität, d. h. der Winkelgrad, der durchstrichen werden muß, um einen Spot komplett aufzunehmen, idealerweise 0,3-0,5°. Für AmyB-Tm waren diese Bedingungen bei den in 4 M Na-Formiat, 5 % Isopropanol und 2 mM DTT gewachsenen Kristallen mit einer Auflösung von 2-2,3 Å und einer Mosazität von 0,9° erfüllt. Standardmäßig wurden pro Datensatz 100-120 Bilder mit

einer Drehung von je 1° erhoben. Die Datenerhebung erfolgte an einer PSF beamline BL2 der Berliner Elektronen-Speicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung m.b.H (BESSY) in Berlin.

III. Experimente und Ergebnisse

1. Computergestützte Analysen der Sequenz des *amyB-Tm*-Gens und der Aminosäure-Sequenz von AmyB-Tm

1.1. Überprüfung des intragenischen Stopcodons

Thermotoga maritima war 1999 einer der ersten Organismen, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Nelson *et al.*, 1999). Der ORF *tm1438*, der dem in dieser Arbeit untersuchten Gen *amyB-Tm* entspricht, wurde im Zuge dieser Genomsequenzierung als hypothetisches Protein mit einem ‚authentischen *frameshift*‘ bezeichnet. Grund hierfür ist ein TAA-Stopcodon an Position 526 der Nukleotidsequenz, das den offenen Leserahmen unterbricht. Danach setzt sich die Sequenz im gleichen Leserahmen bis zu einem TGA-Stopcodon an Position 1585 fort. In der ERGO Datenbank (<http://gl-ergo.migen.bio.uni-goettingen.de/>) wird *amyB-Tm* aufgrund dieses Stopcodons als zwei getrennte ORFs dargestellt, *RTM02682* und *RTM02657*, wobei der zweite ORF in einem alternativen Leserahmen mit einem ATG-Codon an Position 555 beginnt. Das von Fütterer (2001) klonierte, komplette, 1587 bp große *amyB-Tm*-Gen führte bei der Expression in *E. coli* zu einem etwa 63 kDa großen Produkt, wie es bei der Translation des vollständigen *tm1438* ORFs (528 Aminosäuren) zu erwarten ist.

Aufgrund der beschriebenen Ungereimtheiten wurde das Insert des von Fütterer (2001) erstellten Plasmids pET24c::AB mit besonderem Augenmerk auf das Stopcodon sequenziert. Ebenso sequenziert wurde der *amyB-Tm* entsprechende Abschnitt des Plasmids pTAA31, das Teil einer *T. maritima* Genbank ist (W. Liebl, persönliche Mitteilung; siehe Fütterer, 2001) und aus dem das Insert von pET24c::AB amplifiziert wurde. In keiner der Sequenzen konnte das von Nelson *et al.* (1999) postulierte Stopcodon gefunden werden. Insgesamt wurden in der Umgebung des hypothetischen Stopcodons vier Abweichungen von der veröffentlichten Gensequenz festgestellt (Abb. 5).

| | | | | | | | | | | |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|-----|
| <i>amyB-Tm</i> | 508 | tac | gaa | aag | cac | atg | aag | aaa | cac | 531 |
| <i>tm1438</i> | 508 | tac | gct | aag | cac | atg | acg | taa | cac | 531 |

Abb. 5: Vergleich der Nukleotidsequenzen von *amyB-Tm* und dem veröffentlichten ORF *tm1438*. Die Numerierung der Basen beginnt mit der ersten Base des Startcodons. Abweichungen sind grau hinterlegt, das postulierte Stopcodon ist fett gedruckt.

Die Abweichungen, die alle die Base Adenin betreffen, sind authentisch und wurden bei der Sequenzierung nicht durch eine Überlagerung des Fluoreszenzsignals anderer Basen durch das Adeninsignal verursacht (Abb. 6).

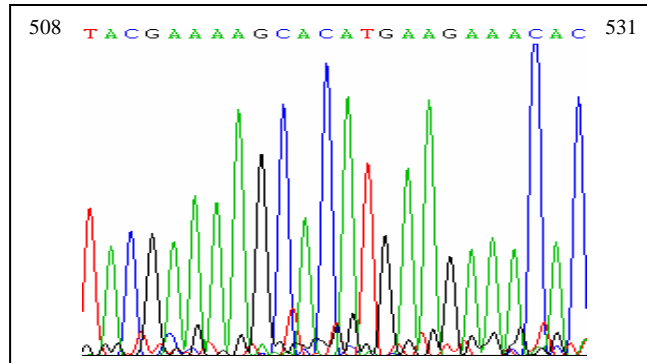


Abb. 6: Tracefile der Sequenzierung des Plasmids pTAA31 im Bereich des Stopcodons mit dem Primer *amyB_ctrl_rev*.

Die identifizierten Abweichungen in der Nukleotidsequenz ergeben drei Veränderungen in der abgeleiteten Aminosäuresequenz, die durch die spätere Strukturaufklärung des AmyB-Tm-Proteins (s. III.7) bestätigt werden konnten (Abb. 7). Alle folgenden Erwähnungen der *amyB-Tm*-Sequenz beziehen sich auf die korrigierte Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz.

| | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| AmyB-Tm | 170 | Y | E | K | H | M | K | K | H | P | R | 179 |
| Tm1438 | 170 | Y | A | K | H | M | T | * | H | P | R | 179 |

Abb. 7: Vergleich der Aminosäuresequenz von AmyB-Tm und dem veröffentlichten Protein TM1438. Abweichungen sind grau unterlegt, das Stopcodon ist mit einem Platzhalter (*) bezeichnet. Die Numerierung der Aminosäuren beginnt mit dem durch das Startcodon kodierten Methionin.

1.2. Datenbankabgleiche

Mit der 528 Aminosäuren umfassenden Proteinsequenz von AmyB-Tm wurde eine Datenbanksuche mit dem BlastP Algorithmus (BLAST P 2.2.1, Altschul *et al.*, 1997, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) durchgeführt. Dabei ergab sich für große Teile der Sequenz eine signifikante Ähnlichkeit ($e\text{-value} \leq 1e\text{-}30$) zur Glykosidhydrolase-Familie (GHF) 57 und zur COG1543-Domäne, sowie eine geringe Ähnlichkeit zur COG1449-Domäne. Die GHF 57 (= Pfam03065) ist sehr divers und umfaßt Amylasen, Pullulanasen und Glukanotransferasen, unter anderem eine α -Glukanotransferase aus *Thermococcus litoralis* (Jeon *et al.*, 1997), die sowohl biochemisch charakterisiert als auch strukturell untersucht ist.

Die COG1449-Domäne ist als α -Amylase/ α -Mannosidase Domäne annotiert. Der COG1543-Domäne konnte bisher keine Funktion zugewiesen werden (Abb. 8).

Neben den Aminosäuresequenzen, die in der COG1543 zusammengefaßt sind, zeigen auch andere Sequenzen signifikante Ähnlichkeit ($e\text{-value} \leq e\text{-30}$) zu AmyB-Tm. Insgesamt sind dies 35 Aminosäuresequenzen aus diversen Bakterien und Archaeen mit einer Sequenzidentität von 54-24 % zur Sequenz von AmyB-Tm (Tab. 6). Keines dieser Proteine wurde bisher biochemisch untersucht, und mit Ausnahme des hypothetischen Proteins aus *Clostridium acetobutylicum*, das als α -Mannosidase annotiert ist (Nolling *et al.*, 2001), und dem Protein TL2436 aus *Thermococcus kodakaraensis*, das als α -Amylase der GHF 57 annotiert ist (Fukui *et al.*, 2005), wurde bisher keinem eine Funktion zugewiesen.

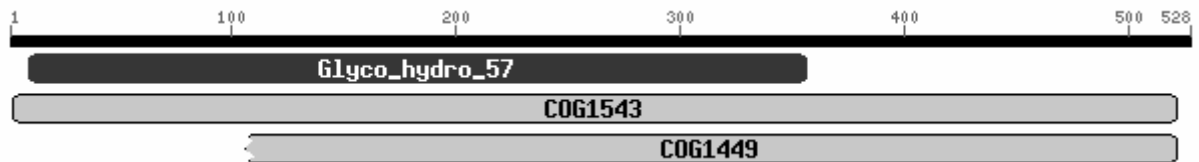


Abb. 8: Alignment der Aminosäuresequenz von AmyB-Tm zu konservierten Domänen mit dem Blast conserved domain Suchalgorithmus. Die GHF 57 Domäne ist 313 Aminosäuren lang und stimmt mit einem $e\text{-value}$ von $6e\text{-31}$ zu 97 % mit AmyB-Tm überein. Die COG1543-Domäne (504 AS) stimmt mit einem $e\text{-value}$ von $2e\text{-142}$ zu 99,2 % überein, die COG1449-Domäne (615 AS) mit einem $e\text{-value}$ von $1e\text{-6}$ nur zu 60,2 %.

Tab. 6: Herkunftsorganismen der hypothetischen Proteine, die eine signifikante Ähnlichkeit ($e\text{-value} \leq e\text{-30}$) zu AmyB-Tm aus *T. maritima* (Stand 1.3.05) aufweisen. Die Referenzen beziehen sich auf die GenBank-Einträge bzw. den Eintrag in der ERGO-Datenbank.

| Organismus | e-value | Proteinlänge | Referenz |
|--------------------------------------------|---------|--------------|-------------------------------|
| <i>Petrotoga miotherma</i> ATCC 51224 (IG) | e-148 | 526 | RPMI01414 |
| <i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421 | e-148 | 529 | gi 37523720 ref NP_927097.1 |
| <i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101 | e-147 | 527 | gi 23043733 gb ZP_00074980.1 |
| <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1 | e-146 | 529 | gi 22299517 ref NP_682764.1 |
| <i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942 | e-145 | 531 | gi 46130163 ref ZP_00164915.2 |
| <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 | e-144 | 529 | gi 16332203 ref NP_442931.1 |
| <i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102 | e-143 | 529 | gi 23130149 ref ZP_00111968.1 |
| <i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501 | e-143 | 533 | gi 53735035 ref ZP_00177036.2 |
| <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 | e-142 | 529 | gi 17229942 ref NP_486490.1 |
| <i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 | e-142 | 529 | gi 53764399 ref ZP_00160209.2 |
| <i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073 | e-132 | 528 | gi 49236719 ref ZP_00330776.1 |

Fortsetzung Tab. 6

| | | | |
|---------------------------------------------------------------------|-------|-----|-------------------------------|
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824 | e-129 | 527 | gi 15895680 ref NP_349029.1 |
| <i>Heliobacillus mobilis</i> | e-126 | 533 | RHMO03391 |
| <i>Anabaena</i> sp. PCC7120 | e-120 | 529 | RAN05394 |
| <i>Moorella thermoacetica</i> ATCC 39073 | e-114 | 582 | gi 49235034 ref ZP_00329111.1 |
| <i>Bacillus halodurans</i> C-125 | e-104 | 923 | gi 15613978 ref NP_242281.1 |
| <i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> str. CCMP1378 | 2e-97 | 527 | gi 23122900 gb ZP_00105035.1 |
| <i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> str. CCMP1986 | 7e-95 | 527 | gi 33861621 ref NP_893182.1 |
| <i>Exiguobacterium</i> sp. 255-15 | 5e-93 | 698 | gi 46113199 ref ZP_00182457.2 |
| <i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9313 | 1e-92 | 522 | gi 23131666 gb ZP_00113451.1 |
| <i>Synechococcus</i> sp. WH 8102 | 6e-91 | 522 | gi 33865263 ref NP_896822.1 |
| <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 | 4e-86 | 560 | gi 14591189 ref NP_143265.1 |
| <i>Pyrococcus abyssi</i> GE5 str. Orsay | 2e-85 | 602 | gi 14520970 ref NP_126445.1 |
| <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638 | 2e-85 | 632 | gi 18977765 ref NP_579122.1 |
| <i>Thermococcus kodakaraensis</i> | 3e-85 | 675 | gi 57641371 ref YP_183849.1 |
| <i>Treponema denticola</i> ATCC 35405 | 2e-68 | 525 | gi 42526604 ref NP_971702.1 |
| <i>Thermus thermophilus</i> HB27 | 4e-67 | 520 | gi 46199842 ref YP_005509.1 |
| <i>Thermus thermophilus</i> HB8 | 9e-66 | 520 | gi 39654909 pdb 1UFA A |
| <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> str. Nichols | 9e-60 | 526 | gi 15639349 ref NP_218798.1 |
| <i>Nocardia farcinica</i> IFM 10152 | 2e-40 | 536 | gi 54026252 ref YP_120494.1 |
| <i>Rhodococcus</i> str. I24 (IG) | 3e-38 | 647 | RRK05260 |
| <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> str. k10 | 3e-38 | 534 | gi 41409161 ref NP_961997.1 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551 | 3e-37 | 526 | gi 15842594 ref NP_337631.1 |
| <i>Mycobacterium leprae</i> | 1e-36 | 522 | gi 15827918 ref NP_302181.1 |
| <i>Chloroflexus aurantiacus</i> | 9e-31 | 485 | gi 53797817 ref ZP_00358525.1 |

1.3. Analyse der AmyB-Tm-flankierenden Region

In *T. maritima* und einigen anderen Organismen befindet sich *upstream* des Gens für das zu AmyB-Tm orthologe Protein ein konservierter Leserahmen, der für ein hypothetisches Protein mit unbekannter Funktion kodiert (COG3330). Dieses Protein weist laut ERGO-Annotationen Ähnlichkeiten zu Phosphat-Binde-Proteinen und Ferrochelatasen auf (Abb. 9). In dem Bakterium *Thermus thermophilus* HB27, das ein AmyB-Tm strukturell sehr ähnliches Protein besitzt (AmyB-Tt, s. III.9), befindet sich vor dem *amyB-Tt* ORF kein COG3330-ähnliches Protein, sondern eine Acetylglutamat-Kinase.

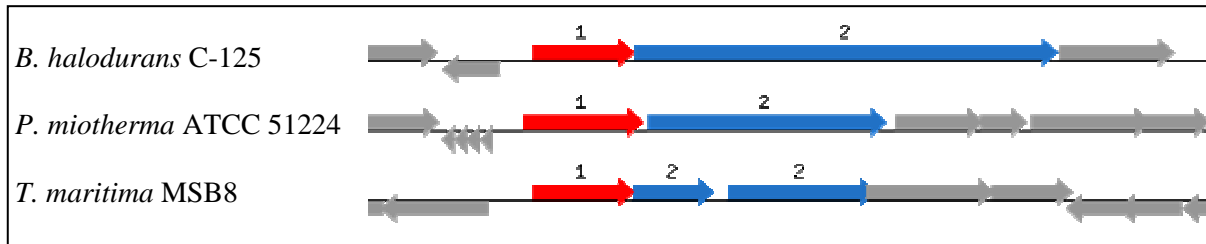


Abb. 9: ORF-Struktur der flankierenden Region um für AmyB-Tm bzw. um für AmyB-Tm-homologe Proteine kodierende Gene bei *Bacillus halodurans*, *Petrotoga miotherma* und *Thermotoga maritima*. ORF 1: RHD05335, RPMI01413 bzw. RTM00411 (Tm1439); ORF 2: RHD05336, RPMI01414 bzw. RTM02682/ 02657 (Tm1438, AmyB-Tm).

2. Rekombinante Expression und Reinigung von AmyB-Tm

2.1. Anzucht und Aufreinigung aus *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB

Zur Aufreinigung des rekombinanten Enzyms wurde eine Flüssigkultur mit einem Volumen von 2x 1,5 l aus einer Vorkultur von *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB 2 %ig beimpft und, wie unter II.3.2.1 beschrieben, kultiviert. Bei einer OD_{600} von $\sim 0,6$ wurde die Kultur mit 0,1 mM IPTG induziert und die Inkubation über Nacht fortgesetzt. Das Naßgewicht des geernteten Zellpellets betrug 4,8 g/l. Nach Resuspension in 40 ml 20 mM Tris-Puffer (pH 8,0) wurden die Zellen mit der French Pressure Cell aufgeschlossen (s. II.5.2.2). Durch eine 20minütige Hitzefällung bei 75 °C konnte ein Großteil der mesophilen *E. coli*-Proteine entfernt werden. Der hitzedenaturierte Rohextrakt wurde über Nacht gegen 20 mM Tris (pH 8,0) dialysiert und anschließend einer Anionenaustausch-Chromatographie mit einer Source 30Q-Säule unterzogen. Die Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt und ihre amylolytische Aktivität (DNSA-Test, II.7.1) überprüft. Nach gelelektrophoretischer Kontrolle der Reinheit des Proteins wurden die Fraktionen 12-14 vereinigt und gegen 20 mM Tris (pH 8,0) dialysiert. Abb. 10 zeigt das Chromatogramm des Säulenlaufs, die Parameter des Säulenlaufs sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7 : Parameter des Source 30Q-Säulenlaufs.

| Parameter | |
|-----------------|-------------------------------------------------|
| Medium: | SOURCE 30Q |
| Säule: | HR10/10 |
| Säulenvolumen: | 8,25 ml |
| Probe: | ~ 128 mg Protein |
| Puffer A: | 20 mM Tris (pH 8,0) |
| Puffer B: | 20 mM Tris (pH 8,0) + 1000 mM NaCl |
| Flußrate: | 2 ml/min |
| Fraktionsgröße: | 2 ml |
| Equilibrierung: | 3 SV Puffer B, 10 SV Puffer A |
| Gradient: | 0-100 % Puffer B (10 CV) 100 % Puffer (1 CV) |

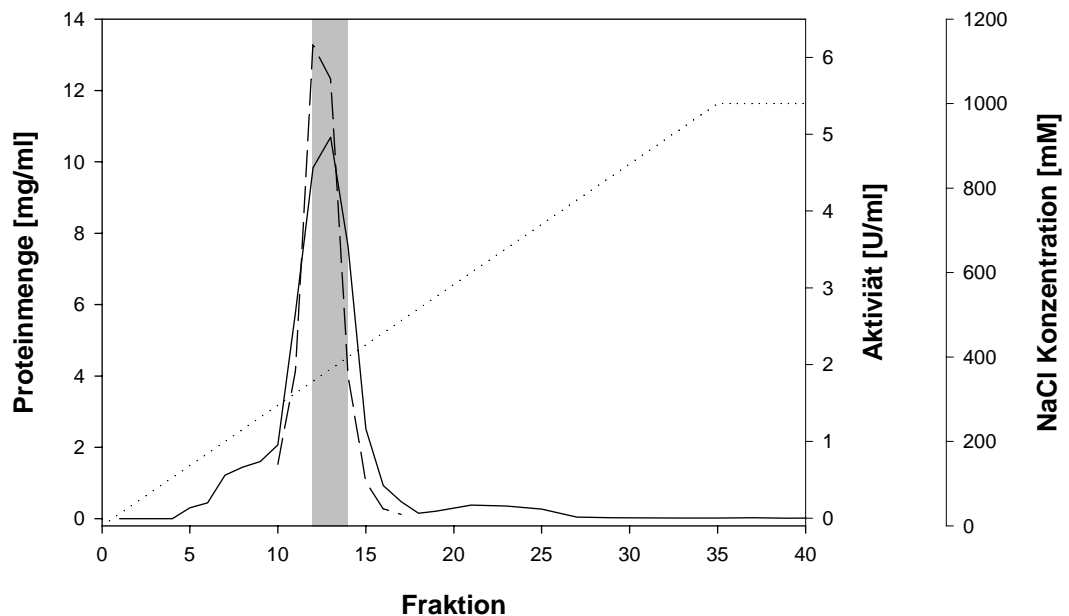


Abb. 10: Chromatogramm des Source 30Q-Säulenlaufs zur Aufreinigung des rekombinanten AmyB-Tm-Proteins. Die durchgezogene Linie stellt die Proteinkonzentration in den Fraktionen dar, die gestrichelte Linie die Aktivität und die gepunktete Linie die NaCl-Konzentration des Gradienten. Die gepoolten Fraktionen sind grau hinterlegt.

Ein Teil des über die Source 30Q gereinigten Proteins wurde einer präparativen Gelfiltration mit einer Superdex 200-Säule unterzogen, ein anderer Teil wurde einer hydrophoben Interaktionschromatographie mit einer Phenyl-Spharose Säule unterzogen. In beiden Fällen war das so gereinigte Protein inaktiv, weshalb bei weiteren Aufreinigungen von einem zweiten säulenchromatographischen Schritt abgesehen wurde. Die spezifische Aktivität des aufgereinigten AmyB-Tm-Proteins betrug 0,6 U/mg. Insgesamt wurden aus 14,3 g Zellen 72 mg reines Protein gewonnen. Die Bilanzierung der Aufreinigung erwies sich als schwierig, da offensichtlich Inhaltsstoffe des Rohextrakts, welche sich auch durch Dialyse nicht entfernen

ließen, die Aktivität von AmyB-Tm vermindern (Tab. 8). Die Aktivität des wie oben beschrieben aufgereinigten AmyB-Tm-Proteins schwankte in späteren Aufarbeitungen zwischen 0,2 und 0,6 U/mg.

Tab. 8: Bilanz der Präparation des rekombinanten AmyB-Tm-Proteins aus *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durch DNSA-Test mit löslicher Stärke für 1 h mit 50 mM Tris pH 8,0 und 10 mM DTT bei 90 °C.

| | Protein [mg] | Gesamtaktivität [U] | spezifische Aktivität [U/mg] | Anreicherungsfaktor |
|---------------------------------|-----------------|------------------------|------------------------------------|---------------------|
| Rohextrakt hitzdenaturierter | 1043,2 | 6,4 | 0,01 | 1 |
| Rohextrakt | 127,7 | 17,9 | 0,14 | 14 |
| Source 30Q Pool | 72,2 | 43,3 | 0,60 | 60 |

In Abb. 11 sind die Schritte der Aufreinigung von AmyB-Tm in einer SDS-PAGE dargestellt. Die schwache Bande oberhalb der AmyB-Tm-Bande ist authentisch. Sie ließ sich durch keinen Reinigungsversuch, d. h. auch nicht durch hydrophobe Interaktionschromatographie und Gelfiltration, von der Hauptbande trennen. Auch bei der späteren gelelektrophoretischen Kontrolle des kristallisierten Proteins trat im Gel eine Doppelbande auf (s. III.3.6).

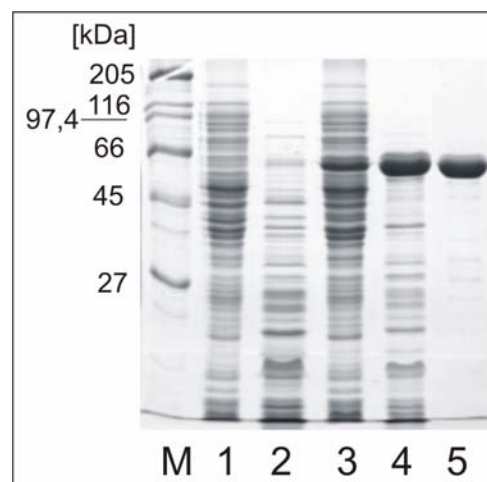


Abb. 11: SDS-PAGE-Gel der Reinigungsschritte von AmyB-Tm. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, Rohextrakt von *E. coli* BL21 (DE3) (20 µg); Spur 2, hitzdenaturierter Rohextrakt (12 µg); Spur 3, Rohextrakt von *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB (26 µl); Spur 4, hitzdenaturierter Rohextrakt (14 µg); Spur 5, Pool Source 30Q (5µg).

2.2. Expressionsexperimente

2.2.1. Semi-anaerobe Aufreinigung von AmyB-Tm

Die Aktivität von AmyB-Tm wurde durch Reduktionsmittel deutlich gesteigert (s. Fütterer, 2001 und III.3.2), was auf eine Empfindlichkeit des Enzyms gegenüber Sauerstoff schließen läßt. Um dies zu überprüfen, wurde in *E. coli* BL21/pET24c::AB exprimiertes AmyB-Tm-Protein anaerob aufgearbeitet. Dazu wurde eine zunächst aerobe Flüssigkultur im 1,3 l Maßstab in M1-Medium 2 %ig angeimpft. Nach 2 h aeroben Wachstums bei 30 °C wurde die Kultur mit 0,1 mM IPTG induziert, und der Erlenmeyerkolben mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen. Die Kultur sollte sich so durch die eigene Stoffwechselfähigkeit anaerobisieren. Die Ernte erfolgte 24 h nach der Inokulation bei einer OD₆₀₀ von 2,5. Alle Schritte der Gewinnung des hitzedenaturierten Rohextrakts wurden im Anaerobenzelt unter N₂-Atmosphäre durchgeführt. Eine Ausnahme bildeten dabei die Zentrifugationen, der Zellaufschluß und die Hitzefällung. Die Kultur wurde bei 7000 Upm 15 min zentrifugiert und das Zellpellet in 20 mM Tris-Puffer (pH 8,0) mit 3 mM DTT gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 20 mM Tris-Puffer (pH 8,0) mit 3 mM DTT aufgenommen. Der Aufschluß erfolgte mittels einer einmaligen Passage durch die French Pressure Cell (s. II.5.2.2). Das Zelllysate wurde durch eine am Auslaß der Druckzelle befestigte Kanüle in eine anaerobisierte Serumflasche geleitet, ohne mit der Umgebungsluft in Berührung zu kommen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden bei 1100 Upm abzentrifugiert und der so gewonnene Rohextrakt einer Hitzefällung der Wirtsproteine für 15 min bei 80 °C unterzogen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein Hungate-Röhrchen überführt, und dieses nach dem Verlassen des Anaerobenzeltes mit Stickstoff begast. Der Rohextrakt (15 ml) hatte eine Proteinkonzentration von 25,2 mg/ml, die Proteinkonzentration des hitzedenaturierten Rohextrakts (10 ml) betrug 1 mg/ml. Abbildung 12 zeigt die Schritte der AmyB-Tm-Anreicherung.

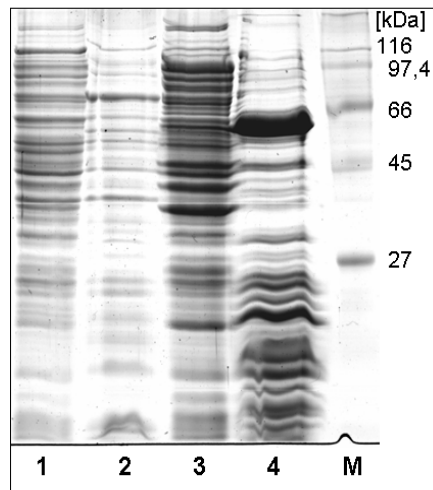


Abb. 12: SDS-PAGE Bilanz der anaeroben Aufarbeitung von AmyB-Tm. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, *E. coli* BL21 (DE3) Rohextrakt; Spur 2, hitzedenaturierter Rohextrakt (15 min, 80 °C); Spur 3, *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB anaerob gewonnener Rohextrakt; Spur 4, hitzedenaturierter, anaerob gewonnener Rohextrakt (15 min, 80 °C).

Ein Teil des so gewonnen hitzedenaturierten Rohextrakts wurde durch mehrmaliges Mischen mit der Umgebungsluft in Kontakt gebracht und aerob gelagert. Nach 6 und 30 h wurden mit dem anaeroben und den aerob gelagerten Rohextrakten Aktivitätstests (DNSA-Test, s. II.7.2) durchgeführt. Dabei konnten zwischen den Enzymaufarbeitungen keine signifikanten Unterschiede in der Aktivität mit löslicher Stärke als Substrat festgestellt werden. Die Höhe der Aktivität der anaerob gewonnenen Rohextrakte unterschied sich nicht von der Aktivität aerob aus *E. coli* BL21 (DE)/pET24c::AB gewonnener hitzedenaturierter Rohextrakte früherer Aufreinigungen (Tab. 9). Damit konnte nachgewiesen werden, daß eine anaerobe Aufarbeitung keinen positiven Einfluß auf die Aktivität von AmyB-Tm hat. Dies deckt sich mit der Beobachtung, daß auch bei mehrmonatiger Lagerung bei 4 °C kein Aktivitätsverlust von AmyB-Tm eintritt.

Tab. 9: Spezifische Aktivität hitzedenaturierter Rohextrakte aus aeroben und anaeroben Aufarbeitungen von AmyB-Tm.

| hitzedenaturierter Rohextrakt | spezifische Aktivität [U/mg] |
|----------------------------------------------|---------------------------------|
| aerobe Aufarbeitung 1 | 0,037 |
| aerobe Aufarbeitung 2 | 0,108 |
| anaerobe Aufarbeitung | 0,043 |
| anaerobe Aufarbeitung, nach 30 h | 0,049 |
| anaerobe Aufarbeitung, nach 6 h an der Luft | 0,051 |
| anaerobe Aufarbeitung, nach 30 h an der Luft | 0,064 |

2.2.2. Renaturierung von *Inclusion Bodies*

Bei der heterologen Proteinexpression mit dem Vektor pET24c::AB war stets zu beobachten, daß ein Großteil des gebildeten AmyB-Tm-Proteins in unlöslicher Form als *inclusion bodies* vorlag. Dies traf unter allen getesteten Bedingungen zu, u. a. bei der Variation der Anzuchttemperatur sowie der Induktionszeit und -stärke. Abb. 13 zeigt ein typisches Beispiel einer solchen Expression. Die hier gelelektrophoretisch analysierten Kulturen waren kurz nach der Inokulation mit 0,1 mM IPTG induziert worden und über Nacht bei 37 °C gewachsen. Um zu testen, ob das mißgefaltete Protein *in vitro* in eine lösliche und möglicherweise aktive Faltungskonformation überführt werden konnte, wurde der Versuch unternommen, die *inclusion bodies* zu renaturieren. Dazu wurde eine 30 ml Flüssigkultur 1 %ig mit *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB angeimpft, mit 0,1 mM IPTG induziert und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden, wie unter II.5.2 beschrieben, geerntet, aufgeschlossen und das *inclusion body*-Pellet nach Waschen und Inkubation in Puffer B in 5 ml Renaturierungspuffer mit 1 M Harnstoff aufgenommen. Im eigentlichen Rückfaltungsschritt, der Dialyse gegen Renaturierungspuffer ohne Harnstoff, fiel ein großer Teil der durch die Harnstoff-Zugabe in Lösung gebrachten Proteine wieder aus. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Durch SDS-PAGE-Analyse konnte gezeigt werden, daß die Mehrheit der Proteine, die zu Beginn der Renaturierung unlöslich im Pellet des Rohextrakts vorlagen, nach Entfernung des Harnstoffs aus dem Renaturierungspuffer nicht dauerhaft in Lösung blieben. Ein geringer Anteil an Protein, in erster Linie rekombinantes AmyB-Tm, konnte jedoch in eine lösliche Form überführt werden (Abb. 14). Die Proteinkonzentration des Überstands mit einem Volumen von 5 ml betrug 0,4 mg/ml. Trotz erfolgreicher Renaturierung aus *inclusion bodies* konnte bei diesem Protein keine amylolytische Aktivität gemessen werden.

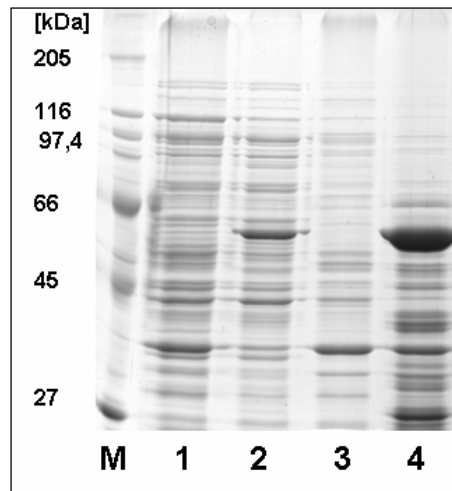


Abb. 13: SDS-PAGE-Gel der löslichen und unlöslichen Rohextrakt-Bestandteile bei heterologer Expression von AmyB-Tm. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, *E. coli* BL21 (DE3) Rohextrakt, lösliche Fraktion; Spur 2, *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB Rohextrakt, lösliche Fraktion; Spur 3, *E. coli* BL21 (DE3) Rohextrakt, unlösliche Fraktion; Spur 4, *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB Rohextrakt, unlösliche Fraktion.

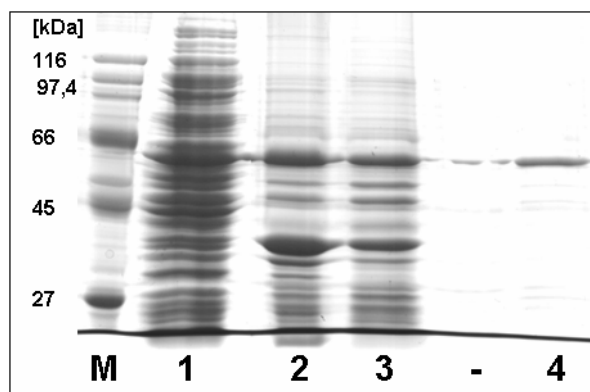


Abb. 14: SDS-PAGE Bilanz der inclusion body-Renaturierung. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, löslicher Anteil des Rohextrakts der *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB Kultur; Spur 2, unlöslicher Anteil des Rohextrakts, Spur 3, Präzipitat nach Dialyse zur Harnstoffentfernung; Spur 4, renaturiertes Protein nach der Dialyse.

2.2.3. AmyB-Tm-Expression in verschiedenen Medien

Flüssigkulturen von *E. coli* BL21(DE3)/pET24c::AB wurden in verschiedenen Mineral- und Vollmedien angezogen. Die 20 min bei 75 °C hitzedenaturierten Rohextrakte unterschieden sich im DNSA-Test nicht signifikant in ihrer amylolytischen Aktivität bei für AmyB-Tm optimalen Testbedingungen.

2.2.4. Abhängigkeit von AmyB-Tm-Aktivität und Expressionszeit

In Expressionsversuchen mit variierenden Anzuchtzeiten von *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB wurde ermittelt, daß die Aktivität des Proteins, das aus nach Induktion 4 h gewachsenen Kulturen stammte, etwa 50 % höher war als bei Protein aus 8 h gewachsenen Kulturen. Die gewonnene Menge an sauberem Protein war bei den länger inkubierten Kulturen etwa dreimal größer (Daten nicht gezeigt). Dies läßt darauf schließen, daß die Wachstumsphase der *E. coli* Zellen und die Menge des produzierten rekombinanten Enzyms einen Einfluß auf die Aktivität des AmyB-Tm-Proteins haben.

2.3. Expression in alternativen Vektorsystemen

2.3.1. Konstruktion des Plasmids pWLQ2::AB

Da die Expression von AmyB-Tm mit dem Überexpressionsvektor pET24c::AB zu großen Mengen an unlöslichem rekombinanten Enzym führte, wurde das *amyB-Tm*-Gen in einen Vektor kloniert, in dem die Expression stärker kontrolliert werden konnte. Der Vektor pWLQ2 (Liebl *et al.*, 1992) trägt das Gen *lacI^q*, welches einen Repressor des P_{tac}-Promotors kodiert, und die Expression eines in die *multiple cloning site* eingefügten Gens im nicht-induzierten Zustand verhindern soll. Der Vektor dient als Schaukel-Vektor zur Transformation von *C. glutamicum*. Zusätzlich zur stärker kontrollierten Expression in *E. coli* sollte hierbei getestet werden, ob der Wechsel des Expressionswirtes eine Aktivitätssteigerung von AmyB-Tm bewirken konnte.

Mit den spezifischen Primern *amyB_pWLQ2_for* und *amyB_pWLQ2_rev* wurde das *amyB-Tm*-Gen mit der davor liegenden Shine-Dalgarno-Sequenz des pET-Vektors aus dem Vektor pET24c::AB amplifiziert. Diese Strategie wurde gewählt, da im pWLQ2-Vektor keine Shine-Dalgarno-Sequenz vorlag. Dabei wurden eine *Sma*I-Schnittstelle am 3'-Ende und eine *Sal*I-Schnittstelle am 5'-Ende eingefügt.

PCR-Bedingungen:

| | | | |
|-----|-------|-------|-------|
| | 95 °C | 2 min | |
| 25x | ⎧ | 95 °C | 2 min |
| | | 65 °C | 1 min |
| | | 74 °C | 2 min |
| | | 74 °C | 5 min |

PCR Ansatz:

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| <i>Pfu</i> -Puffer (10x) | 5 µl |
| template DNA (pET24c::AB) | 0,2 µl |
| Primer (100 pmol/µl) | je 0,5 µl |
| dNTP-Mix (2 mM) | 5 µl |
| <i>Pfu</i> -Polymerase | 0,5 µl |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 50 µl |

Das 1832 bp lange Fragment wurde mit *SalI* und *SmaI* verdaut und direkt in den ebenfalls *SmaI/SalI* geschnittenen Vektor pWLQ2 ligiert. *E. coli* XL1-blue wurde mit dem Konstrukt transformiert und auf Selektionsplatten kultiviert. Die Überprüfung positiver Klone erfolgte durch PCR, Restriktionsanalyse und Sequenzierung. Abb. 15 zeigt eine Karte des konstruierten Vektors.

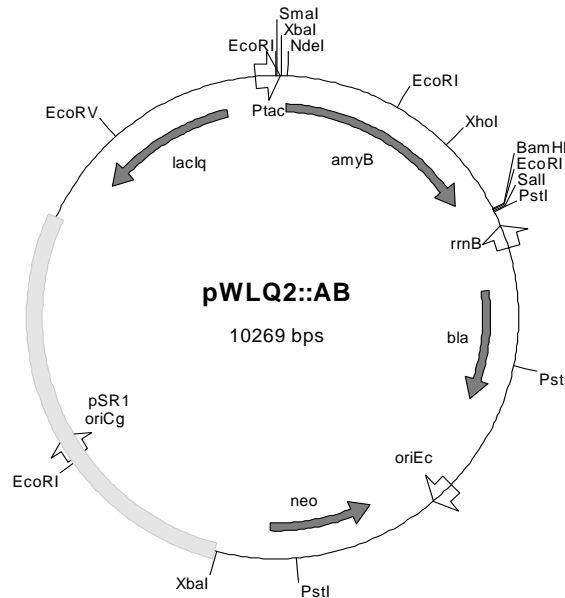


Abb. 15: Vektor pWQL2::AB

2.3.2. AmyB-Tm-Expression in pWLQ2::AB-transformierten *E. coli*-Kulturen

Zur Kontrolle der Expression wurde *E. coli* XL1-blue/pWLQ2::AB in einer 30 ml Kultur mit 0,5 mM IPTG zur Induktion über Nacht angezogen. Wie schon bei der Expression mit dem Vektor pET24c::AB lag ein Großteil des exprimierten AmyB-Tm-Proteins im Pellet vor. Außerdem war zu beobachten, daß trotz starker Expressionskontrolle des Vektors AmyB-Tm in minimalen Mengen auch ohne Induktion exprimiert wurde (Abb. 16).

Um zu testen, ob diese geringfügige Expression zu AmyB-Tm-Protein führte, das eine höhere amylytische Aktivität aufwies als das durch den Überexpressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB produzierte Enzym, wurde AmyB-Tm aus einer Flüssigkultur von *E. coli* XL1-blue/pWLQ2::AB aufgereinigt. Die Anzucht erfolgte 12 h bei 37 °C im Maßstab von 2 l. Die Zellernte und Proteinaufreinigung erfolgten in gleicher Weise wie bei der Aufreinigung aus *E. coli* BL21(DE3)/pET24c::AB durch Hitzefällung (20 min, 75 °C) und Anionenaustausch-Chromatographie mit einer Source 30Q-Säule (s. III.2.1). Das so gewonnene Protein (4 mg Protein aus 9,2 g Zellen) zeigte im Standard DNSA-Test mit löslicher Stärke (s. II. 7.1) eine Aktivität von ~0,3 U/mg und wies damit keine höhere Aktivität auf als das überexprimierte Enzym aus *E. coli* BL21(DE3)/pET24c::AB. Von

letzterem konnten 72 mg aus 14,3 g Zellen gewonnen werden konnten. Wie auch schon bei anderen Aufreinigungen erschien AmyB-Tm als Doppelbande. Die Aufreinigungsschritte sind in Abb. 17 dargestellt.

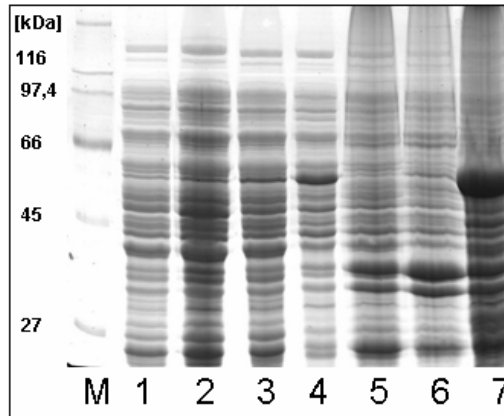


Abb. 16: SDS-PAGE-Analyse der AmyB-Tm-Expression mit dem Plasmid pWLQ2::AB bei Induktion durch 0,5 mM IPTG. M, Molekularmassenstandard; Spur 1 und 2, Rohextrakt einer *E. coli* XL1-blue/pWLQ2 Kultur (Negativkontrolle) -/+ Induktion; Spur 3 und 4, Rohextrakt einer *E. coli* XL1-blue/pWLQ2::AB Kultur -/+ Induktion; Spur 5, Pellet der Negativkontrolle ohne Induktion; Spur 6 und 7, Pellet der *E. coli* XL1-blue/pWLQ2::AB Kultur -/+ Induktion.

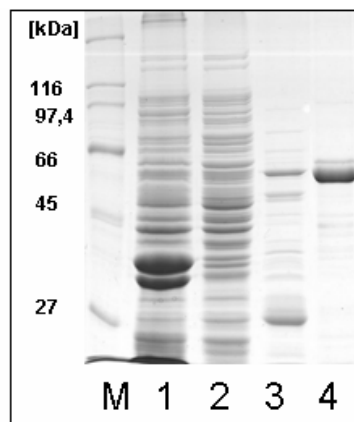


Abb. 17: SDS-PAGE-Gel der Aufreinigungsschritte von AmyB-Tm aus *E. coli* XL1-blue/pWLQ2::AB. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, Pellet; Spur 2, Rohextrakt (30 µg); Spur 3, 20 min bei 75 °C hitzedenaturierter Rohextrakt (5 µg); Spur 4, Source 30 Q Pool (5 µg).

2.3.3. AmyB-Tm-Expression in pTAA31 transformiertem *E. coli* JM83

Der Genbankvektor pTAA31 trägt die kompletten ORFs *tm1438* (*amyB-Tm*) und *tm1439* (RTM0411), sowie Teile der ORFs *tm1440* und *tm1437* (Abb. 18). Da das *amyB-Tm*-Gen sich hier im genetischen Kontext von *T. maritima* befindet, wird die Expression nicht wie in pET24c::AB oder pWLQ2::AB durch einen regulierbaren P_{tac} bzw. T7-Promotor beeinflusst. Um zu überprüfen, ob eine eventuelle Co-Expression von AmyB-Tm mit dem Protein Tm1439 zu einer Steigerung der Aktivität führt, wurde AmyB-Tm in *E. coli* JM83/pTAA31 exprimiert. Wie Abb. 19 zeigt, wird AmyB-Tm in einer in der SDS-PAGE detektierbaren Menge synthetisiert. Ob es sich bei der zweiten markierten Bande um das *tm1439*-Produkt handelt, ist unsicher.

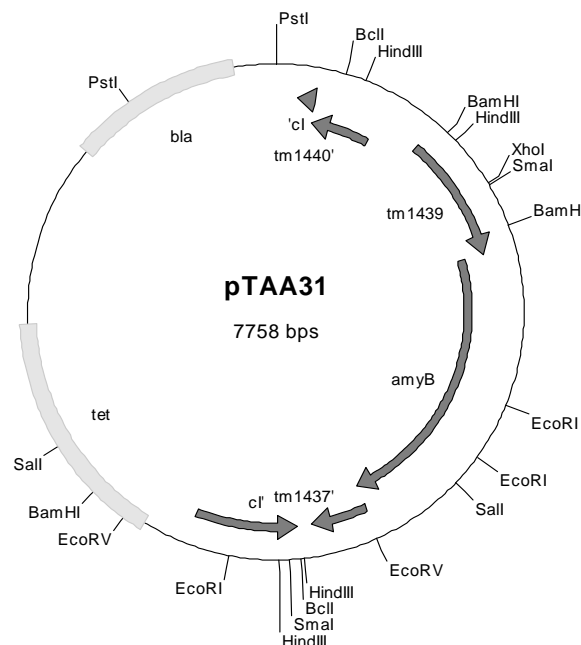


Abb. 18: Vektor pTAA31

Der hitzedenaturierte Rohextrakt von *E. coli* JM83/pTAA31 zeigte sowohl in der dünnschichtchromatographischen Analyse (Abb. 20) als auch im Standard DNSA-Test bei 90 °C mit löslicher Stärke als Substrat Aktivität. Da die amylolytische Aktivität des Zellextraktes aber nicht größer war, als in vergleichbaren *E. coli* BL21/pET24c::AB Aufarbeitungen, wurde auf eine Aufreinigung von AmyB-Tm aus *E. coli* JM83/pTAA31 verzichtet.

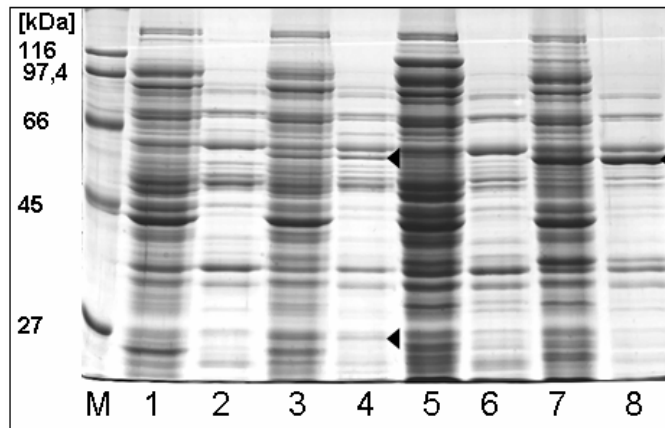


Abb. 19: SDS-PAGE-Gel der AmyB-Tm-Expression mit den Plasmiden pTAA31 und pET24c::AB. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, *E. coli* JM83 Rohextrakt; Spur 2, hitzedenaturierter Rohextrakt (20 min, 75 °C), Spur 3, *E. coli* JM83/pTAA31 Rohextrakt; Spur 4, hitzedenaturierter Rohextrakt (20 min, 75 °C); Spur 5, *E. coli* BL21 Rohextrakt; Spur 6, hitzedenaturierter Rohextrakt (20 min, 75 °C); Spur 7, *E. coli* BL21(DE3)/pET24c::AB Rohextrakt; Spur 8, hitzedenaturierter Rohextrakt (20 min, 75 °C). Die Pfeile markieren die AmyB-Tm- bzw. Tm1439-Bande im hitzedenaturierten *E. coli* JM83/pTAA31- und *E. coli* BL21(DE3)/pET24c::AB-Rohextrakt. Die *E. coli* BL21 Kulturen wurden mit 0,1 mM IPTG induziert.

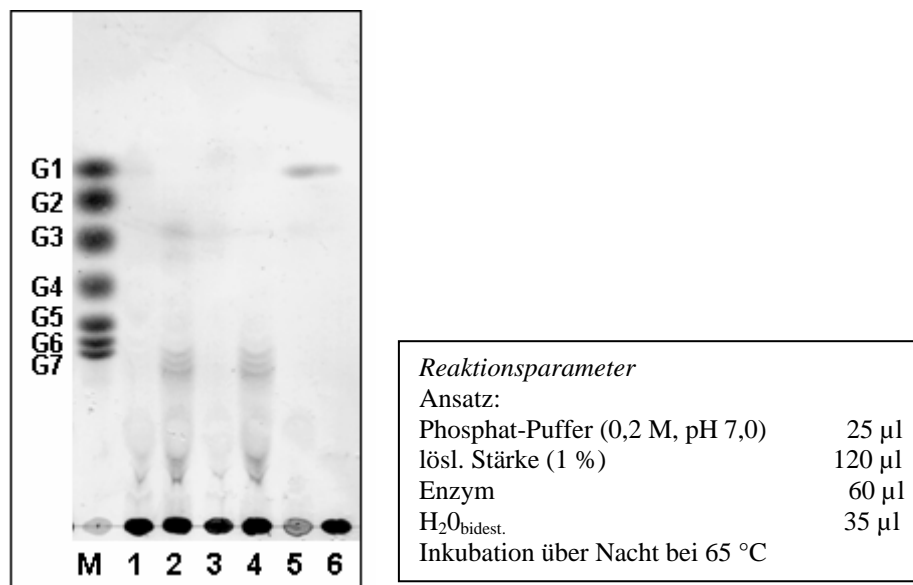


Abb. 20: Stärkeabbau durch *E. coli* JM83/pTAA31 Rohextrakte. M, Maltooligosaccharidstandard; Spur 1, *E. coli* JM83 Rohextrakt; Spur 2, *E. coli* JM83/pTAA31 Rohextrakt; Spur 3, hitzedenaturierter *E. coli* JM83 Rohextrakt (20 min, 75 °C); Spur 4, hitzedenaturierter *E. coli* JM83/pTAA31 Rohextrakt (20 min, 75 °C); Spur 5, hitzedenaturierter *E. coli* JM83/pTAA31 Rohextrakt ohne Stärke; Spur 6, Stärke ohne Zellextrakt. Es wurden 9 µl Probe aufgetragen. Lösungsmittel Aceton/H₂O/Laktat/Isopropanol (4:0,2:2:4).

2.4. Expression in *Corynebacterium glutamicum*

2.4.1. Transfer in *C. glutamicum*

Um zu prüfen, ob der Wechsel des Expressionswirts einen Einfluß auf die Aktivität von AmyB-Tm hat, wurde *C. glutamicum* mit dem Vektor pWLQ2::AB transformiert. Zunächst wurde der restriktionsdefiziente Stamm *C. glutamicum* R163 mit dem Plasmid transformiert, um das Methylierungsmuster des Vektorkonstrukts dem Methylierungsmuster von *C. glutamicum* anzupassen. Der Erfolg der Transformation wurde durch PCR und Restriktionsanalyse des isolierten Plasmids kontrolliert. Die *C. glutamicum* R163-Klone wuchsen nur langsam und eine Expression von AmyB-Tm war nicht nachzuweisen. Daher wurde das Konstrukt aus *C. glutamicum* R163 isoliert und durch Elektroporation in *C. glutamicum* DSMZ 20300 (wt) transferiert. Wieder wurde der Erfolg der Transformation durch PCR und Restriktionsanalyse überprüft.

2.4.2. Aufreinigung aus *C. glutamicum*

Zur Expression von AmyB-Tm wurde eine 1,5 l Flüssigkultur 2 %ig mit *C. glutamicum* (wt)/pWLQ2::AB aus einer Vorkultur angeimpft. Nach 10,5 h Wachstum wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,24 mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellernte durch Zentrifugation erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 3,45 nach 26,5 h Wachstum. Das Zellpellet wurde in 30 ml 20 mM Tris-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und die Suspension nach Zugabe von 10 mg/ml Lysozym für 1 h bei 37 °C inkubiert, um die Zellwand der Gram-positiven Bakterien abzubauen. Die weitere Rohextraktgewinnung durch Aufschluß mit der French Pressure Cell sowie durch Hitzedenaturierung und säulenchromatographische Aufreinigung über eine Source 30Q- Säule erfolgte wie für die Aufreinigung von AmyB-Tm aus *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB beschrieben (s. III.2.1). Wie aus Abb. 21 ersichtlich ist, lag auch bei der Expression von AmyB-Tm in *C. glutamicum* ein Großteil des Proteins in unlöslicher Form im Pellet vor. Interessanterweise zeigt sich beim gereinigten AmyB-Tm-Protein eine Doppelbande in der SDS-PAGE, wie sie auch bei den Aufreinigungen aus *E. coli* zu beobachten war. Insgesamt konnten aus 6,35 g *C. glutamicum* Zellen ~2,2 mg rekombinantes Enzym gewonnen werden. Die Aktivität im Standard-DNSA-Test mit löslicher Stärke (s. II.7.1) lag mit ~0,2 U/mg im Bereich der Aktivität des aus *E. coli* aufgereinigten AmyB-Tm-Proteins.

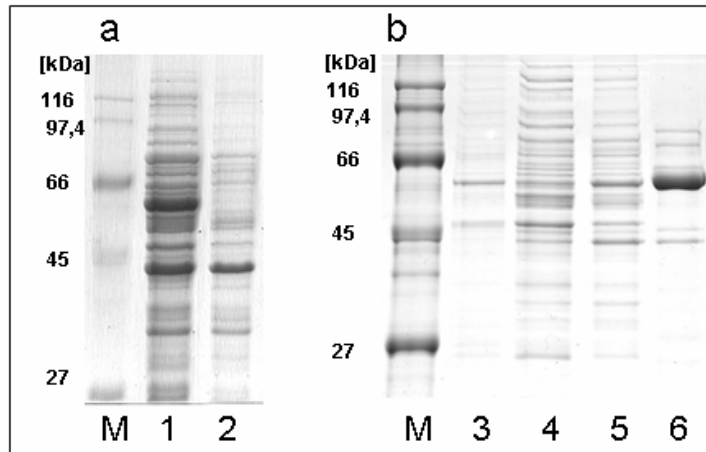


Abb. 21: Expression von AmyB-Tm in *C. glutamicum* a) im Vergleich zu einem Kontrollstamm und b) Bilanzierung der Aufreinigung. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, hitzedenaturierter Rohextrakt (20 min, 75 °C) einer *C. glutamicum* (wt)/pWLQ2::AB-Kultur (10 µg); Spur 2, hitzedenaturierter Rohextrakt einer *C. glutamicum* (wt)/pWLQ2-Kultur (Negativkontrolle) (10 µg); Spur 3, Pellet einer *C. glutamicum* (wt)/pWLQ2::AB Kultur; Spur 4, Rohextrakt (8 µg); Spur 5, hitzedenaturierter Rohextrakt (5 µg); Source 30Q-Fraktion (8 µg).

3. Biochemische Charakterisierung von AmyB-Tm

3.1. Allgemeine Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität

3.1.1. Aktivität von AmyB-Tm mit pNP-Substraten

Bei Tests mit p-Nitrophenyl(pNP)-Substraten zeigt AmyB-Tm eine niedrige Aktivität. Interessanterweise war diese im Gegensatz zu den DNSA-Tests im Phosphat-Puffer etwa dreimal höher als im Tris-Puffer. Da sich die Substrate bei längerer Erhitzung auf 90 °C als instabil erwiesen, wurde der Test über einen Zeitraum von 25 min durchgeführt. Es konnte keine klare Präferenz des Enzyms für eines der getesteten pNP-Glykoside festgestellt werden (Abb. 22).

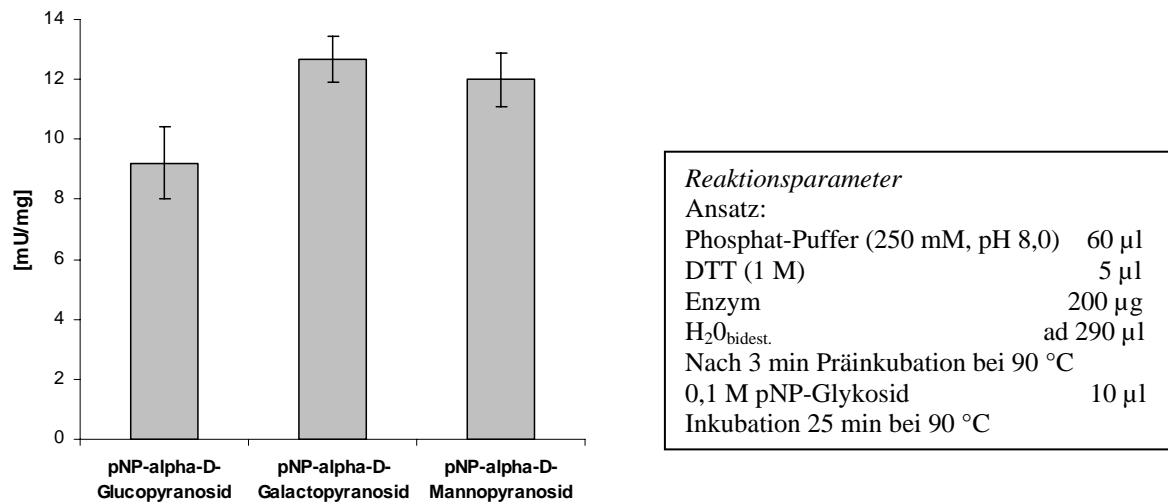


Abb. 22: Aktivität von AmyB-Tm mit pNP-Substraten.

3.1.2. Enzymkinetik

Da die Aktivität von AmyB-Tm mit den definierten pNP-Substraten nur sehr gering war, erfolgte die Ermittlung der Enzymkinetik im DNSA-Test mit löslicher Stärke als Substrat (s. II.7.1). Bei Stärke handelt es sich um ein heterogenes Polymer, bei dem sich der Polymerisierungsgrad der Moleküle, der nach Herkunft und Aufarbeitung der Stärke variiert, nur schwer abschätzen lässt. Daher beziehen sich die Substratkonzentrationsangaben nicht auf ein molares Verhältnis, sondern werden in mg/ml angegeben. Die Hydrolyse der Stärke durch AmyB-Tm gehorcht einer Michealis-Menten Kinetik (Abb. 23). Aus der Steigung der Geraden in der doppeltreziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk ließen sich für AmyB-Tm ein K_m -Wert von 1,1 mg/ml und ein V_{max} -Wert von 1,3 U/mg berechnen.

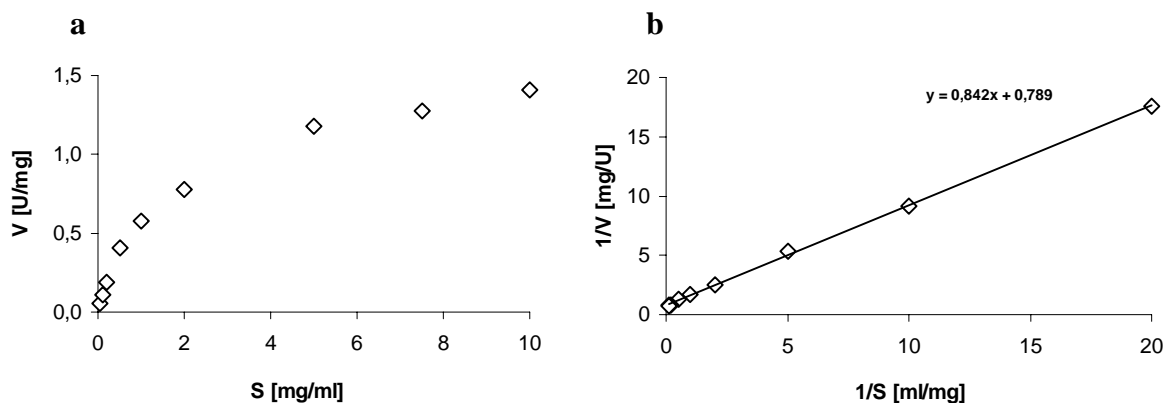


Abb. 23: Darstellung der Kinetik von AmyB-Tm nach a) Michaelis-Menten und b) Lineweaver-Burk. Die Ermittlung der Werte erfolgte im Standard DNSA-Ansatz mit löslicher Stärke in der Konzentration 0,05-10 mg/ml. Die Inkubationszeit betrug 30 min, es wurden 22 μ g Enzym eingesetzt.

3.1.3. Untersuchungen zur Beteiligung von AmyB-Tm am Glykogenstoffwechsel

Durch die cytoplasmatische Lokalisierung des Enzyms und die Aktivität mit Maltooligosacchariden und Stärke als Substraten wurde vermutet, daß AmyB-Tm am Glykogenstoffwechsel von *T. maritima* beteiligt ist. Das entscheidende Enzym des Glykogenabbaus ist die Glykogen-Phosphorylase, die die phosphorolytische Spaltung von Glykogen_x zu Glykogen_{x-1} und Glukose-1-Phosphat katalysiert. In dünnschichtchromatographischen Analysen konnte in Gegenwart von K-Phosphat und Pyridoxalphosphat keine Bildung von Glukose-1-Phosphat aus Maltooligosacchariden oder Stärke beobachtet werden (ohne Abbildung). Ebenso ließ sich in der Umkehrung der *in vitro* frei reversiblen Phosphatase-Reaktion keine gesteigerte Kettenverlängerung von Maltose oder Maltohexaose in Gegenwart von PLP und cAMP oder Glukose-1-Phosphat beobachten (ohne Abbildung). AmyB-Tm zeigte vielmehr in allen Ansätzen mit Maltohexaose als Substrat Transferase-Aktivität (Abb. 24). Um zu überprüfen, ob AmyB-Tm eventuell als Glykogensynthase am Glykogenstoffwechsel beteiligt ist, wurde getestet, ob UDP-Glukose und ADP-Glukose, die bei der Reaktion von Glykogen_x zu Glykogen_{x+1} als Glykosyl-Donor wirken, von AmyB-Tm bei der Kettenverlängerung von Maltooligosacchariden als Substrat dienen können. In der dünnschichtchromatographischen Analyse konnte jedoch im Phosphat-Puffer weder eine Spaltung der aktivierten Zucker noch eine Kettenverlängerung von Maltopentaose festgestellt werden (ohne Abbildung).

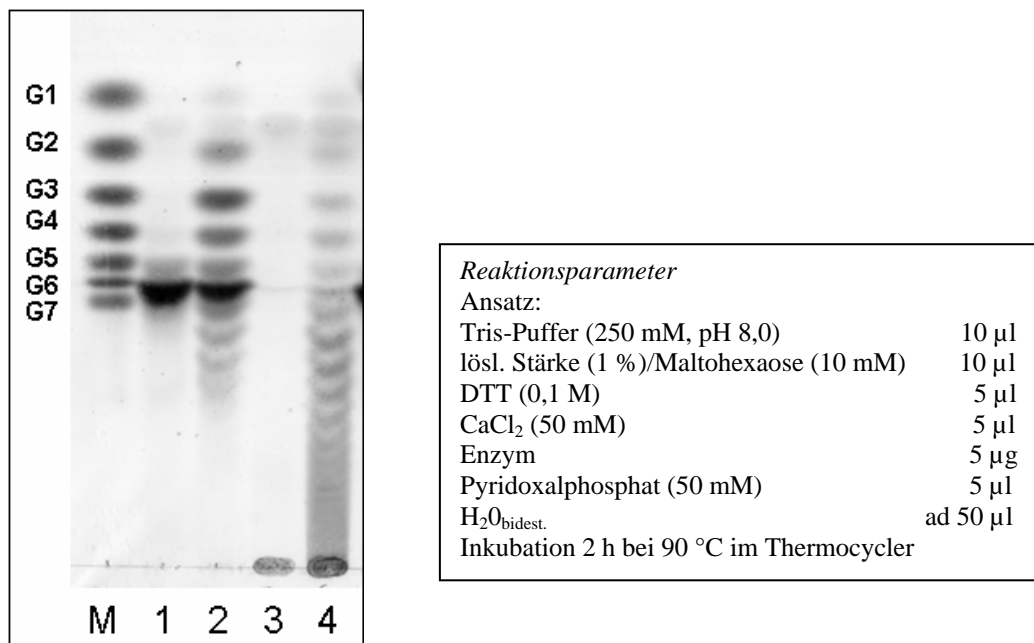


Abb. 24: Transferase-Aktivität mit Maltohexaose und Abbau von Stärke. M, Maltooligosaccharidstandard; Spur 1 und 2, Maltohexaose -/+ AmyB-Tm; Spur 3 und 4, Stärke -/+ AmyB-Tm. Es wurden 9 µl Probe auf die DC aufgetragen. Laufmittel 1-Propanol/Ethylacetat/H₂O (6:1:3).

3.1.4. Hemmung durch Acarbose

Acarbose dient bei der Kristallisation vieler amylytischer Enzyme als Substratanalogon. Das Pseudotetrasaccharid bindet im aktiven Zentrum, wird dort i. d. R. aber nicht abgebaut. Durch die Lokalisation in der Struktur können so Hinweise auf die Substratbindung im aktiven Zentrum gewonnen werden. In der dünnschichtchromatographischen Analyse konnte kein Abbau von Acarbose durch AmyB-Tm festgestellt werden. Im DNSA-Test (s. II.7.1) zeigte sich bei Anwesenheit von Acarbose eine deutliche Hemmung des Abbaus von löslicher Stärke durch das Enzym (Abb. 25). Die Inhibitor konstante K_i für Acarbose liegt bei geschätzten $2 \mu\text{M}$. Acarbose scheint somit auch für die Co-Kristallisation mit AmyB-Tm als Substratanalogon geeignet zu sein.

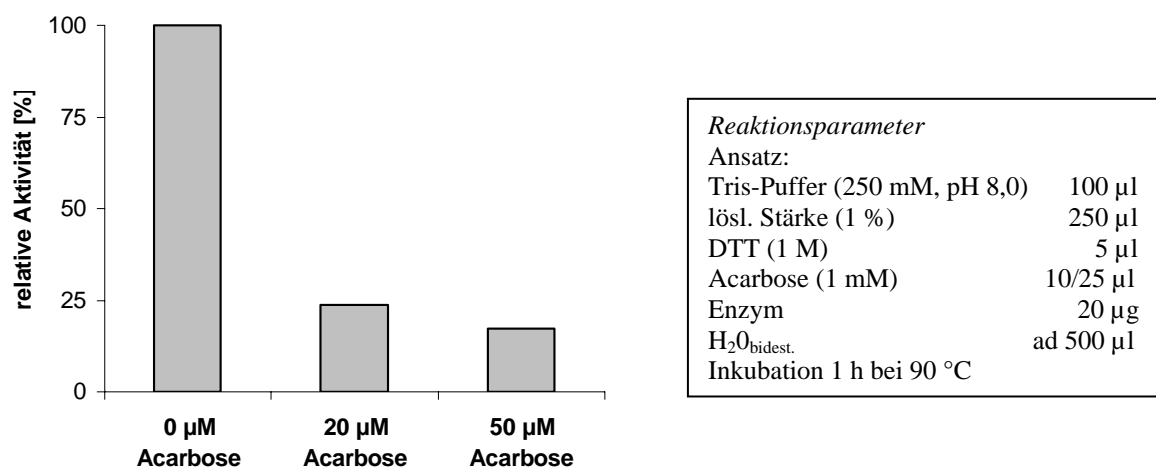


Abb. 25: Hemmung von AmyB-Tm durch Acarbose. Dargestellt sind die relativen Aktivitäten, bezogen auf den Meßwert ohne Zusatz von Acarbose. Alle Messungen wurden als Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

3.2. Einfluß von reduzierenden Agenzien

Wie bereits von Fütterer (2001) festgestellt wurde, steigert DTT die Aktivität von AmyB-Tm. Um im DNSA-Test (s. II.7.1) zu prüfen, ob die Aktivität spezifisch durch DTT oder auch durch andere reduzierende Agenzien positiv beeinflusst wird, wurden L-Cystein, DTT, und β -Mercaptoethanol in variierender Konzentration zu den Reaktionsansätzen hinzugegeben. Alle drei Reduktionsmittel bewirkten eine erhebliche Steigerung der Aktivität, was darauf schließen läßt, daß die Aktivität von AmyB-Tm allgemein vom Redoxzustand des Reaktionsansatzes abhängt (Abb. 26). Die höchste Aktivitätssteigerung auf über 300 % war bei der Zugabe von 10 mM DTT zu beobachten. Während superoptimale Konzentrationen

von DTT und β -Mercaptoethanol die Enzymaktivität nicht inhibierten, konnte für L-Cystein in geringen Konzentrationen eine Aktivitätssteigerung, bei Konzentrationen über 20 mM jedoch eine Hemmung der Aktivität beobachtet werden.

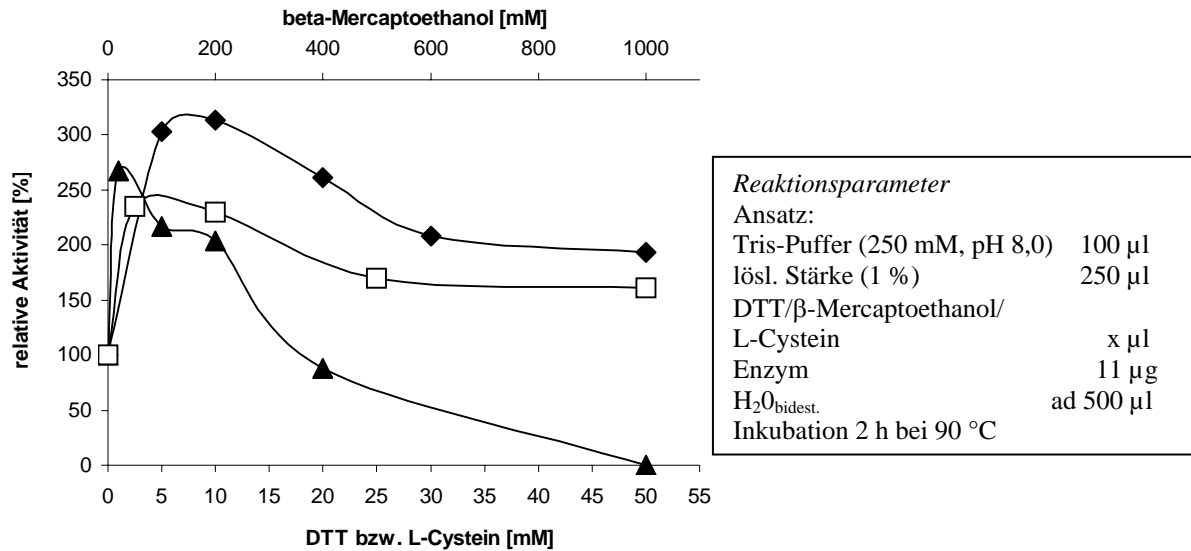


Abb. 26: Einfluß von Reduktionsmitteln auf die Aktivität von AmyB-Tm. Zum Reaktionsansatz wurden 0-50 mM DTT (schwarze Rauten), 0-1000 mM β -Mercaptoethanol (weiße Quadrate) und 0-50 mM L-Cystein (schwarze Dreiecke) hinzugegeben. Dargestellt sind die relativen Aktivitäten, jeweils bezogen auf den Meßwert ohne Zusatz von Reduktionsmittel. Alle Messungen wurden als Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

Bei längerer Inkubation des Enzyms mit DTT bildete sich ein grün-schwarzer Niederschlag. Bei diesem handelte es sich jedoch nicht um denaturiertes Protein. AmyB-Tm wurde bei 90 °C über 4 h mit 50 mM DTT (kein Substrat, 50 mM Tris-Puffer, pH 8,0) inkubiert, ohne daß sich eine Abnahme der Proteinkonzentration mit dem Bradfordtest (s. II.5.1.1) nachweisen ließ (ohne Abbildung).

Bei der Inkubation von AmyB-Tm in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 8,0) mit 20 mM DTT bei 90 °C entwickelte sich eine Gelbfärbung des Ansatzes, die beinahe exponentiell anstieg. Kontrollen ohne DTT sowie ohne Enzym zeigten keine Verfärbung (Abb. 27). Der gelbe Farbstoff blieb bei einer dünnschichtchromatographischen Analyse nicht an der Auftragslinie liegen, sondern wanderte mit dem Laufmittel 1-Propanol/Ethylacetat/H₂O (6:1:3) durch das Kieselgel. Dies deutet darauf hin, daß die farbige Substanz nicht fest mit dem Protein verbunden ist, welches in der Dünnschichtchromatographie nicht wandert.

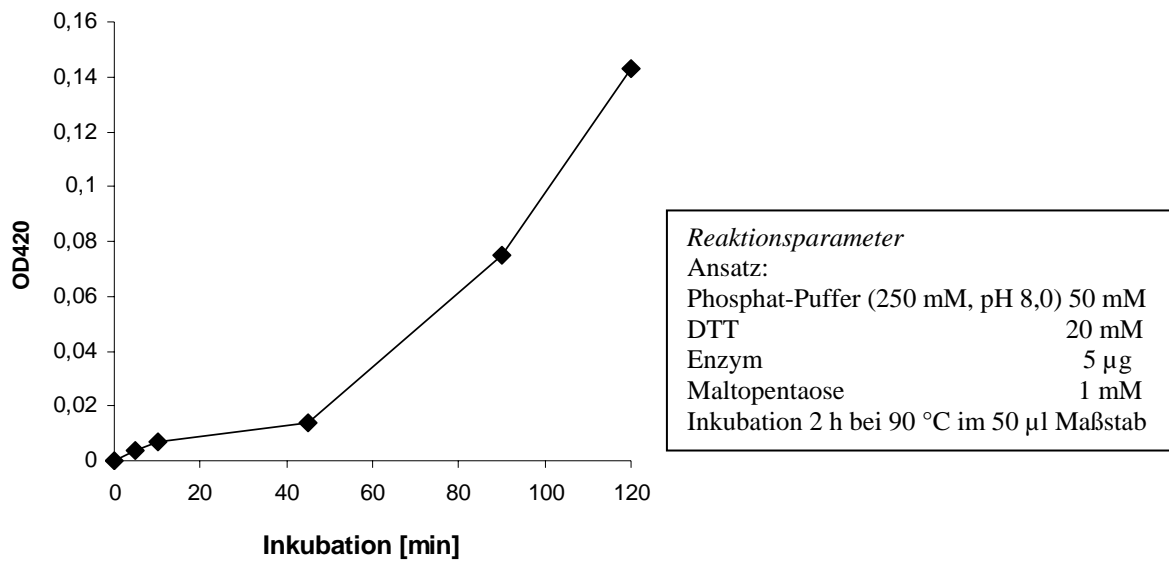


Abb. 27: Zunahme der Absorption bei 420 nm bei Inkubation von AmyB-Tm mit DTT.

Eine Verfärbung konnte auch bei der Inkubation der AmyBCys186-Mutante (s. III.8) mit DTT beobachtet werden. Beim AmyB-Tm-ähnlichen Protein aus *T. thermophilus* (AmyB-Tt) trat sie dagegen nicht auf (s. III.9). Abb. 28 zeigt Wellenlängenspektren der Proteine AmyB-Tm, AmyBCys186 und AmyB-Tt sowie BSA als Kontrolle nach Inkubation mit und ohne 20 mM DTT. Die Proteine wurden zunächst im 50 µl Maßstab in einem PCR-Gerät mit 20 mM DTT in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 8,0) inkubiert. Nach 2 h wurde der Ansatz mit Phosphat-Puffer, der 20 mM DTT enthielt, auf ein Volumen von 200 µl gebracht und im Zweistrahlphotometer (CARY 100 conc, Varian) die Absorption der Proben im Bereich 250-600 nm gemessen.

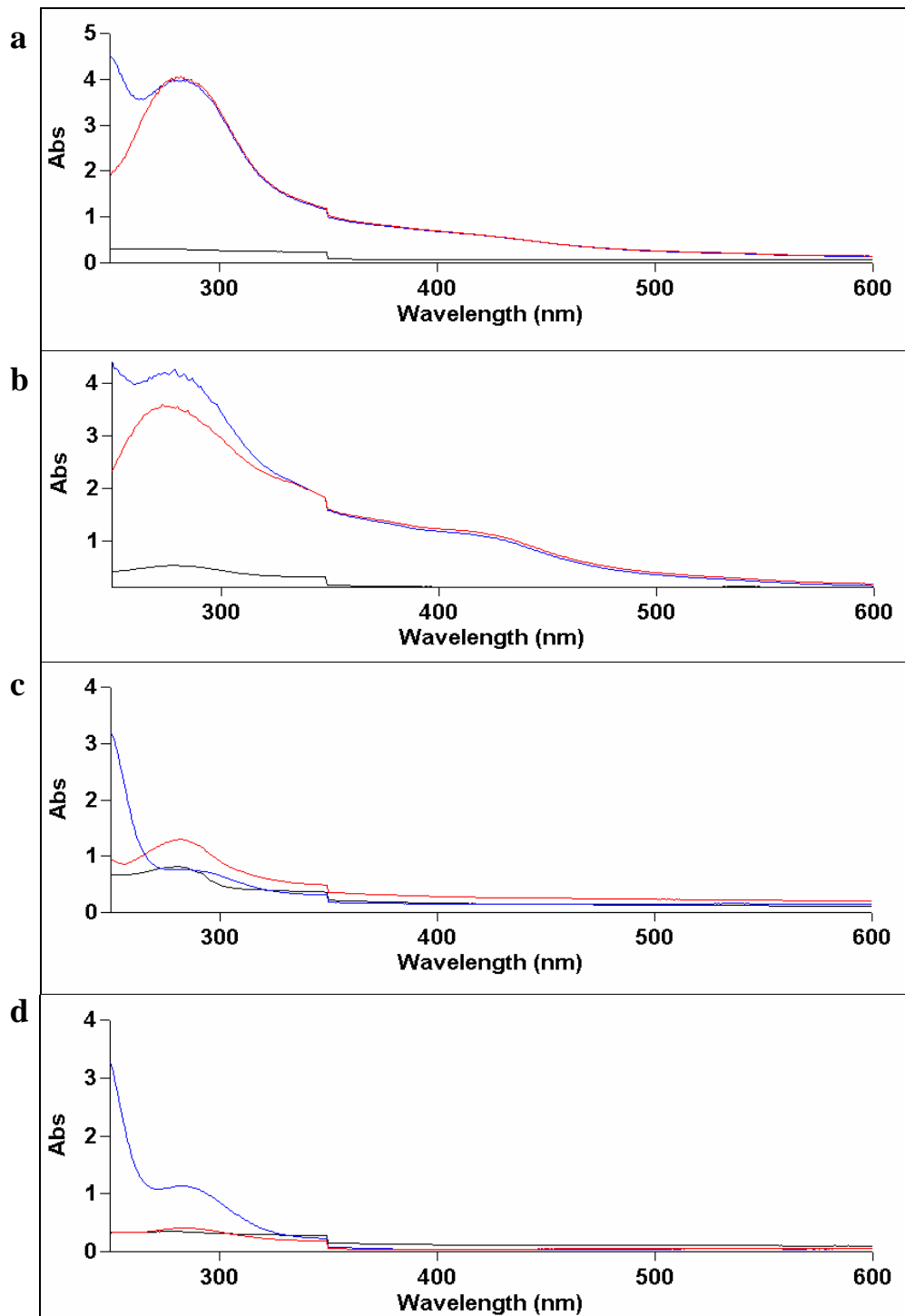


Abb. 28: Wellenlängenscans von a) AmyB-Tm (Endkonzentration 25 $\mu\text{g/ml}$), b) AmyBCys186 (25 $\mu\text{g/ml}$), c) AmyB-Tt (250 $\mu\text{g/ml}$) und d) BSA (50 $\mu\text{g/ml}$) nach Inkubation mit und ohne 20 mM DTT. Blaue Linie, Puffer + Enzym + DTT gemessen gegen Puffer - Enzym + DTT; rote Linie, Puffer + Enzym + DTT gemessen gegen Puffer - Enzym - DTT; schwarze Linie, Puffer + Enzym - DTT gemessen gegen Puffer - Enzym - DTT.

3.3. Einfluß komplexierender Agenzien und Metallionen

Die Aktivität von AmyB-Tm mit löslicher Stärke als Substrat wird durch ATP in physiologischen Konzentrationen signifikant herabgesetzt (Fütterer, 2001). Die gleiche inhibitorische Wirkung wurde auch für GTP beobachtet (Abb. 29). Die Hemmung von AmyB-Tm durch ATP ist also nicht spezifisch, sondern ein Effekt des Zusatzes von Nucleotidtriphosphaten im Allgemeinen.

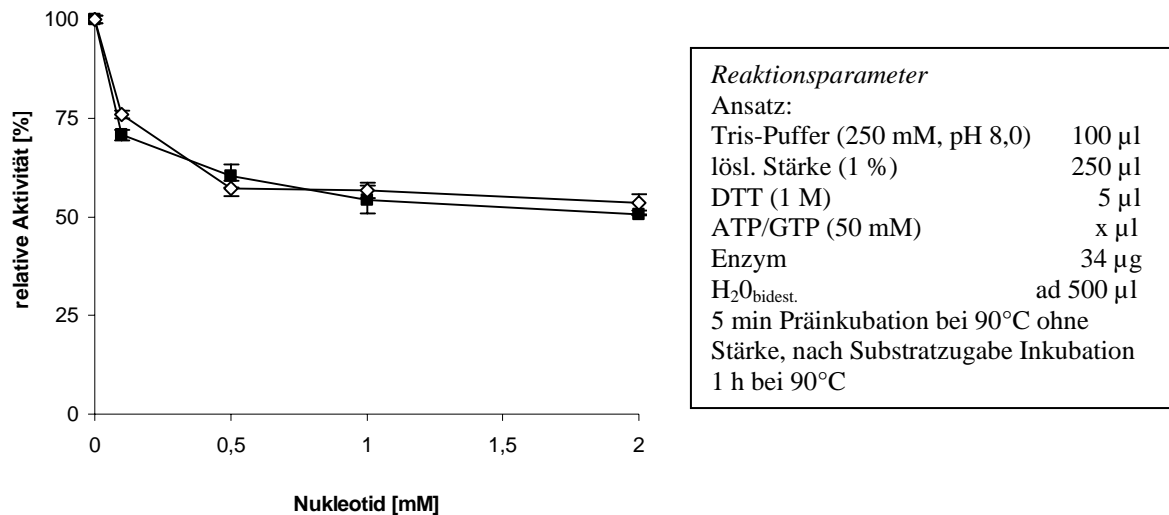


Abb. 29: Einfluß von ATP (schwarze Quadrate) und GTP (weiße Rauten) auf die Aktivität von AmyB-Tm. Dargestellt ist die relative Aktivität, bezogen auf den höchsten Meßwert der Versuchsreihe. Alle Messungen wurden als Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

Neben ATP konnte auch für ADP und AMP eine hemmende Wirkung festgestellt werden. Diese Nucleotide haben eine schwache komplexierende Wirkung auf zweiwertige Metallionen, die abhängig ist von der Zahl ihrer Phosphatreste. Die Stärke der Aktivitätssenkung durch die Nucleotide wurde ins Verhältnis gesetzt zu ihrer Komplexierungskraft, ausgedrückt durch die Dissoziationskonstante pK_d (Tab. 10). Die Abhängigkeit der Hemmung der Enzymaktivität von der Komplexierungswirkung der getesteten Substanzen deutet darauf hin, daß die beobachtete Hemmung von AmyB-Tm durch ATP, ADP und AMP auf deren komplexierender Wirkung und nicht auf einer spezifischen allosterischen Regulation beruht. Als biochemischer Nachweis des Komplexierungseffekts der Nucleotide wurde versucht, die herabgesetzte Aktivität durch Zugabe von Metall-Ionen zu rekonstituieren (Abb. 30).

Tab. 10: Korrelation von Aktivitätshemmung und Dissoziationskonstante einiger auf AmyB-Tm hemmend wirkender Substanzen. Die pK_d -Werte, die sich auf die Komplexierung von Ca^{2+} beziehen, wurden der MaxChelator Webseite entnommen (Patton *et al.*, 2004). (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>)

| Substanz | Restaktivität von AmyB-Tm [%] | pK_d |
|---------------------------|-------------------------------|--------|
| ATP 1 mM | 37 | 3,8 |
| ADP 1 mM | 42 | 2,9 |
| AMP 5 mM (Fütterer, 2001) | 82 | 1,8 |
| EDTA 1 mM | nicht detektierbar | 10,7 |
| EGTA 1 mM | nicht detektierbar | 11,0 |

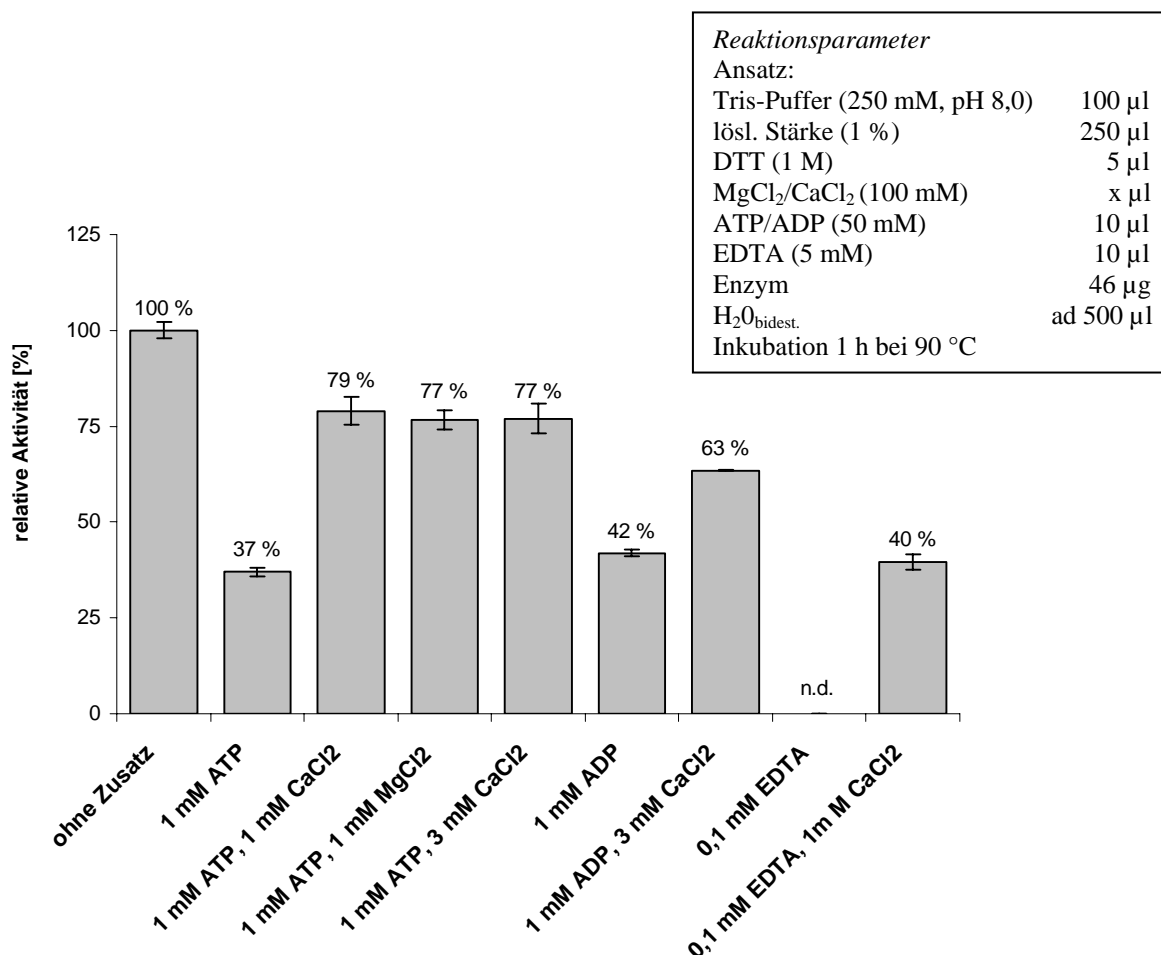


Abb. 30: Rekonstitution der Aktivität durch Ca^{2+} und Mg^{2+} . Den Proben ohne Substrat wurde zunächst nur der Chelator (ATP bzw. ADP bzw. EDTA) zugesetzt. Nach einer Präinkubation von 5 min bei 90 °C erfolgte die Zugabe des Additivs ($CaCl_2$ oder $MgCl_2$). Erst nach einer weiteren Präinkubation von 5 min bei 90 °C wurde die Reaktion durch Zugabe des vorgewärmten Substrats gestartet. Die Aktivität in Anwesenheit von 0,1 mM EDTA lag unter der Nachweisgrenze des DNSA-Tests. Dargestellt ist die relative Aktivität, bezogen auf den höchsten Meßwert der Versuchsreihe. Alle Messungen wurden als Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

Die Aktivität von AmyB-Tm wurde durch ATP und ADP auf etwa 40 % herabgesetzt. Bereits durch die vergleichsweise geringe Konzentration von 0,1 mM EDTA im Ansatz wurde die Aktivität vollständig inhibiert. Sowohl Ca^{2+} als auch Mg^{2+} konnten das Enzym reaktivieren. Dies deutet auf eine Abhängigkeit des Enzyms von zweiwertigen Metallionen hin. Eine vollständige Reaktivierung konnte nicht erreicht werden. Der Versuch einer Rekonstitution der Aktivität mit Fe^{2+} -Ionen war nicht durchführbar, da diese im Reaktionsansatz ausfielen. Die Ursache für die unvollständige Wiederherstellung der Aktivität lag möglicherweise in der hemmenden Wirkung, die Ca^{2+} und Mg^{2+} auf AmyB-Tm haben. Die Halbierung der Reaktionsstärke von AmyB-Tm wurde durch eine Konzentration von 15 mM CaCl_2 sowie von 2 mM MgCl_2 erreicht (Abb. 31). Vermutlich beruht die rekonstituierende Wirkung von Ca^{2+} und Mg^{2+} nicht auf einer Abhängigkeit des AmyB-Tm-Proteins von diesen Ionen. Die teilweise Rekonstitution der Aktivität ist möglicherweise ein indirekter Effekt, da der Zusatz von Ca^{2+} und Mg^{2+} das Gleichgewicht von Chelator und Metallionen im Reaktionsansatz beeinflusst. In Konzentrationen von mehr als 1 mM verdrängen Ca^{2+} und Mg^{2+} unter Umständen ein locker im Enzym gebundenes Metallion und verursachen so die Hemmung der Aktivität von AmyB-Tm.

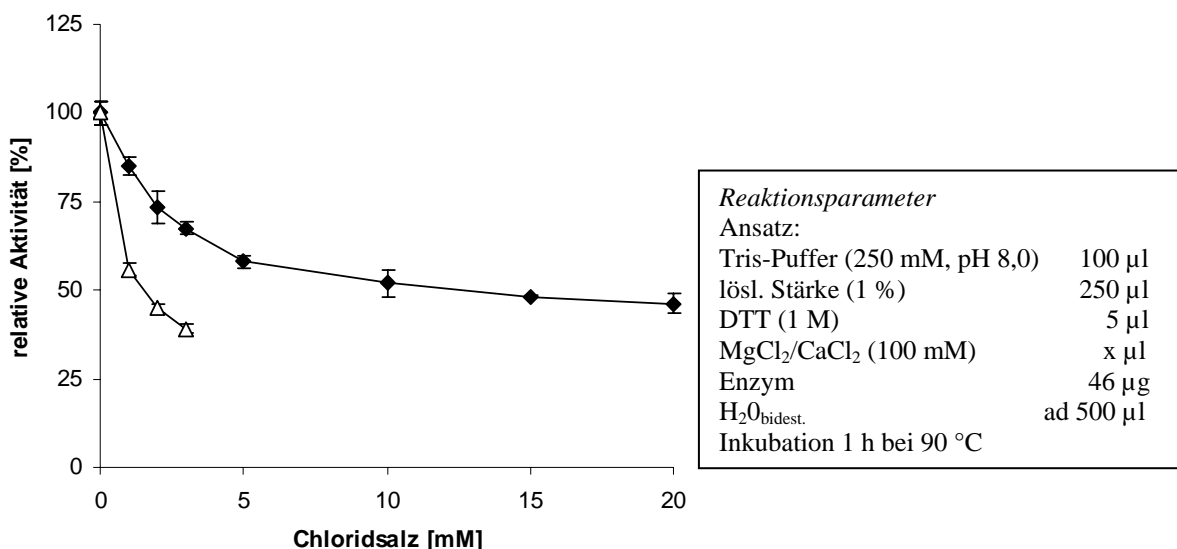


Abb. 31: Einfluß von MgCl_2 (weiße Dreiecke) und CaCl_2 (schwarze Rauten) auf die Aktivität von AmyB-Tm. Die Bestimmung des Einflusses von MgCl_2 wurde nicht weiter fortgeführt, da die AmyB-Tm-Aktivität unter der Nachweisgrenze des DNSA-Tests fiel. Dargestellt ist die relative Aktivität, bezogen auf den höchsten Meßwert der Versuchsreihe. Alle Messungen wurden als Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

3.4. Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen

Die Protein-Kristalle von AmyB-Tm wiesen eine rote Farbe auf (s. III.6.3, Abb. 43), was auf das Vorhandensein von Eisen im Enzym hindeutete. Dieses wurde biochemisch nachgewiesen und quantifiziert. Mit Protein aus diversen Aufreinigungen wurde eine quantitative Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen durch einen colorimetrischen Test durchgeführt (s. II.7.4). Dabei wurden Eisenmengen von 0,4 - 1,7 mol Eisen pro mol Enzym gemessen. Eine direkte Korrelation zwischen der Enzymaktivität und der Eisenmenge konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 32). Da mit dieser Bestimmung lediglich die Menge an Eisenionen, unabhängig von deren Redoxzustand, erfaßt wurde, ist es nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen, inwieweit ein Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und Fe-Ionen einer bestimmten Oxidationsstufe besteht. Die Anwesenheit von Eisenionen im AmyB-Tm-Kristall konnte durch ein Fluoreszenzemissionsspektrum des Enzyms bestätigt werden (s. III.6.3). Die Aktivität des Enzyms konnte weder durch den Zusatz von FeCl_3 noch FeCl_2 gesteigert werden.

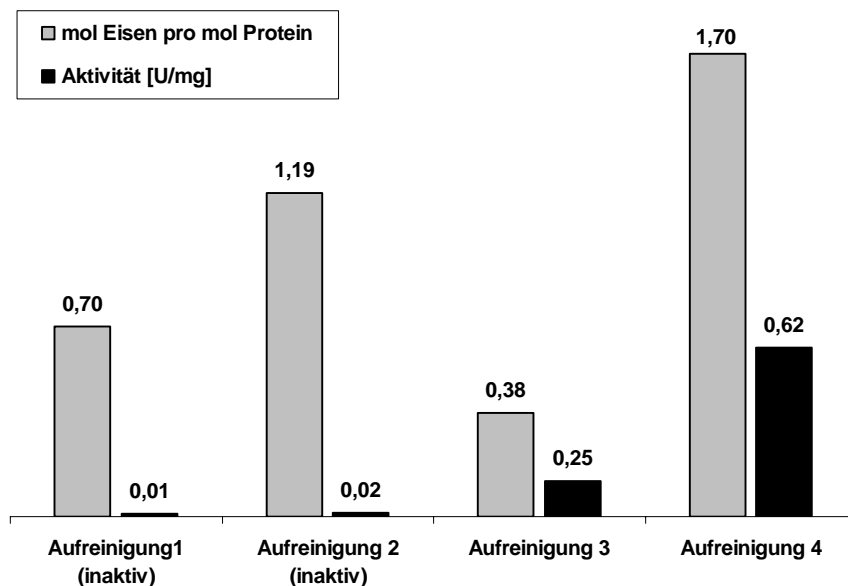


Abb. 32: Eisengehalt von aus unterschiedlichen Proteinaufreinigungen gewonnenem AmyB-Tm-Protein. Alle Messungen wurden als Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

3.5. Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von AmyB-Tm

3.5.1. Analytische Gelfiltration

Zur Aufklärung des Oligomerisierungsgrades von AmyB-Tm wurden eine Gelfiltrationsstudie und Untersuchungen des Laufverhaltens des Enzyms in der Nativ-PAGE durchgeführt. Für die Gelfiltration wurde eine Superdex 200-Säule verwendet, die mit fünf Eichproteinen

kalibriert wurde. Alle Kalibrierungsläufe und die analytische Gelfiltration von AmyB-Tm fanden unter identischen Bedingungen statt. Das in 20 mM Tris gelagerte Protein wurde dafür in 50 mM Phosphatpuffer (pH 8,0) mit 300 mM NaCl umgepuffert. Die Parameter des Säulenlaufs sind in Tab. 11 aufgeführt, Abb. 33 zeigt die mit den Kalibrierungsproteinen erstellte Eichgerade.

Tab. 11: Parameter des Säulenlaufs der Gelfiltration.

| Parameter | |
|-----------------------------|----------------------------------------------|
| Medium: | Superdex 200 prep grade |
| Säule: | HiLoad 16/60 |
| Säulenvolumen (V_t): | 115 ml |
| Ausschlußvolumen (V_0): | 40 ml |
| Probe: | 0,35 mg |
| Laufpuffer: | 50 mM Phosphat-Puffer (pH 8,0) + 300 mM NaCl |
| Flußrate: | 1 ml/min |
| Fraktionsgröße: | 1,5 ml |
| Kalibrierung: | 3 SV Laufpuffer |

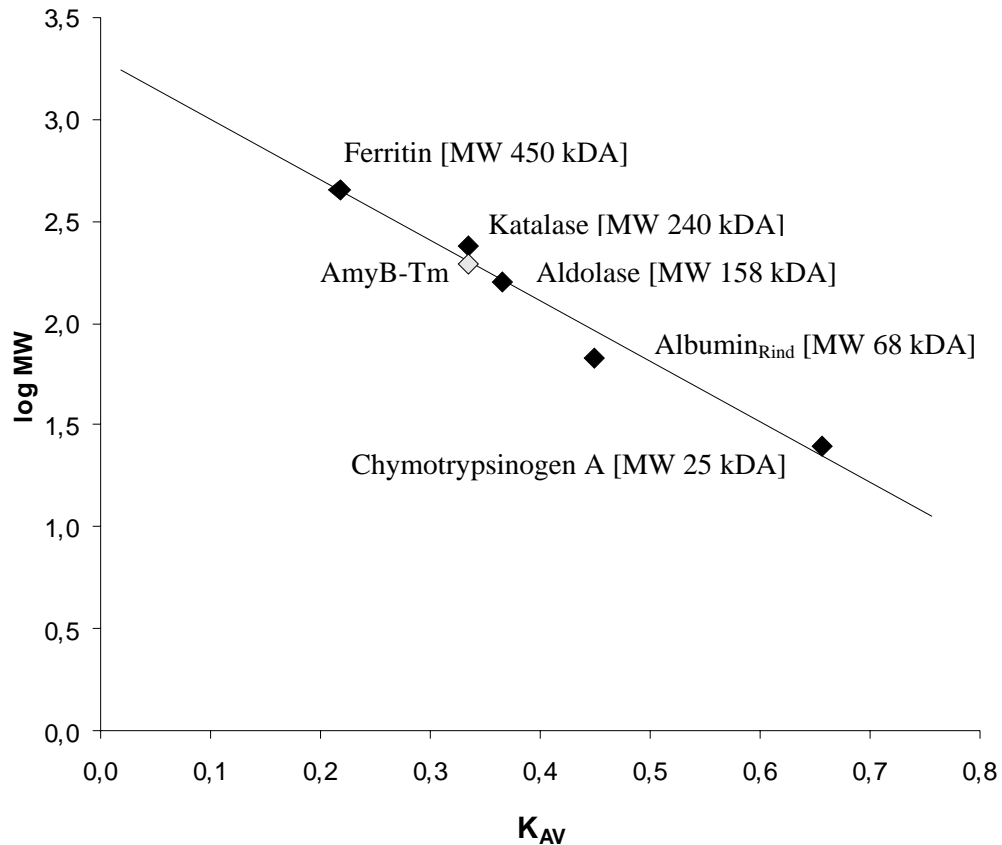


Abb. 33: Eichgerade für die analytische Gelfiltration.

Der Verteilungskoeffizient (K_{AV}) wurde mit folgender Formel ermittelt.

$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Für AmyB-Tm wurde ein Elutionsvolumen V_e von 62,9 ml ermittelt. Mit der aus der Regressionsgeraden abgeleiteten Formel

$$\log MW [\text{kDa}] = 3,281 - 2,954 x$$

ergab sich für das Enzym eine Molekularmasse von 241 kDa (Abb. 33). Die für AmyB-Tm aus der Aminosäuresequenz errechnete Molekularmasse betrug 62,9 kDa. Daraus konnte geschlossen werden, daß das rekombinante AmyB-Tm-Protein im nativen Zustand als Tetramer vorliegt.

3.5.2. Laufverhalten in der Nativ-PAGE

Zur weiteren Untersuchung der Quartärstruktur von AmyB-Tm wurde das Laufverhalten des Proteins in einer Nativ-PAGE analysiert. Zusätzlich zu dem in Nativ-Laufpuffer aufgenommenen AmyB-Tm-Protein, das aus unterschiedlichen Aufreinigungen stammte, wurde AmyB-Tm auch Nativpuffer mit 0,1 mM EDTA und in SDS-haltigem Puffer aufgenommen und aufgekocht. Das EDTA und SDS sollten die Oligomerisierung des Proteins aufheben (Abb. 34). Die Hauptbande der mit SDS-Puffer aufgekochten Proben lief deutlich unter der in Nativ-Puffer aufgenommenen. Dies deutet darauf hin, daß AmyB-Tm im nativen Zustand einen höheren Oligomerisierungsgrad hat, d.h. mindestens als Dimer vorliegt.

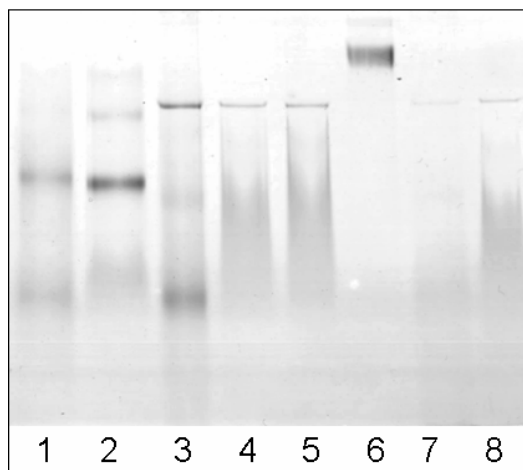


Abb. 34: Laufverhalten von AmyB-Tm in der Nativ-PAGE. Spur 1, AmyB-Tm aus Aufreinigung 1 in SDS-Auftragspuffer aufgekocht (4 μg); Spur 2, AmyB-Tm aus Aufreinigung 2 in SDS-Auftragspuffer aufgekocht (2,5 μg); Spur 3, AmyB-Tm aus Aufreinigung 1 in Nativpuffer (4 μg); Spur 4, AmyB-Tm aus Aufreinigung 2 in Nativpuffer (2,5 μg); Spur 5, AmyB-Tm nach Gelfiltration in Nativpuffer (2,5 μg); Spur 6, Katalase in Nativpuffer (2,4 μg); Spur 7, AmyB-Tm aus Aufreinigung 1 in Nativpuffer mit 0,1 mM EDTA (4 μg); Spur 8, AmyB-Tm aus Aufreinigung 2 in Nativpuffer mit 0,1 mM EDTA (2,5 μg).

Die Hauptbande der in Nativpuffer aufgenommenen Proben lief wiederum unterhalb der Katalase-Bande. Die Molekularmasse der Katalase [240 kDa] ähnelt der für natives AmyB-Tm in der Gelfiltrationsstudie errechneten Masse, was einem AmyB-Tm-Tetramer entsprechen würde. Das Laufverhalten von AmyB-Tm in der Nativ-PAGE deutet also im Gegensatz zur Gelfiltration auf ein Dimer als Quartärstruktur hin. Im Proteinkristall liegt AmyB-Tm als Monomer vor (A. Dickmanns, persönl. Mitteilung). Die unterschiedlichen Ergebnisse der Bestimmung des Oligomerisierungsgrades hängen möglicherweise von der Reinheit der verwendeten Probe und dem Salzgehalt des Puffersystems ab. Bei der Nativ-PAGE beeinflusst zusätzlich zur Proteingröße auch die Oberflächenladung das Laufverhalten der Proteine.

3.6. Laufverhalten im SDS-PAGE-Gel

Im SDS-PAGE-Gel erschien die Bande von AmyB-Tm als Doppelbande, wobei eine schwächere Bande oberhalb der Hauptbande lief. Eine derartige Doppelbande trat bei rekombinantem Protein aus allen Aufreinigungen, unabhängig vom Expressionssystem und vom Wirtsorganismus, auf (vergl. III.2.). Auch Protein, das eine Gelfiltration durchlaufen hatte und dort als Einzelpeak aufgetreten war, erschien in der SDS-PAGE als Doppelbande. Protein, das durch Auflösung von AmyB-Tm-Kristallen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gewonnen wurde, erschien im SDS-PAGE-Gel ebenfalls als Doppelbande. Interessanterweise hatte sich hier das Verhältnis von Haupt- zu Nebenbande gegenüber dem zur Kristallisation eingesetzten Protein verändert. Die beiden Banden waren gleich stark (Abb. 35). Da die schwächere Bande oberhalb der Hauptbande lief, kann es sich hierbei nicht um ein Abbauprodukt von AmyB-Tm handeln. Möglicherweise liegt ein Teil des rekombinanten Proteins modifiziert vor.

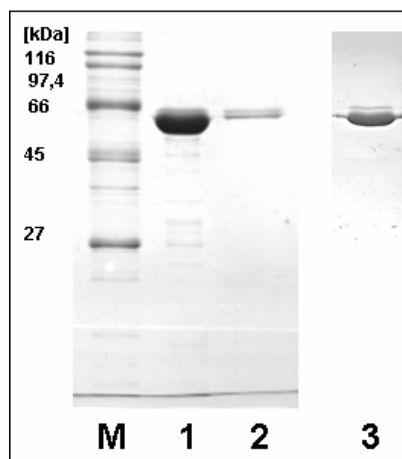


Abb. 35: Laufverhalten von AmyB-Tm in der SDS-PAGE. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, für die Kristallisation eingesetztes Protein, über Source 30Q gereinigt (5 μg); Spur 2, in Auftragspuffer gelöster Kristall aus 4 M Formiat; Spur 3, über Superdex 200 gereinigtes AmyB-Tm (3 μg).

4. Untersuchung der AmyB-Expression in *T. maritima*

4.1. Immunologischer Nachweis von AmyB-Tm

Die Anwesenheit von nativem AmyB in *T. maritima* wurde mittels Western-Blot überprüft. Für den immunologischen Nachweis wurden polyklonale anti-AmyB-Tm-Antikörper (aus mit rekombinantem AmyB-Tm-Protein immunisiertem Kaninchen, Endblutung; Fütterer, 2001) verwendet, deren Spezifität mittels Dot-Blot geprüft wurde (Abb. 36).

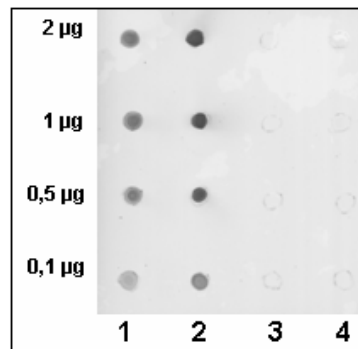


Abb. 36: Dot-Blot zur Überprüfung der anti-AmyB-Tm-Antikörper. Spur 1, AmyB-Tm-Aufreinigung 1; Spur 2, AmyB-Tm-Aufreinigung 2; Spur 3, Amyloglukosidase aus *A. niger* (Boehringer, Mannheim); Spur 4, AmyA-Ag aus *A. gottschalkii*.

Für den Nachweis von AmyB-Tm wurden *T. maritima* Zellpellets in 20 mM Tris-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und mit Ultraschall aufgeschlossen (s. II.5.2.3). Die Rohextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot die Anwesenheit von AmyB-Tm durch anti-AmyB-Tm-Antikörper überprüft (s. II.5.1.2, II.6). Als Kontrollen dienten rekombinant aufgereinigtes AmyB-Tm und der Rohextrakt einer *E. coli* AmyB-Tm-Expressionskultur. Im Western-Blot ließ sich AmyB-Tm als rekombinantes Protein aufgereinigt und im *E. coli*-Rohextrakt nachweisen. Interessanterweise ergab auch die hier im SDS-PAGE-Gel kaum sichtbare, durch säulenchromatographische Verfahren nicht abtrennbare Bande über der eigentlichen AmyB-Tm-Bande ein starkes immunologisches Signal. Als natives Protein konnte AmyB-Tm nur im *T. maritima* Rohextrakt nachgewiesen werden, der aus in vereinfachtem Vollmedium gewachsenen Zellen gewonnen wurde. Im Rohextrakt, der aus in Mineralmedium gewachsenen Zellen gewonnen wurde, ließ sich kein Signal detektieren. Beide *T. maritima* Medien enthielten 0,5 % Stärke als C-Quelle (Abb. 37)

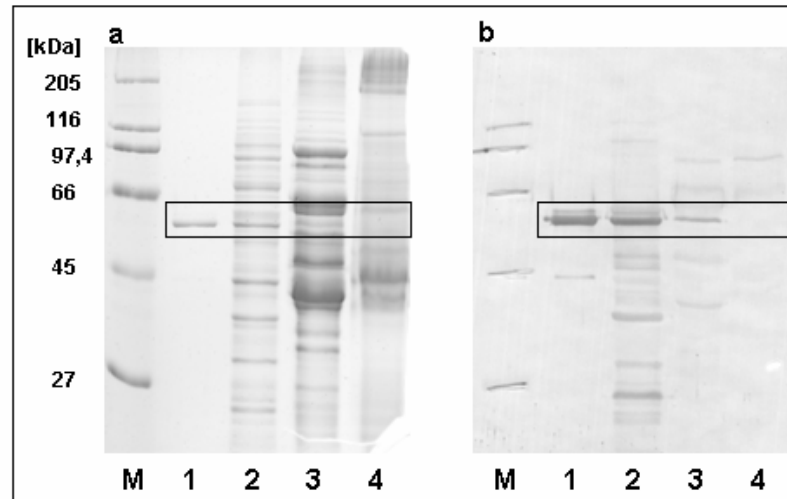


Abb. 37: a) SDS-PAGE-Gel mit *T. maritima* Rohextrakten und b) immunologischer Nachweis von AmyB-Tm mittels Western-Blot. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, rekombinant aufgereinigtes AmyB-Tm (1,3 μg); Spur 2, *E. coli* BL21(DE3)/pET24c::AB Rohextrakt (24 μg); Spur 3, *T. maritima*-Rohextrakt (vereinfachtes Medium + 0,5 % Stärke) (35 μg); Spur 4, *T. maritima*-Rohextrakt (Mineralmedium + 0,5 % Stärke) (35 μg).

4.2. Wachstumsphasen-Abhängigkeit der AmyB-Expression in

T. maritima

Um immunologisch zu überprüfen, ob AmyB konstitutiv in *T. maritima* exprimiert wird, oder ob die Anwesenheit des Enzyms von der Wachstumsphase abhängt, wurde *T. maritima* in vereinfachtem Vollmedium (VM, s. II.3.1.3) mit 0,5 % Glukose kultiviert und an vier Punkten der Wachstumskurve Proben genommen (Abb. 38). Die Zeitpunkte der Probenentnahme lagen etwa in der Mitte der log-Phase (9,75 h), am Ende der log-Phase (15 h) und in der stationären Phase (26,5 h und 33,5 h). Ein Teil der zu diesen Zeitpunkten geernteten Zellen wurde in 20 mM Tris-Puffer (pH 8,0) aufgenommen, per Ultraschall aufgeschlossen und mit den Rohextrakten eine SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot durchgeführt. Zur Kontrolle wurde auch der Rohextrakt einer *T. maritima* Kultur mitgeführt, die 7 h in VM ohne zusätzliche C-Quelle bis zu einer OD_{600} von 0,08 gewachsen war. Unter den gegebenen Kulturbedingungen entsprach dies etwa dem Ende der log-Phase, wie in Vorversuchen ermittelt wurde. Wie in Abb. 39 zu erkennen ist, konnte AmyB-Tm nach 9,75 und 15 h im *T. maritima* Rohextrakt detektiert werden. Nach 26,5 h war das Signal nur noch sehr schwach zu erkennen. Nach 33,5 h konnte keine Anwesenheit von AmyB-Tm mehr im Rohextrakt festgestellt werden. Im Rohextrakt der in vereinfachtem Medium ohne C-Quelle gewachsenen *T. maritima* Zellen konnte AmyB-Tm ebenfalls immunologisch nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde keine Kreuzreaktion des Antikörpers mit dem zu AmyB-Tm-ähnlichen Enzym aus *T. thermophilus* (AmyB-Tt, s. III.9) festgestellt.

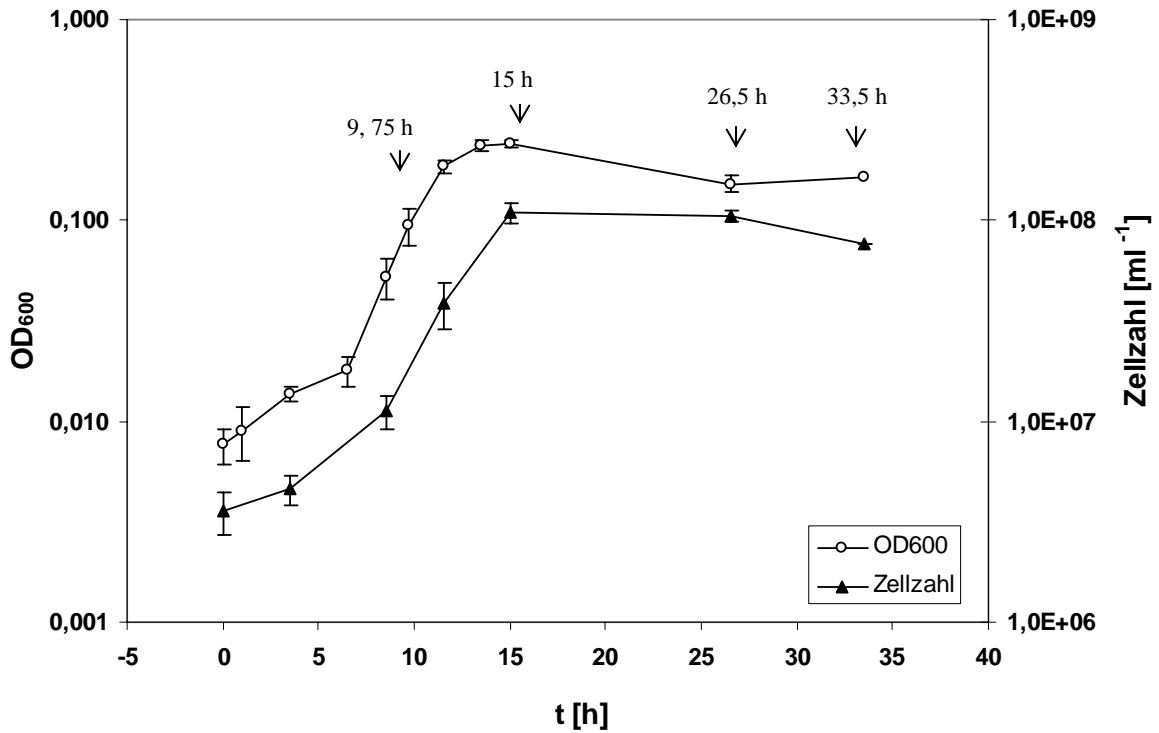


Abb. 38: Wachstumskurve von *T. maritima* bei Wachstum in VM mit 0,5 % Glukose. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Probenentnahme an.

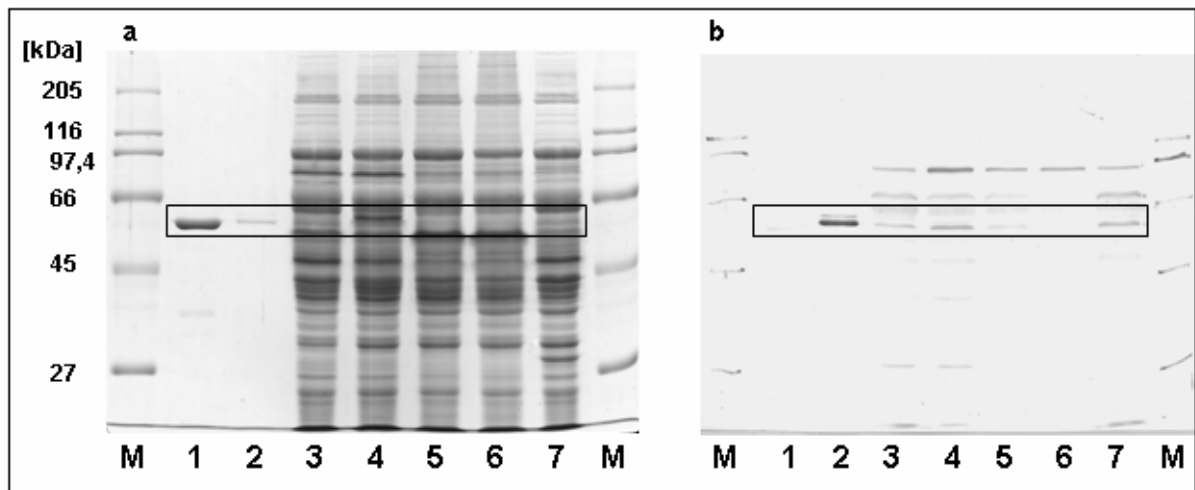


Abb. 39: a) SDS-PAGE-Gel mit *T. maritima* Rohextrakten und b) immunologischer Nachweis von AmyB-Tm mittels Western-Blot. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, rekombinant aufgereinigtes AmyB-Tm-ähnliches Protein AmyB-Tt (Negativkontrolle) (2 µg); Spur 2, rekombinant aufgereinigtes AmyB-Tm (Positivkontrolle) (0,4 µg); Spur 3, *T. maritima*-Rohextrakt (VM + 0,5 % Glukose) nach 9,75 h Wachstum (40 µg); Spur 4, nach 15 h (40 µg), Spur 5, nach 26,5 h (40 µg); Spur 6, nach 33,5 h (40 µg); Spur 7, *T. maritima*-Rohextrakt (VM ohne Glukose) nach 7 h Wachstum (40 µg).

5. Untersuchungen des Speicherpolysaccharids von *T. maritima*

5.1. Charakterisierung des Speicherpolysaccharids

Aus einem Teil der Zellen, die zu den unter III.4.2 genannten Zeitpunkten geerntet wurden, wurde ein Speicherpolysaccharid isoliert. Eine Ausnahme bildet dabei die 9,75 h Probe, da zu diesem Zeitpunkt nicht genug Zellmaterial zur Extraktion vorhanden war. Das isolierte Material wurde mit einer Amyloglukosidase aus *A. niger* und einer α -Amylase aus *A. gottschalkii* verdaut (II.8). Die Amyloglukosidase spaltet α -1,4- und α -1,6-glykosidische Bindungen mit einem Exomechanismus, während die α -Amylase selektiv α -1,4-glykosidische Bindungen innerhalb eines Moleküls (Endomechanismus) hydrolysiert. Wie aus Abb. 40 ersichtlich ist, entstand beim Verdau des Speicherstoffs mit der Amyloglukosidase ausschließlich Glukose, beim Verdau mit der α -Amylase Maltotriose, Maltose und Glukose. Diese Endprodukte der enzymatischen Hydrolysen deuten auf ein α -Glukan als Speicherpolysaccharid von *T. maritima* hin. Weiterhin ist zu erkennen, daß die Abbauprodukte nur bei der nach 15 h Wachstum genommenen Probe auftreten. Zu den zwei späteren Probezeitpunkten läßt sich mit Hilfe der Dünnschichtchromatografie kein Speicherpolysaccharid detektieren. Vermutlich bildet *T. maritima* also während der log-Phase des Wachstums ein α -Glukan, welches sich in der stationären Phase nicht mehr nachweisen läßt.

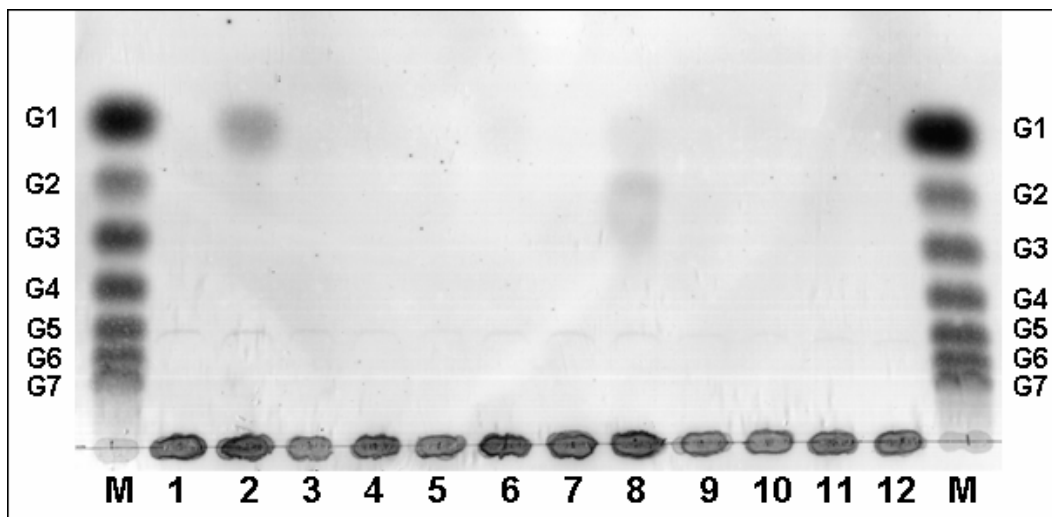


Abb. 40: Dünnschichtchromatographische Analyse des Speicherpolysaccharids aus *T. maritima*. M, Maltooligosaccharid-Standard; Spur 1 und 2, Speicherstoff (15 h) +/- Amyloglukosidase-Verdau; Spur 3 und 4, Speicherstoff (26,5 h) +/- Amyloglukosidase-Verdau; Spur 5 und 6, Speicherstoff (33,5 h) +/- Amyloglukosidase-Verdau; Spur 7 und 8, Speicherstoff (15 h) +/- α -Amylase-Verdau; Spur 9 und 10, Speicherstoff (26,5 h) +/- α -Amylase-Verdau; Spur 11 und 12, Speicherstoff (33,5 h) +/- α -Amylase-Verdau. Von allen Verdauansätzen wurden 21 μ l aufgetragen, vom Standard 3 μ l. Als Laufmittel wurde 1-Propanol/Nitromethan/H₂O (5:3:2) verwendet.

5.2. Quantifizierung des Speicherpolysaccharids

Die Menge des von *T. maritima* gebildeten Speicherpolysaccharids wurde indirekt über die darin enthaltene Glukosemenge bestimmt. Dazu wurde *T. maritima* in vereinfachtem Medium mit 0,5 % Glukose angezogen und die Zellen nach 16 Stunden Wachstum am Ende der log-Phase bei einer OD_{600} von 0,207 geerntet. Das Zellnaßgewicht betrug 0,724 g/l. Die Zellen wurden mehrfach in Saline gewaschen, um eventuell anhaftende Glukose, die aus dem Medium stammt, zu entfernen. Das Speicherpolysaccharid wurde, wie unter II.8 beschrieben, isoliert und mit einer Amyloglukosidase aus *A. niger* verdaut. Eine sehr hohe Menge des eingesetzten Enzyms sollte eine vollständige Umsetzung des Substrats sicherstellen. Die durch die enzymatische Hydrolyse freigesetzte Glukosemenge wurde schließlich durch eine gekoppelte Glukose-Oxidase/Peroxidase-Enzymreaktion quantifiziert (s. II.3). Um zu verhindern, daß in den Zellen vorliegende Glukose, die nicht Teil des Speicherpolysaccharids ist, die Quantifizierung beeinflusst, wurde auch der Glukosegehalt von Testansätzen ohne Amyloglukosidase bestimmt und in der Berechnung berücksichtigt. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Es ergab sich eine Glukosemenge von 37,9 $\mu\text{g/g}$ Zellnaßgewicht. Näherungsweise entspricht dies 37,9 μg α -Glukan/g Zellnaßgewicht. Um die Genauigkeit dieser Methode abschätzen zu können, wurden Proben mit eingewogener Glykogenmenge mitgeführt. Von eingewogenen 100 μg Glykogen konnten 65,1 μg nachgewiesen werden, von eingewogenen 50 μg waren es 34,3 μg und von eingewogenen 25 μg konnten 17,3 μg nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich, daß die tatsächliche Glykogenmenge mit dieser Methode um ~33,5 % unterschätzt wurde. Rechnet man aufgrund dieser Unterschätzung den für *T. maritima* ermittelten α -Glukangehalt hoch, kommt man auf ~56 μg α -Glukan pro g Zellnaßgewicht.

6. Aufklärung der Proteinstruktur von AmyB-Tm

Zusätzlich zur biochemischen Charakterisierung sollte die räumliche Struktur des Enzyms aufgeklärt werden, um die Voraussetzung für eine vergleichende Analyse mit anderen glykosidischen Enzymen zu schaffen. Die Experimente zur Röntgenstrukturanalyse wurden in Kooperation mit Dr. A. Dickmanns und Prof. Dr. R. Ficner (Abteilung Molekulare Strukturbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen) durchgeführt.

6.1. Kristallisation und Datenerhebung

Zur Kristallisation wurde über die Anionenaustauscher-Säule Source 30Q aufgereinigtes Protein (~8 mg/ml in 20 mM Tris-Puffer, pH 8,0) eingesetzt. Zunächst wurden durch *sparse-matrix screens* (Crystal Screen I+II, Hampton Research) mit der *sitting drop* Methode Bedingungen gesucht, unter denen AmyB-Tm kristallisiert (II.9.1). Das Protein bildete unter mehreren getesteten Bedingungen Kristalle (Abb. 41). Als beste Bedingung für die Kristallisation von AmyB-Tm stellte sich in Optimierungsversuchen ein Ansatz von 4 M Na-Formiat, 5 % Isopropanol und 2 mM DTT heraus. Hier wuchsen große, tetragonal-bipyramidale Kristalle, die nach Vorversuchen zur Kryo-Konservierung ohne zusätzlichen Kryopuffer für die Datenerhebung im Röntgenstrahl eingesetzt wurden (Abb. 42).

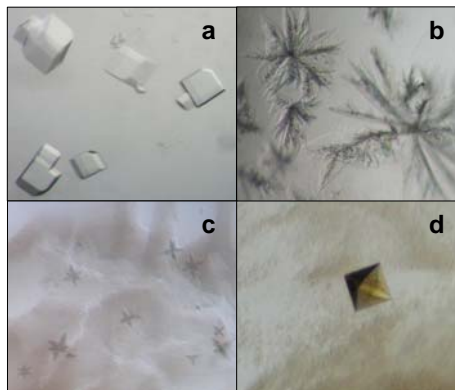


Abb. 41: Kristallbildung des AmyB-Tm-Proteins während der Initialscreens bei 20 °C. Als Präzipitationslösung wurden **a)** 2 % Polyethylenimin, 0,1 M Na-Citrat (pH 5,6), 0,5 M NaCl, **b)** 20 % PEG 4000, 10 % Isopropanol, 0,1 M HEPES (pH 7,5), **c)** 30 % PEG 400, 0,2 M MgCl₂, 0,1 M HEPES (pH 7,5) und **d)** 10 % PEG 400, 0,3 M CaCl₂, 0,1 M HEPES (pH 8,5) eingesetzt.



Abb. 42: AmyB-Tm-Kristalle in 4 M Na-Formiat, 5 % Isopropanol und 2 mM DTT, betrachtet durch einen Polfilter vor dem Objektiv des Stereomikroskops.

Die Datensammlung und Auswertung wurde von Dr. A. Dickmanns durchgeführt. Die Datenerhebung erfolgte an einer PSF Beamline BL2 der Berliner Elektronen-Speicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung m.b.H (BESSY). Dabei wurden standardmäßig 100-120 Bilder pro Datensatz mit einer Drehung von 1° und einer Belichtungszeit von 20 s erhoben. Die Einheitszelle des Kristalls (Raumgruppe I4) hatte die Zellkonstanten $a = 47.08 \text{ \AA}$, $b = 100.75 \text{ \AA}$ und $c = 62.70 \text{ \AA}$. Alle Winkel betragen 90° .

6.2. Aufreinigung von Selenomethionin-AmyB-Tm aus *E. coli* B834 (DE3)

Für die *de novo* Lösung der Kristallstruktur wurde ein MAD-Datensatz mit Selenomethionin-AmyB-Tm aufgenommen. Um das dazu benötigte Protein, bei dem alle Methionin-Reste durch Selenomethionin substituiert waren, zu gewinnen, wurde der methioninauxotrophe Stamm *E. coli* B834 (DE3) mit dem Plasmid pET24c::AB transformiert und wie unter II. 3.2.2 beschrieben im 1 l-Maßstab in Selenomethionin-supplementiertem M9-Medium bei 30°C angezogen. Aus 1 l Kultur konnten dabei 1,6 g Zellen geerntet werden. Die Rohextraktgewinnung und Aufreinigung erfolgte wie für AmyB-Tm unter III.2.1 beschrieben

durch Aufschluß der Zellen mit der French Pressure Cell, anschließender Hitzedenaturierung der *E. coli* Proteine (20 min, 75 °C) und säulenchromatographischer Aufreinigung über eine Source 30Q-Säule. Die Fraktionen der Source 30Q-Säule, die die höchste Konzentration an AmyB-Tm-Protein enthielten, wurden vereinigt, gegen 20 mM Tris-Puffer (pH 8,0) mit 5 mM DTT dialysiert und auf ein Volumen von 200 µl eingengt. Es konnten insgesamt 1,4 mg sauberes Selenomethionin-AmyB-Tm gewonnen werden.

6.3. Eisennachweis

Die AmyB-Tm-Kristalle zeigten eine auffällige rote Farbe, die sich mit zunehmender DTT-Konzentration im Ansatz verstärkte (Abb. 43). Dies deutete auf einen Redox-empfindlichen Cofaktor, vermutlich ein Metall, hin. Um das Metall zu identifizieren wurden an der PSF Beamline BL2 ein Fluoreszenzemissionsspektrum des Kristalls mit variierender Wellenlänge des Röntgenstrahls aufgenommen. Dabei wurde ein Fluoreszenzanstieg des enthaltenen Metalls bei einer Anregung mit ~7,12 keV gefunden (Abb. 44, Tab. 12). Durch diese charakteristische Anregung konnte das im AmyB-Tm-Kristall enthaltene Metall als Eisen identifiziert werden, was den biochemischen Nachweis von Eisen im AmyB-Tm-Protein bestätigte (s. III.3.4). In der gelösten Molekularstruktur von AmyB-Tm konnte kein Eisen nachgewiesen werden, was möglicherweise auf einen Eiseninkorporation in zu wenigen AmyB-Tm-Molekülen (< 10 %) zurückzuführen ist.



Abb. 43: Rot verfärbte AmyB-Tm-Kristalle in 4 M Na-Formiat, 5 % Isopropanol und 2 mM DTT.

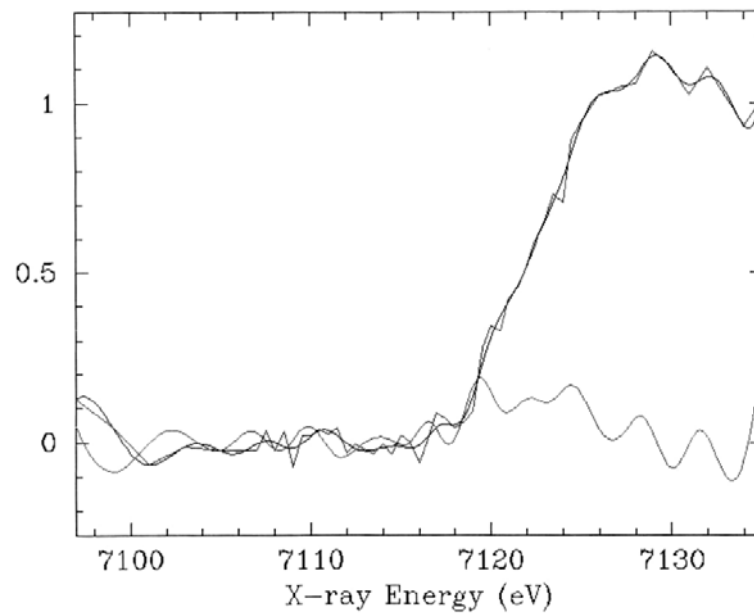


Abb. 44: Röntgen-Fluoreszenzemissionsspektrum von AmyB-Tm.

Tab. 12 :Anregungsenergien ausgewählter Metalle (K-Schale). Die Daten wurde zusammengestellt nach Informationen der Webseite des Center for Synchrotron Radiation Research and Instrumentation, Illinois Institute of Technology, Chicago (<http://www.csrr.iit.edu/periodic-table.html>).

| Metall | Anregungsenergie (keV) |
|---------------|-------------------------------|
| Magnesium | 1,3 |
| Kalzium | 4,0 |
| Chrom | 6,0 |
| Mangan | 6,5 |
| Eisen | 7,1 |
| Cobalt | 7,7 |
| Nickel | 8,3 |
| Kupfer | 9,0 |
| Zink | 9,7 |
| Ruthenium | 22,1 |

7. Analyse der Proteinstruktur

7.1. Tertiärstruktur von AmyB-Tm

Die Proteinstruktur von AmyB-Tm wurde mit einer Genauigkeit von 2,3 Å aufgelöst. Die Molekularstruktur zeigt, daß die 528 Aminosäuren langen Polypeptidkette von AmyB-Tm 9 β -Stränge, 14 α -Helices und 11 3_{10} -Helices ausbildet. Die zentrale Domäne der Tertiärstruktur bildet ein aus sieben β -Strängen bestehendes, verzerrtes TIM-barrel (Abb. 45). Viele saccharolytische Enzyme, insbesondere auch die der GHF 13, besitzen ein ähnliches Faltungsmotiv, das klassischerweise jedoch aus 8 β -Strängen und 8 α -Helices besteht.

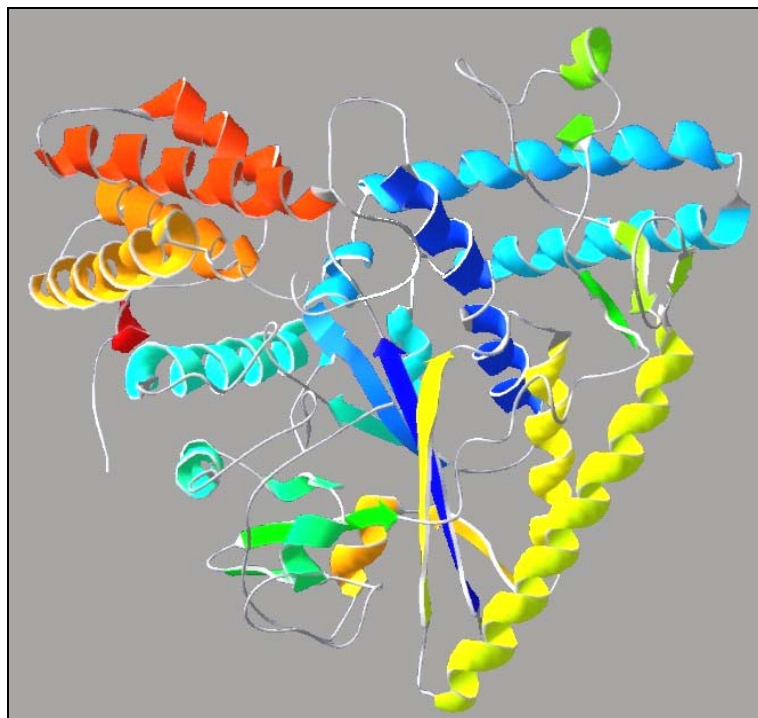


Abb. 45: Cartoon-Darstellung der AmyB-Tm-Struktur mit einem Farbverlauf vom N-Terminus (blau) zum C-Terminus (rot).

Im Topologie-Diagramm (Abb. 46) wird deutlich, daß zwischen dem 2. und 3. das $(\beta/\alpha)_7$ -Faß bildenden α -Strang eine Region inseriert ist, die aus zwei α -Helices besteht. Zwischen dem 6. und 7. β -Strang sind sieben 3_{10} Helices inseriert. Diese im Vergleich zur α -Helix selten vorkommenden Helices sind enger gewunden und haben statt der üblichen 3,6 Aminosäuren nur 3 Aminosäuren pro Windung. Der C-terminale Abschluß des Enzyms wird von einer Domäne gebildet, die aus einem Vier-Helix-Bündel besteht.

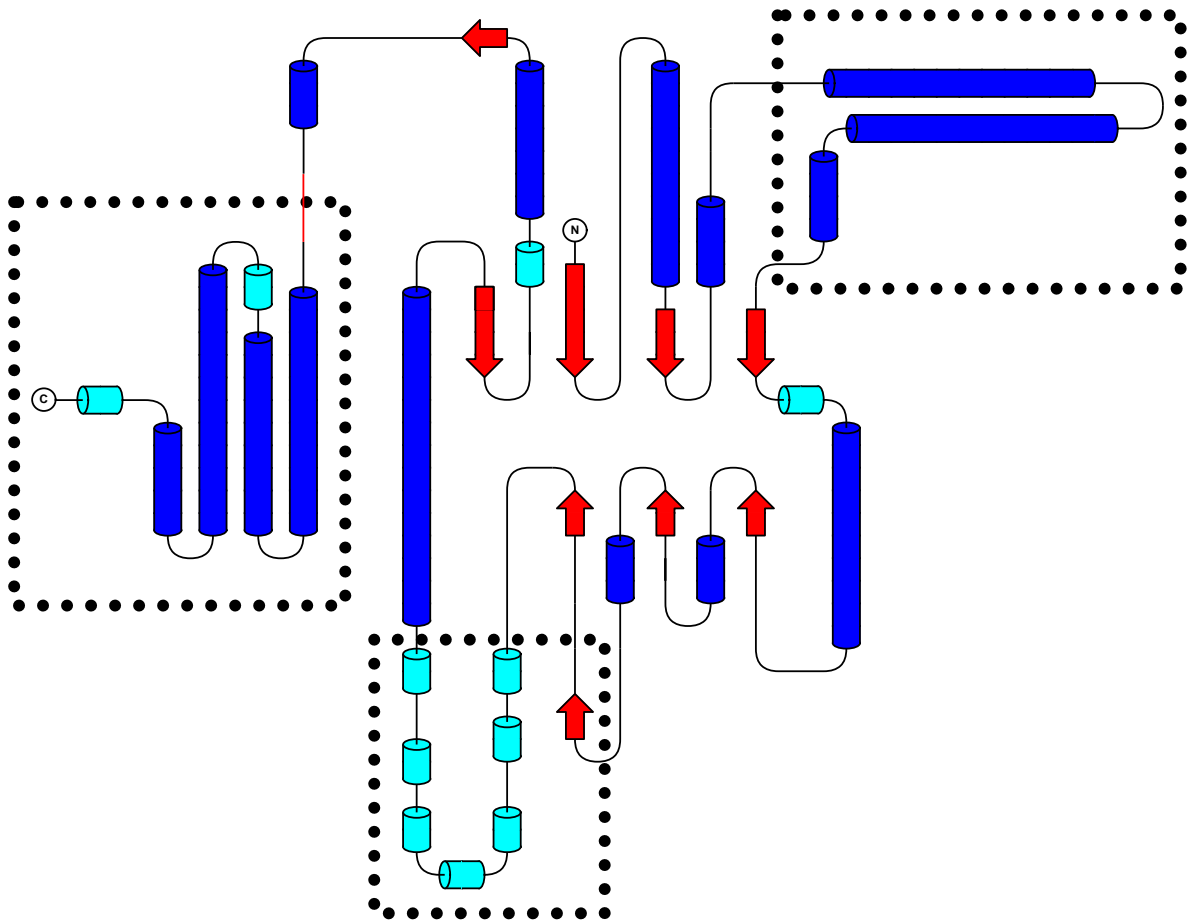


Abb. 46: Topologische Repräsentation von AmyB-Tm. Die β -Stränge durch graue Pfeile, α -Helices durch dunkelgraue Zylinder und 3_{10} -Helices durch hellgraue Zylinder dargestellt. (Mit freundlicher Genehmigung von A. Dickmanns).

Die Struktur von AmyB-Tm zeigt außerordentliche Ähnlichkeit zu den Strukturen einer α -Glukanotransferase (GTase) aus *T. litoralis* (Imamura *et al.*, 2003) und eines hypothetischen Proteins aus *T. thermophilus* HB27 (Idaka *et al.*, unveröffentlicht). Die GTase gehört zur GHF 57, einer Glykosidhydrolase Familie, zu der AmyB-Tm eine schwache Sequenzähnlichkeit hat, und ist biochemisch gut untersucht (Jeon *et al.*, 1997; Imamura *et al.*, 2001). Über das *T. thermophilus* Protein Tth1467 liegen abgesehen von der Struktur keine biochemischen Daten vor. Die Aminosäuresequenz dieses Proteins hat signifikante Ähnlichkeit (e-value = $4e-67$) zu AmyB-Tm und taucht in der Liste der Blast Treffer an Position 27 auf (s. III.1.2, Tab. 6). Trotz der Abweichungen in der Sequenz sind die molekularen Strukturen von AmyB-Tm und Tth1467 nahezu identisch (Abb. 47).

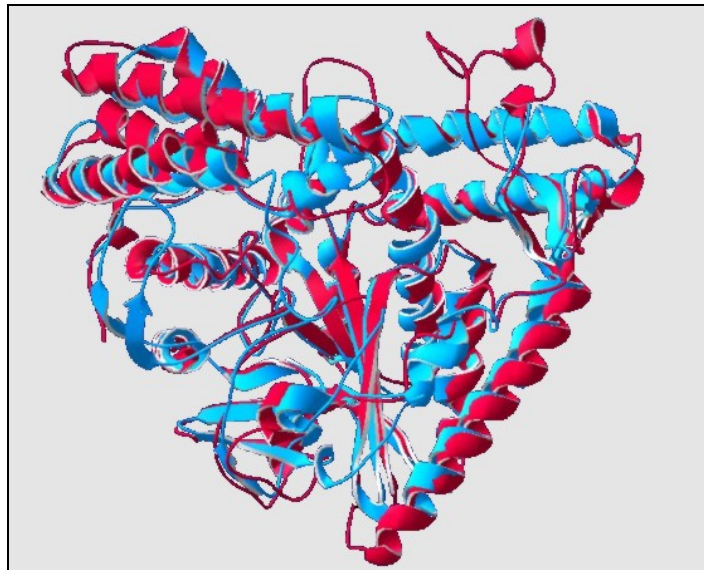


Abb. 47: Alignment der Strukturen von AmyB-Tm (rot) und des hypothetischen Proteins Tth1467 aus *T. thermophilus* (blau).

7.2. Identifizierung der katalytischen Aminosäuren

Die katalytischen Aminosäurereste der GTase aus *T. litoralis* wurden 2001 von Imamura *et al.* identifiziert. Es handelt sich hierbei um Glu123 und Asp214, die C-terminal am Ende der β -Stränge β 4 bzw. β 8 liegen. Es wurde postuliert, daß der Glutamatrest bei der katalytischen Reaktion der GTase als Nukleophil fungiert und der Aspartatrest als katalytische Säure/Base. Beide Aminosäurereste sind innerhalb der GHF 57 hochkonserviert. Trotz der generellen Sequenzunterschiede zur GTase sind die Regionen um die entsprechenden Reste auch in der COG1543 konserviert. Durch Alignment der Aminosäuresequenzen von AmyB-Tm aus *T. maritima*, Tth1467 aus *T. thermophilus* und der GTase aus *T. litoralis* war es möglich, Glu185 und Asp349 als katalytische Reste von AmyB-Tm sowie Glu184 und Asp352 als katalytische Reste von Tth1467 zu identifizieren (Abb. 48). Wie in der Struktur der GTase ist der Glutamatrest am C-Terminus des β 4-Stranges und der Aspartatrest am C-Terminus des β 8-Stranges lokalisiert (Abb. 49).

| | | | | | | | | | |
|-------------------|-----|-----------|--------|-----|-------|-----|----------|------------|-----|
| | | | * | | | | * | | |
| AmyB-Tm | 176 | KHPRGIWLA | ECGY | 189 | . . . | 342 | PVIVAPF | DAELFGHWWF | 359 |
| Tth_Tt1467 | 175 | KDPTGFWL | PEMAYR | 188 | . . . | 345 | GVILSPY | DAELFGHWWY | 362 |
| Tli_gtra | 114 | YDAKGVWL | TERVWQ | 127 | . . . | 207 | KVAVFHDD | GKEKFGVWPG | 222 |

Abb. 48: Teilweises Alignment der Aminosäuresequenzen von AmyB-Tm aus *T. maritima*, Tth1467 aus *T. thermophilus* und der GTase aus *T. litoralis*. Übereinstimmungen in den Sequenzen sind grau hinterlegt, die katalytischen Aminosäurereste sind mit einem Stern gekennzeichnet. Ein vollständiges Alignment der drei Sequenzen befindet sich im Anhang.

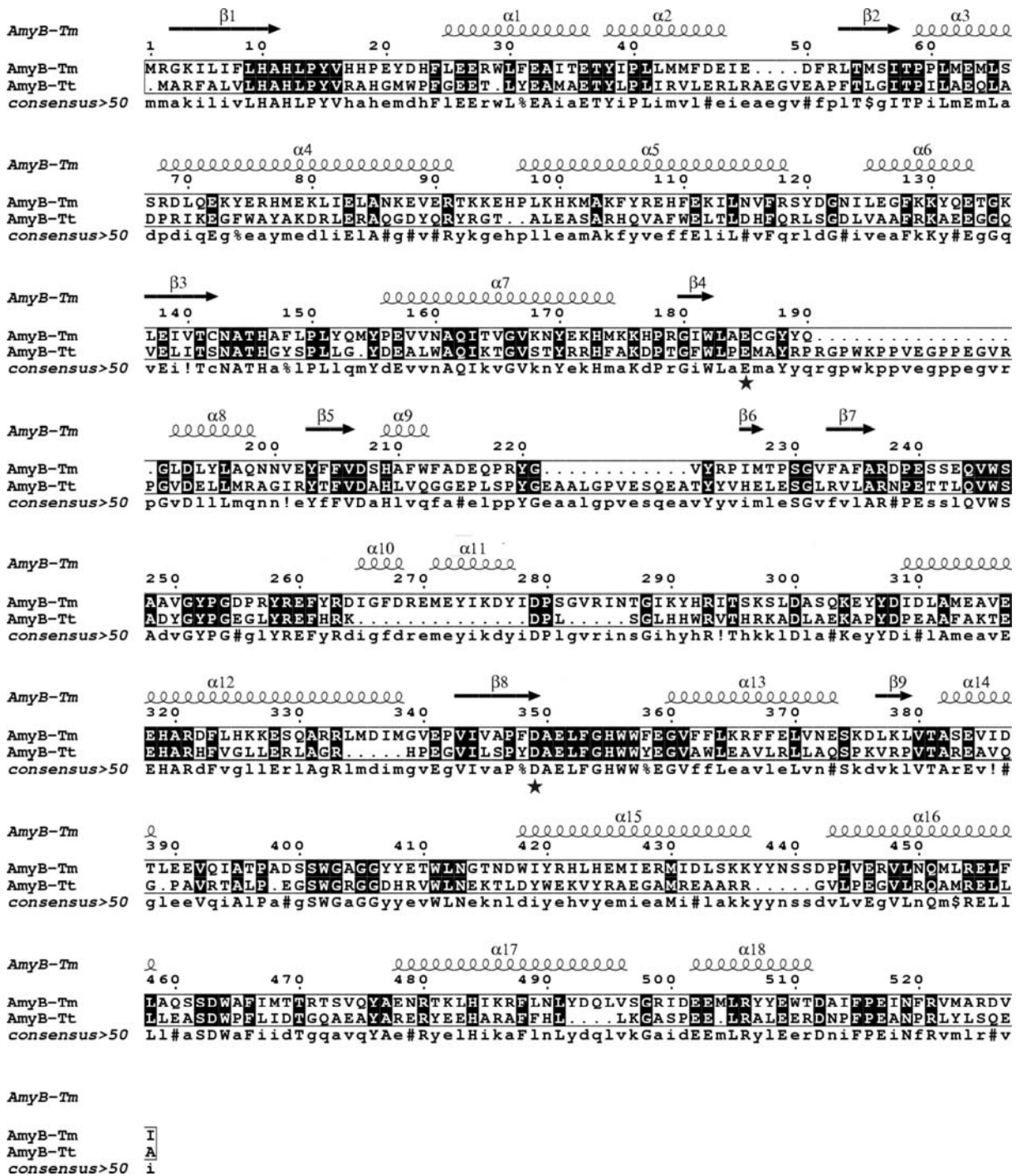


Abb. 49: Alignment der Aminosäuresequenzen von AmyB-Tm und Tth1467. Die Numerierung der Aminosäuren bezieht sich auf AmyB-Tm. Identische Aminosäuren sind Schwarz hinterlegt, ähnliche sind eingerahmt. Die katalytischen Aminosäuren sind durch Sterne markiert. Die Abbildung wurde mit ESript erstellt (Gouet *et al.*, 1999, <http://esript.ibcp.fr/ESript/ESript/index.php>).

Durch Überlagerung der Proteinstrukturen von AmyB-Tm, Tth1467 und der GTase konnte gezeigt werden, daß die in der Primärstruktur identifizierten katalytischen Reste auch in ihrer räumlichen Anordnung in der Tertiärstruktur zur Deckung zu bringen sind (Abb. 50).

Auffällig ist hier, daß die Lage des Asp349 aus AmyB-Tm nicht völlig identisch mit der Lage der Aspartatreste der beiden andern Enzyme ist.

Die als katalytische Aminosäuren von AmyB-Tm identifizierten Aminosäuren Glu185 und Asp349 befinden sich im Zentrum des Moleküls am C-terminalen Ende des verzerrten $(\beta/\alpha)_7$ -Fasses. Abbildung 51 zeigt, daß das AmyB-Tm-Molekül im Bereich des hypothetischen katalytischen Zentrums eine Tasche mit einer stark negativen Oberflächenladung hat.

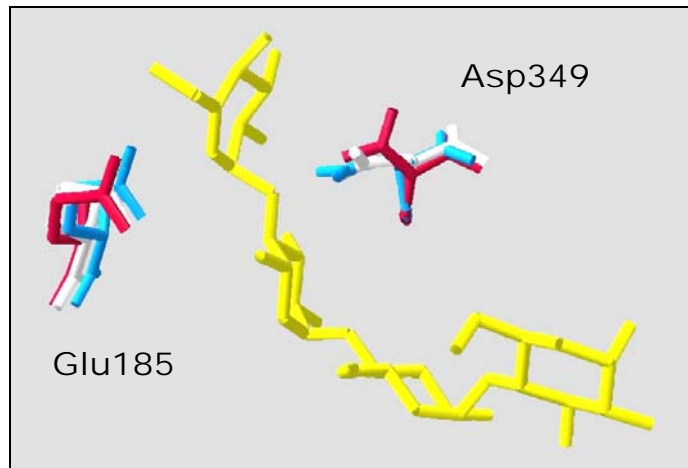


Abb. 50: Überlagerung der katalytischen Reste von AmyB-Tm aus *T. maritima* (rot), Tth1467 aus *T. thermophilus* (blau) und der GTase aus *T. litoralis* (weiß). Das GTase Acarbose Molekül ist gelb eingezeichnet. Die Numerierung der Aminosäuren entspricht der Position in der AmyB-Tm-Sequenz.

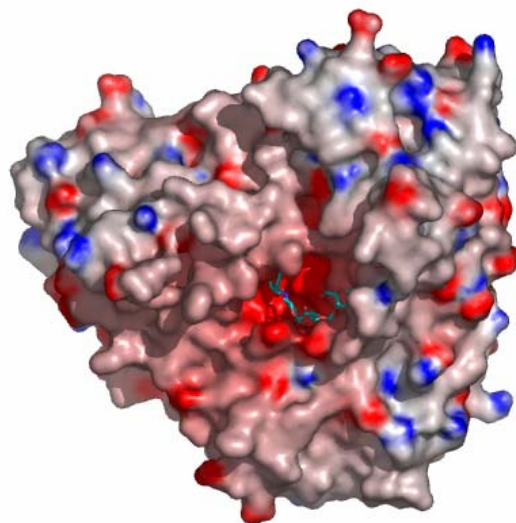


Abb. 51: Darstellung der elektrostatischen Ladungsverteilung auf der molekularen AmyB-Tm Oberfläche. In die negativ geladene Tasche des aktiven Zentrums ist ein Acarbose-Molekül hineinmodelliert (Steinke, 2004).

7.3. Identifizierung einer potentiellen Eisenbindestelle

In unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums von AmyB-Tm konnte eine potentielle Metallbindestelle, gebildet durch His10, His12, His146 und Cys142/Cys186, identifiziert werden. Die Aminosäurereste sind tetraedrisch angeordnet und könnten Eisen koordinieren (O. Einsle, persönliche Mitteilung.) (Abb. 52). Die His10 und His12 entsprechenden Aminosäurereste der GTase (His11 und His13), die sowohl in der GHF 57 als auch im COG1543 hochkonserviert sind, wurden in der GTase Struktur als an der Substratbindung (-1 *subsite*) identifiziert (Imamura *et al.*, 2003).

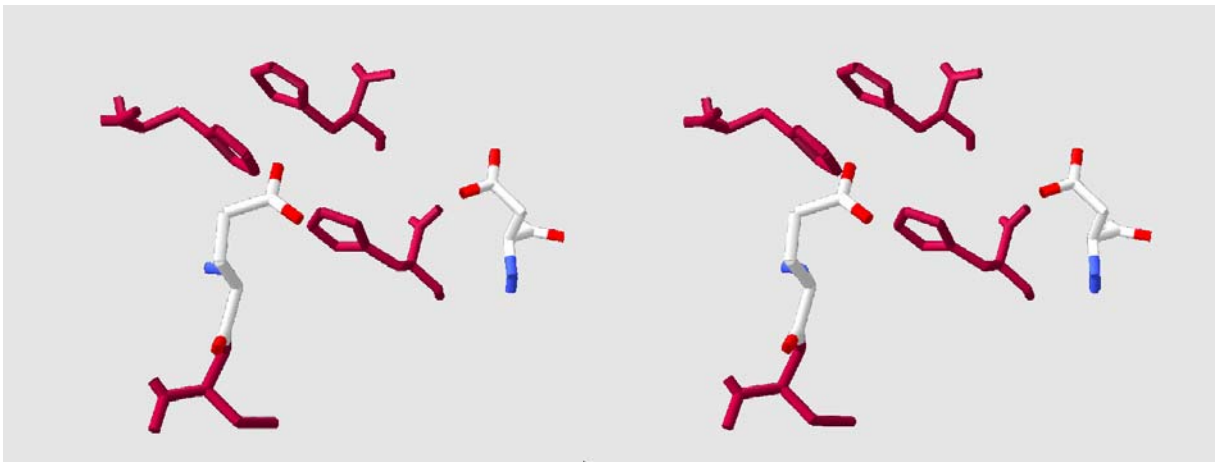


Abb. 52: Stereoansicht des potentiellen Eisenbindezenters. Die das Zentrum bildenden Aminosäuren His11, His13, His146 und Cys186 sind rot eingefärbt. Ebenfalls eingezeichnet sind die katalytischen Reste Glu185 und Asp349.

8. Ortsspezifische Mutagenese von AmyB-Tm

8.1. Mutagenese des Cysteinrests 186

Die computergestützte Analyse der Aminosäuresequenz von AmyB-Tm zeigte, daß das Protein zwei Cysteinreste (Cys142 und Cys186) beinhaltet. Das Cystein an Position 186 ist innerhalb der COG1543 hoch konserviert und liegt direkt neben Glu185, das als einer der katalytischen Aminosäurereste von AmyB-Tm identifiziert wurde (Abb. 53). Cysteinreste können im oxidierten Zustand Disulfid-Brücken ausbilden und so Einfluß auf die Faltungskonformation und Stabilität des Proteins haben. Da die Aktivität von AmyB-Tm im hohen Maß abhängig ist von der DTT-Konzentration und damit dem Redoxzustand des Reaktionsansatzes, wurde vermutet, daß der Redoxzustand der Cysteinreste eine Rolle bei den Aktivitätsschwankungen von AmyB-Tm spielen könnte. Zusätzlich wurde durch die Analyse der Proteinstruktur deutlich, daß eines der Cysteine an einem potentiellen Eisenzentrum beteiligt sein könnte.

| | | | | | | | | |
|----------------|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| AmyB-Tm | 132 | QETGKLEIVT | CNATHAFLPL | YQMYPEVVNA | QITVGVKNYE | KHMKKHPRGI | WLAECGYYQG | 191 |
| Pmio | 132 | KDKGYIEVIT | SNGTHGYLPL | YRDYPEAIKA | QIKSAVLTFK | KYFGDHPKGM | WLAECAYFKG | 191 |
| Tth | 132 | EEGGQVELIT | SNATHGYSPL | LGY-DEALWA | QIKTGVSTYR | RHFAKDPTGF | WLPEMAYRPR | 190 |
| Cac | 136 | DRLGCVEIIT | CAATHALLPL | ILINRQAVKA | QIATGVQSYI | NTMGHEPNGI | WLPECAYTYG | 195 |
| Npu | 136 | QDSNNLEIIT | CGATHGYLPL | MKMPQAVWA | QIQVACEHYE | ETFGRPPKGI | WLPECAYYEG | 195 |
| Pho | 132 | QDEGYVEVIT | SAATHGYLPL | LGR-DEAIEA | QLLNGIKVYE | KYFGRKPRGI | WLPECAYRPD | 190 |
| Pfu | 131 | QEAGYLEIIT | SAATHGYLPL | LGR-DEAIEG | QIANAIKTYE | KYFQRRPRGM | WLPECAYRPD | 189 |

Abb. 53: Alignment ausgewählter Proteine der COG1543 im Bereich der Cysteine 142 und 186 (grau hinterlegt) von AmyB-Tm. Die Proteine wurden mit CLUSTAL W verglichen. Pmio, Protein aus *P. miotherma*; Tth, Protein aus *T. thermophilus*; Cac, Protein aus *C. acetobutylicum*; Npu, Protein aus *N. punctiforme*; Pho, Protein aus *P. horikoshii*; Pfu, Protein aus *P. furiosus*.

Die Rolle der Cysteine für die Aktivität von AmyB-Tm sollte experimentell überprüft werden. Dazu wurde das Cystein an Position 186 gegen ein Serin ausgetauscht. Der Basenaustausch zur Mutation des Cysteinocodons erfolgte durch eine ortsspezifische Mutagenese wie unter II.4.4.3 beschrieben. Dabei wurde nicht nur das Codon TGC (Cystein) in AGC (Serin) geändert, sondern auch eine *Bg*III-Schnittstelle 18 bp von der Mutation entfernt eingefügt, ohne die Aminosäuresequenz zu verändern. Diese Schnittstelle diente zur schnellen Überprüfung der Mutanten. (Abb. 54)

Als Template für die Mutagenese wurde der Vektor pET24c::AB verwendet. Mit dem mutagenisierten Vektor pET24c::ABCys186 wurde zunächst *E. coli* XL1-blue transformiert (Abb. 55). Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Restriktion mit *Bg*III und durch

Sequenzierung mit spezifischen Primern überprüft. Das korrekt mutagenisierte Plasmid wurde aus *E. coli* XL1-blue isoliert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

Ausgangssequenz *amyB-Tm*:

5' -CTT GCG GAA **T**GC GGA TAC TAT CAG GGG CT**G** GAT CTG TAC CTT-3'
 L A E **C** G Y Y Q G L D L Y L

amyB-Tm-Sequenz mit C186→S186 Austausch:

5' -CTT GCG GAA **A**GC GGA TAC TAT CAG GGG CT**A** GAT CTG TAC CTT-3'
 L A E **S** G Y Y Q G L D L Y L

Abb. 54: Vergleich der Ausgangssequenz von *amyB-Tm* mit der mutierten Sequenz. Basenaustausche und der daraus resultierenden Aminosäureaustausch sind grau unterlegt. Die eingefügte *Bgl*III-Schnittstelle ist unterstrichen.

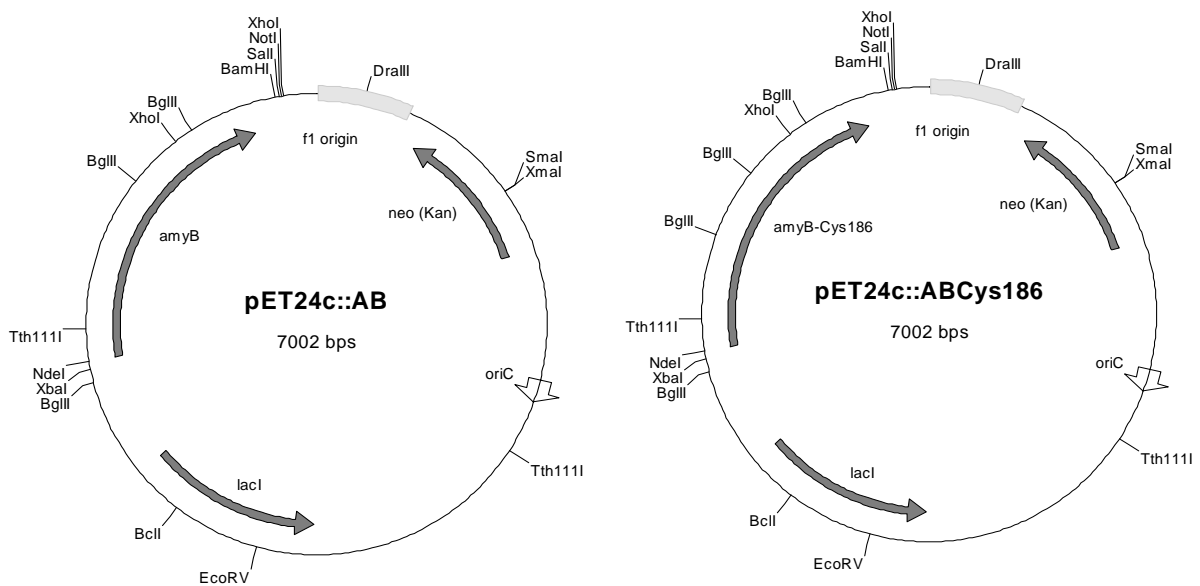


Abb. 55: Vektorkarten des Vektors pET24c:AB und des mutagenisierten pET24c::ABCys186 Vektors.

8.2. Expression und Aufreinigung der AmyBCys186-Mutante

Zur Expression von AmyBCys186 wurde eine 1,5 l Flüssigkultur 2 %ig mit *E. coli* BL21(DE3)/pET24c::ABCys186 aus einer Vorkultur angeimpft. Nach 4 h Wachstum ohne Induktion bei 37 °C erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 1,5 die Zellernte durch Zentrifugation. Das Zellpellet (6,7 g Naßgewicht) wurde in 25 ml 20 mM Tris-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die weitere Rohextraktgewinnung durch Aufschluß mit der French Pressure Cell, Hitzedenaturierung und einer säulenchromatographische Aufreinigung über die Source 30Q-Säule erfolgte, wie für die Aufreinigung von AmyB-Tm aus *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::AB beschrieben (s. III.2.1). Abb. 56 zeigt eine Bilanzierung der Aufreinigung. Die Aktivität des AmyBCys186-Proteins im Standard DNSA-Test (s. II.7.1) war mit ~0,3 U/mg genau so hoch wie die von aus vergleichbaren Aufreinigungen gewonnenem AmyB-Tm. Sie ließ sich durch Zugabe von 1 mM ATP auf 70 % der Ausgangsaktivität senken und durch 0,1 mM EDTA auf 30 %. Für AmyB-Tm waren dies unter gleichen Testbedingungen 37 % bzw. 0 %.

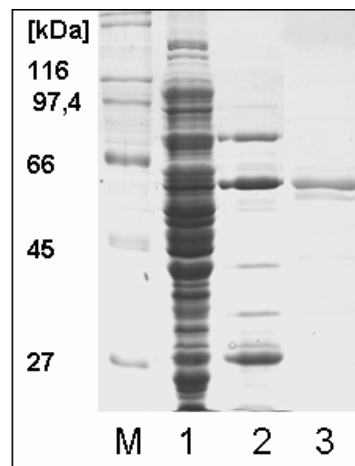


Abb. 56: SDS-PAGE Bilanz der Aufreinigung von AmyBCys186. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, Rohextrakt von *E. coli* BL21 (DE3)/pET24c::ABCys186; Spur 2, bei 75 °C 20 min hitzedenaturierter Rohextrakt; Spur 3, Pool Source 30Q.

9. Klonierung von *amyB-Tt* aus *T. thermophilus* und teilweise

Charakterisierung des Genprodukts

Thermus thermophilus ist ein aerobes, thermophiles Bakterium mit einem Temperaturoptimum des Wachstums von 75 °C, was knapp unter dem Wachstumsoptimum des anaeroben hyperthermophilen Bakteriums *T. maritima* liegt. Die Genprodukte von *Tt1467* aus *T. thermophilus* HB8 (gi:39654909) und *TTC1540* aus *T. thermophilus* HB27 (gi:46199842) gehören zu den zur COG1543-Domäne zusammengefaßten Proteinen. Ihre Aminosäuresequenzen hat eine Identität von 32 % mit der von AmyB-Tm, wobei diese

Sequenzen jedoch in der Liste der Blast Treffer erst an 27. und 28. Stelle, noch hinter der Mehrheit der Cyanobakterien und Archaeen stehen. Im Gegensatz zu AmyB-Tm enthalten diese Proteine, die sich nur durch neun Aminosäurereste unterscheiden, keine Cysteinreste. Von Tt1467 aus dem Stamm HB8 existiert eine unveröffentlichte Struktur in der RCSB Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>), die sehr hohe Ähnlichkeit zu der in dieser Arbeit ermittelten Struktur von AmyB-Tm aufweist (1UFA.A, s. III.7.1). Um zu überprüfen, ob die nahezu identische Struktur und ähnliche Aminosäuresequenz auch eine ähnliche Funktion bedingten, sollte das *amyB-Tm*-ähnliche Gen aus *T. thermophilus* (im Folgenden *amyB-Tt* genannt) kloniert und das Genprodukt charakterisiert werden. Aufgrund der einfacheren Verfügbarkeit wurde hierzu das Gen *TTC1540* aus *T. thermophilus* HB27 verwendet. Ein Alignment von TTC1540 und Tt1467 befindet sich im Anhang.

9.1. Analyse des genetischer Kontexts

Die flankierenden Regionen des Gens *amyB-Tt* aus *T. thermophilus* HB27 weisen keine Ähnlichkeit zu denen von *amyB-Tm* auf. Als einzige Gemeinsamkeit findet sich in der Nähe beider Gene ein ORF, der für ein hypothetisches Protein kodiert, das Ähnlichkeit mit Succinyl-CoA Synthetasen/ Coenzym A-bindenden Proteinen aufweist (COG1832, Pfam02629) (Abb. 57).

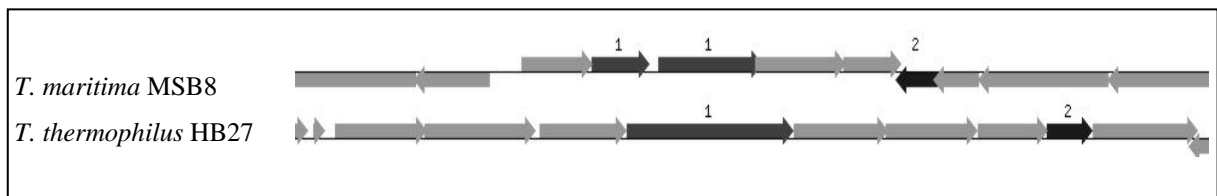


Abb. 57: Vergleich der flankierenden Region um *amyB-Tm* und *amyB-Tt*. ORF 1: *amyB-Tm* (RTM02682/02657, Tm1438) bzw. *amyB-Tt* (TTC1540); ORF 2: hypothetisches, CoA-bindendes Protein mit Ähnlichkeit zur COG1832 (TTC1536 bzw. Tm1435).

9.2. Amplifikation und Klonierung

Die Klonierung erfolgte durch Ligation in den Vektor pDrive und anschließender Subklonierung in den Vektor pET21c. Das *amyB-Tt*-Gen im Insert des Genbankplasmids tthi77, das freundlicherweise von Dr. A. Henne (Göttinger Labor für Genomanalyse) zur Verfügung gestellt wurde, wurde mit den spezifischen Primern *TT_amyb_fwd* und *TT_amyb_rev* mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, daß in das PCR Produkt am 5'-Ende eine *NdeI* und am 3'-Ende eine *HindIII* Schnittstelle eingefügt wurden. Aufgrund des sehr hohen G+C-Gehalts des zu amplifizierenden Gens von 71 % wurde die

PCR mit *Pfu*-Polymerase in einem Ansatz mit der ungewöhnlich hohen Primer-Konzentrationen von 10 pmol/μl durchgeführt.

PCR-Bedingungen:

| | | | |
|-----|---|-------|-------|
| 30x | ⎧ | 95 °C | 8 min |
| | | 95 °C | 2 min |
| | | 67 °C | 1 min |
| | | 74 °C | 2 min |
| | | 74 °C | 5 min |

PCR Ansatz:

| | |
|-------------------------------------|----------|
| <i>Pfu</i> -Puffer (10x) | 5 μl |
| template DNA (<i>tthi77</i>) | 0,2 μl |
| Primer (100 pmol/μl) | je 5 μl |
| DMSO | 5 μl |
| dNTP-Mix (2 mM) | 5 μl |
| <i>Pfu</i> -Polymerase | 0,5 μl |
| H ₂ O _{bidest.} | ad 50 μl |

Das PCR-Produkt wurde gereinigt und durch PCR mit *Taq*-Polymerase ein A-Überhang angefügt (s. II.4.3.2 und II.4.5.3). Das so modifizierte Amplifikat wurde in den Vektor pDrive ligiert. *E. coli* XL1-blue wurde mit dem Ligationsprodukt transformiert, und positive Klone wurden nach Anzucht auf Selektionsmedium durch Blau-Weiß-Screening und Restriktionanalyse identifiziert. Aus einem positiven Klon wurde nach Anzucht in 5 ml Flüssigmedium das Konstrukt pDrive::TT-AB isoliert. Das Insert wurde mit *NdeI* und *HindIII* herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *NdeI* und *HindIII* verdauten Vektor pET21c ligiert. Eine Karte des konstruierten Vektors ist in Abb. 58 dargestellt. *E. coli* XL1-blue wurde mit dem Ligationskonstrukt transformiert, und positive Klone wurden nach Anzucht auf Selektionsmedium mit PCR und Restriktionsanalyse identifiziert. Das Konstrukt pET21c::TT-AB wurde isoliert und zur Überexpression in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert.

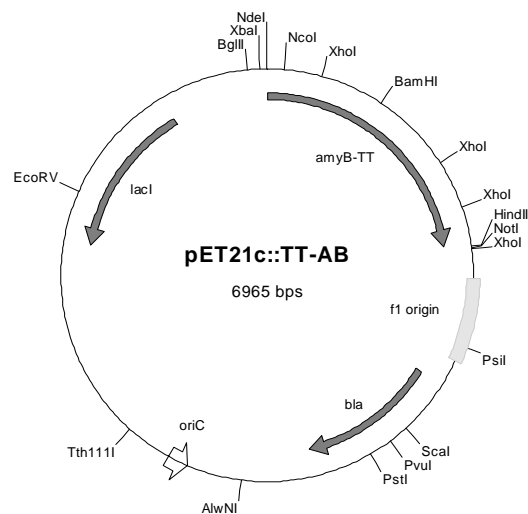


Abb. 58: Karte des konstruierten pET21c::TT-AB Vektors.

9.3. Expressionsvorversuch

Die Expression von AmyB-Tt in *E. coli* BL21 (DE3) bei Wachstum über Nacht und Induktion mit 0,5 mM IPTG war nur schwach. Daher wurde der *E. coli* Stamm Rosetta2 (DE3), der sieben in *E. coli* selten vorkommende tRNAs auf einem zusätzlichen Plasmid (pRARE) trägt, mit dem Plasmid pET21c::TT-AB transformiert. Die Expression von AmyB-Tt war hier deutlich stärker (Abb. 59).

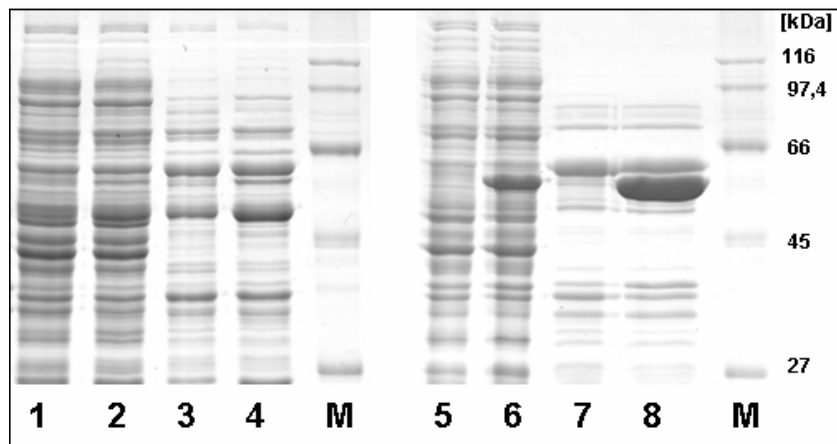


Abb. 59: SDS-PAGE Vergleich der heterologen AmyB-Tt Expression in *E. coli* BL21 (DE3) und Rosetta 2 (DE3). M, Molekularmassenstandard; Spur 1 und 2, Rohextrakt von *E. coli* BL21 (DE3)/pET21c::TT-AB -/+ 0,5 mM IPTG; Spur 3 und 4, hitzedenaturierter Rohextrakt (20 min, 50 °C) des gleichen Klons -/+ 0,5 mM IPTG; Spur 5 und 6, Rohextrakt von *E. coli* Rosetta2 (DE3)/pET21c::TT-AB -/+ 0,1 mM IPTG; Spur 7 und 8, hitzedenaturierter Rohextrakt (20 min, 65 °C) des gleichen Klons -/+ 0,1 mM IPTG.

9.4. Anzucht und Aufreinigung

Zur Aufreinigung des rekombinanten Enzyms wurde eine Flüssigkultur mit einem Volumen von 2x 1,5 l aus einer Vorkultur 2 %ig beimpft und, wie unter II.3.2.1 beschrieben, kultiviert. Bei einer OD_{600} von ~0,7 wurde die Kultur mit 0,1 mM IPTG induziert und für 4 h weiterinkubiert. Das Naßgewicht des geernteten Zellpellets betrug 1,2 g/l. Nach Resuspension in 20 mM Tris pH 8,0 wurden die Zellen mit der French Pressure Cell aufgeschlossen. Durch eine Hitzefällung für 20 min bei 65 °C konnte ein Großteil der mesophilen *E. coli*-Proteine entfernt werden. Der hitzedenaturierte Rohextrakt wurde über Nacht gegen 20 mM Tris (pH 8,0) dialysiert und anschließend einer Anionenaustausch-Chromatographie mit einer Source 30Q-Säule unterzogen. Die Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt und ihre amylolytische Aktivität (DNSA-Test, II.7.1) überprüft. Nach gelelektrophoretischer Kontrolle der Reinheit des Proteins wurden die Fraktionen 7-9 vereinigt, gegen 20 mM Tris (pH 8,0)

dialysiert und auf ein Volumen von 1 ml eingengt. Tab. 13 zeigt die Parameter des Säulenlaufs, Abb. 60 das Chromatogramm.

Tab. 13: Parameter des Source 30Q-Säulenlaufs.

| Parameter | |
|-----------------|------------------------------------|
| Medium: | SOURCE 30Q |
| Säule: | HR10/10 |
| Säulenvolumen: | 8,25 ml |
| Probe: | ~ 47 mg Protein |
| Puffer A: | 20 mM Tris (pH 8,0) |
| Puffer B: | 20 mM Tris (pH 8,0) + 1000 mM NaCl |
| Flußrate: | 2 ml/min |
| Fraktionsgröße: | 3 ml |
| Equilibrierung: | 3 SV Puffer B, 10 SV Puffer A |
| Gradient: | 0-100 % Puffer B (20 CV) |

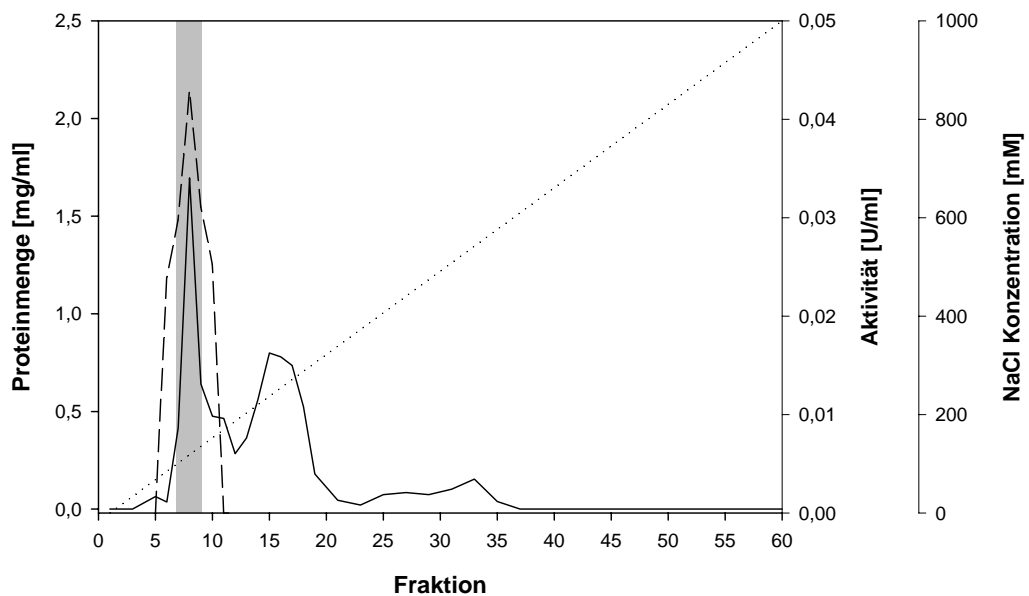


Abb. 60: Chromatogramm des Source 30Q-Säulenlaufs zur Aufreinigung des rekombinanten AmyB-Tt-Proteins. Die durchgezogene Linie stellt die Proteinkonzentration in den Fraktionen dar, die die gestrichelte Linie die Aktivität und die gepunktete Linie die NaCl-Konzentration des Gradienten. Die gepoolten Fraktionen sind grau hinterlegt.

Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms betrug ~0,04 U/mg, gemessen im DNSA-Test mit 1 mM DTT bei 70 °C für 45 min. Wie aus Tab. 14 ersichtlich ist, betrug die spezifische Aktivität des hitzegefällten Rohextrakts 0,06 U/mg. Beim säulenchromatographischen Reinigungsschritt ging also spezifische Aktivität verloren, obwohl die

Reinheit des Proteins zunahm (Abb. 61). Möglicherweise wurden bei diesem Reinigungsschritt zumindest Teile eines für die Aktivität des Enzyms essentiellen Cofaktors abgetrennt. Insgesamt konnten aus 3,6 g Zellen 6,8 mg reines rekombinantes Protein mit einer spezifischen Aktivität von 40 mU/mg gewonnen werden.

Tab. 14: Bilanz der Präparation des rekombinanten AmyB-Tt aus *E. coli* Rosetta 2 (DE3). Die Bestimmung der Aktivität erfolgte durch DNSA-Test mit löslicher Stärke für 45 min mit 50 mM Tris pH 8,0 und 1 mM DTT bei 70 °C.

| | Protein [mg] | Gesamtaktivität [U] | spezifische Aktivität [U/mg] | Anreiche- rungsfaktor | Ausbeute [%] |
|--------------------------------|-----------------|------------------------|------------------------------------|--------------------------|-----------------|
| Rohextrakt | 282,2 | 2,54 | 0,009 | 1,0 | 100 |
| hitzenaturierter Rohextrakt | 47,5 | 2,85 | 0,060 | 6,7 | 114 |
| Source 30Q Pool | 6,8 | 0,22 | 0,038 | 4,2 | 8,5 |

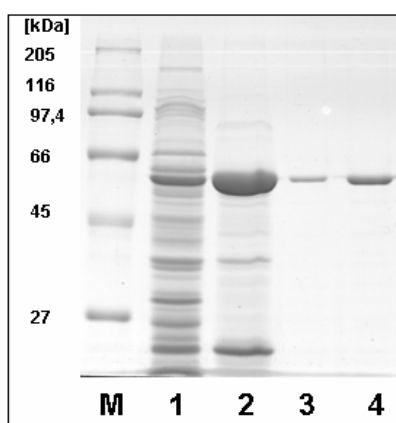


Abb. 61: SDS-PAGE Gel der Reinigungsschritte von AmyB-Tt. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, Rohextrakt von *E. coli* Rosetta 2 (DE3)/pET21c::TT-AB (35 µg); Spur 2, hitzenaturierter Rohextrakt (17 µg); Spur 3, Source 30Q Pool (1 µg); Spur 4, Source 30Q Pool (2,5 µg).

9.5. Biochemische Charakterisierung von AmyB-Tt

Durch Vorversuche wurde festgestellt, daß die Aktivität des rekombinanten Enzyms in Tris-Puffer (pH 8,0) bei 65 °C und einer Inkubationszeit von 1 h etwa dreimal höher war als in MacIlvaine-Puffer desselben pH-Werts. Diese Aktivität ließ sich durch Zugabe von DTT weiter steigern, weshalb der Einfluß von DTT auf die Aktivität im DNSA-Test mit löslicher Stärke genauer untersucht wurde (Abb. 62). Die höchste gemessene Aktivität wurde bei einer DTT-Konzentration von 1 mM im Reaktionsansatz erreicht.

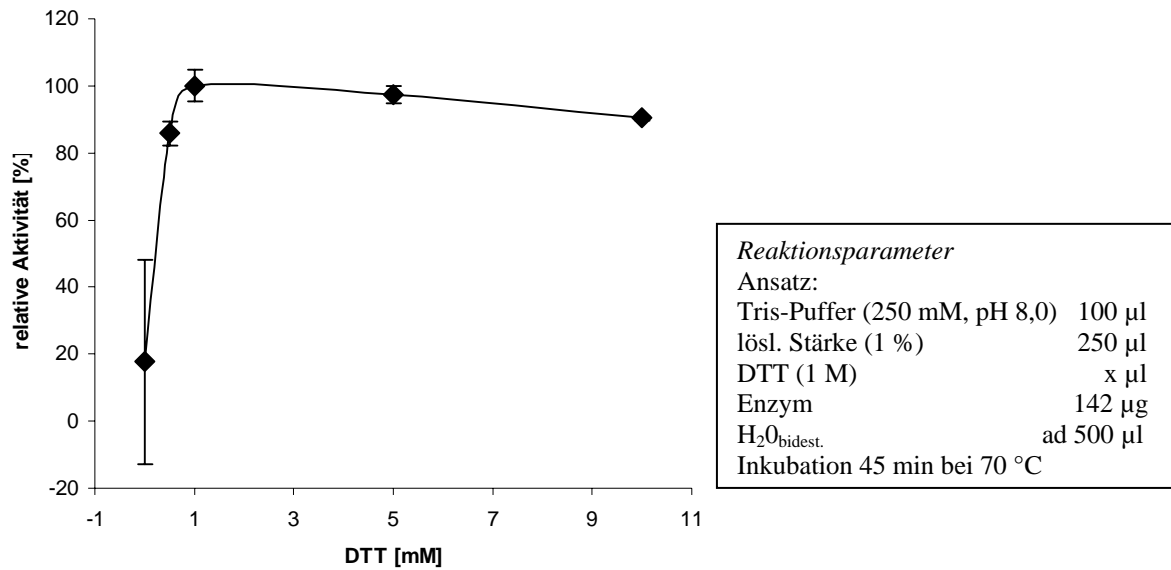


Abb. 62: Einfluß der DTT-Konzentration im Ansatz auf die Aktivität von AmyB-Tt. Dargestellt ist die relative Aktivität, bezogen auf den höchsten Wert der Meßreihe.

Der Einfluß der Temperatur auf die Aktivität von AmyB-Tt wurde im Bereich von 50 bis 90 °C ebenfalls mit löslicher Stärke im DNSA-Test ermittelt. Wie aus Abb. 63 zu entnehmen ist, erreichte AmyB-Tt ein Maximum an Aktivität zwischen 70 und 80 °C.

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert des Reaktionsansatzes wurde von pH 5,5 bis pH 9,0 bestimmt. Als geeignete Puffer wurden im pH-Bereich von 5,5 bis 7,0 PIPES und im pH-Bereich von 7,0 bis 9,0 Tris gewählt. Der den gesamten pH-Bereich abdeckende MacIlvaine-Puffer wurde nicht verwendet, weil dieser die Aktivität von AmyB-Tt stark herabsetzte. Der pH-Wert aller Puffer wurde bei 70 °C titriert. Abb. 64 zeigt, daß die maximale Aktivität des rekombinanten Enzyms bei pH 6,5 in PIPES-Puffer erreicht wird.

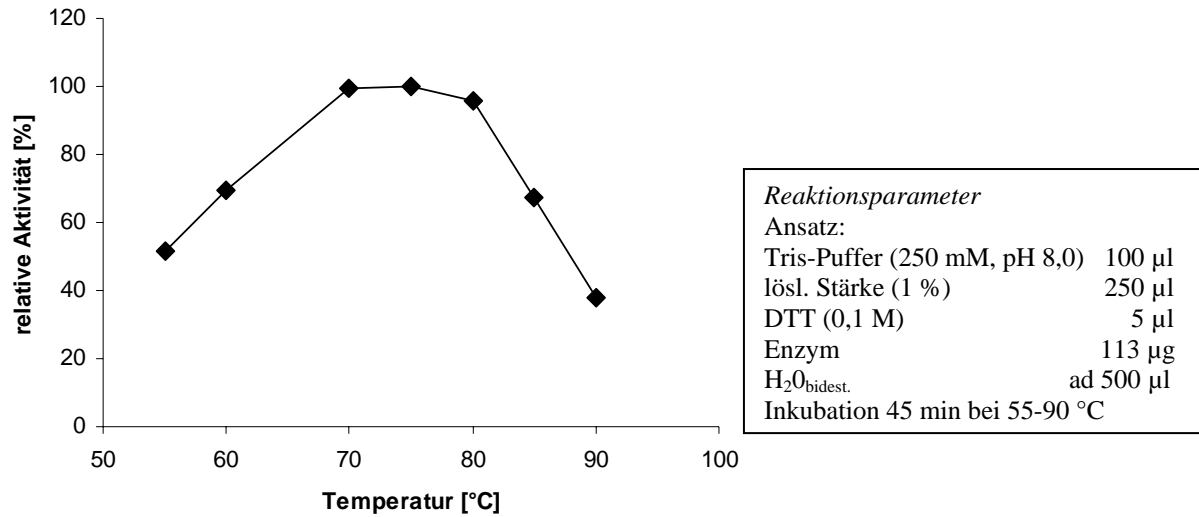


Abb. 63: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von AmyB-Tt von der Reaktionstemperatur. Dargestellt ist die relative Aktivität, bezogen auf den höchsten Wert der Meßreihe.

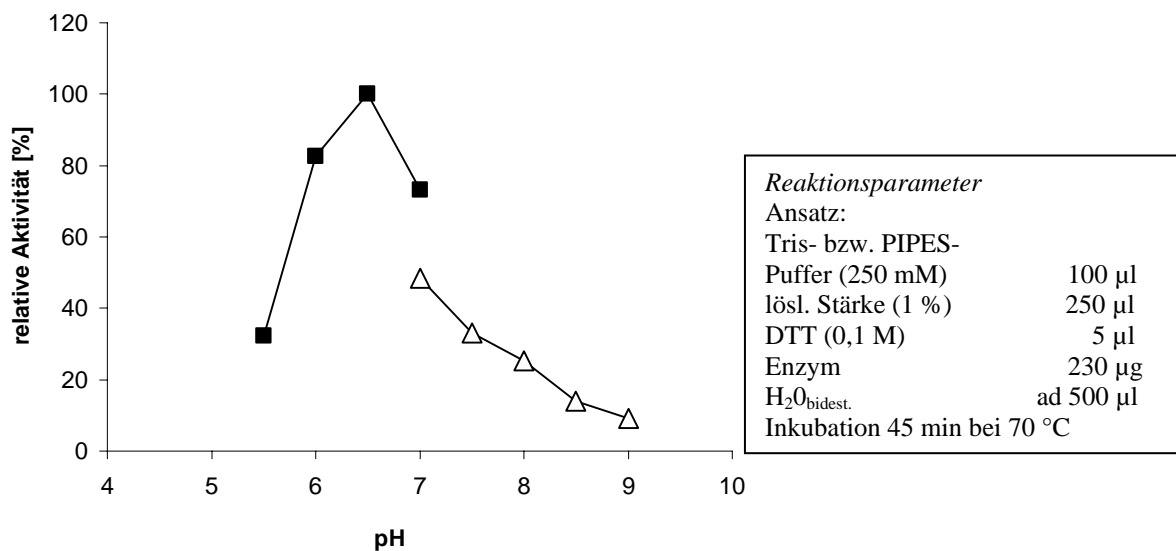


Abb. 64: Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von AmyB-Tt vom pH-Wert. Die ausgefüllten Quadrate stellen die Messungen mit PIPES-Puffer dar, die weißen Dreiecke die Messungen mit Tris-Puffer. Dargestellt ist die relative Aktivität, bezogen auf den höchsten Wert der Meßreihe. Alle Messungen wurden als Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

10. Untersuchungen der α -Amylasen AmyA und AmyB aus *Anaerobranca gottschalkii*

Über die α -Amylasen aus *Anaerobranca gottschalkii* liegen bereits Daten aus anderen Arbeiten vor (Ballschmiter, 2001; Ivanonva, mündl. Mitteilung). Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Dissertation neu hinzugewonnenen Ergebnisse dargestellt. Ältere Daten werden, wo sie dem besseren Gesamtverständnis dienen, in knapper Form wiedergegeben.

Das thermoalkaliphile Bakterium *A. gottschalkii* besitzt zwei α -Amylasen, von denen eine als Lipoprotein vermutlich extrazellulär (AmyA-Ag) und eine im Cytoplasma (AmyB-Ag) lokalisiert ist. AmyA-Ag ließ sich zusammen mit der ebenfalls extrazellulären CGTase im Überstand von *A. gottschalkii*-Kulturen nachweisen. Im *A. gottschalkii*-Rohextrakt ließ sich AmyB-Ag als einziges amylolytisches Enzym nachweisen (Abb. 65).

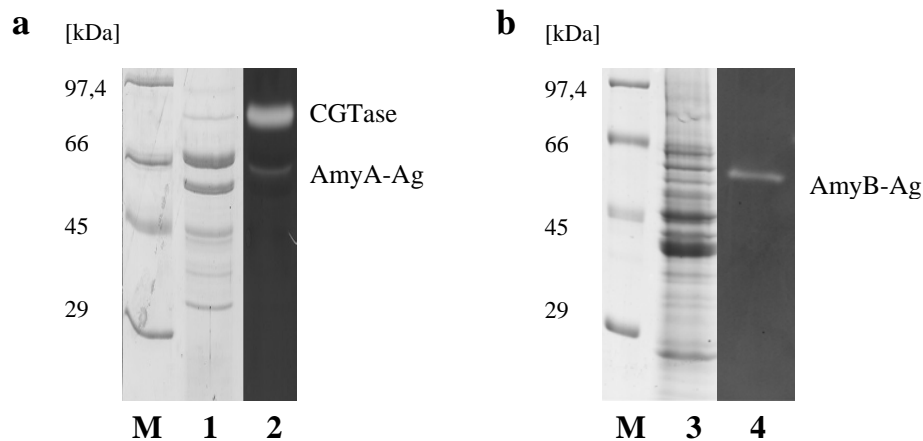


Abb. 65: SDS-PAGE-Gel und Aktivitätsfärbung mit a) dem Überstand und b) dem Rohextrakt einer *A. gottschalkii*-Kultur. M, Molekularmassenstandard; Spur 1, eingengter Überstand von *A. gottschalkii*; Spur 3, Stärke-Aktivitätsfärbung; Spur 3, Rohextrakt von *A. gottschalkii*, Spur 4, Stärke-Aktivitätsfärbung. (a) nach Armbrecht, 2003, modifiziert.)

Die Enzyme, die beide mit einem Endomechanismus Stärke spalten, haben eine hohe Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit zur GH-Familie 13, in der sich die meisten bekannten α -Amylasen befinden. In ihren pH-Optima und Temperaturspektren unterscheiden sie sich jedoch (Ballschmiter *et al.*, 2005). Die extrazelluläre α -Amylase (AmyA-Ag) ist in einem Bereich von pH 6,0 bis 9,5 mit einem Optimum bei pH 8,0 aktiv. Das Maximum der enzymatischen Aktivität wird bei 70 °C erreicht. Die intrazelluläre Amylase dagegen ist in einem wesentlich kleinerem pH-Bereich aktiv (pH 5,5-6,5) und hat ein pH-Optimum bei pH 6,0. AmyB-Ag zeigte auch gegenüber hohen Temperaturen eine erheblich geringere

Toleranz. Die maximale Aktivität des Enzyms wurde bei 55 °C erreicht (Abb. 66). Bei 70 °C, der Temperatur, bei der AmyA-Ag die maximale Aktivität erreicht, trat bei AmyB-Ag bereits nach 10 min ein Aktivitätsverlust von 50 % ein, während AmyA-Ag bei dieser Temperatur eine Halbwertszeit von 48 h hatte (ohne Abbildung).

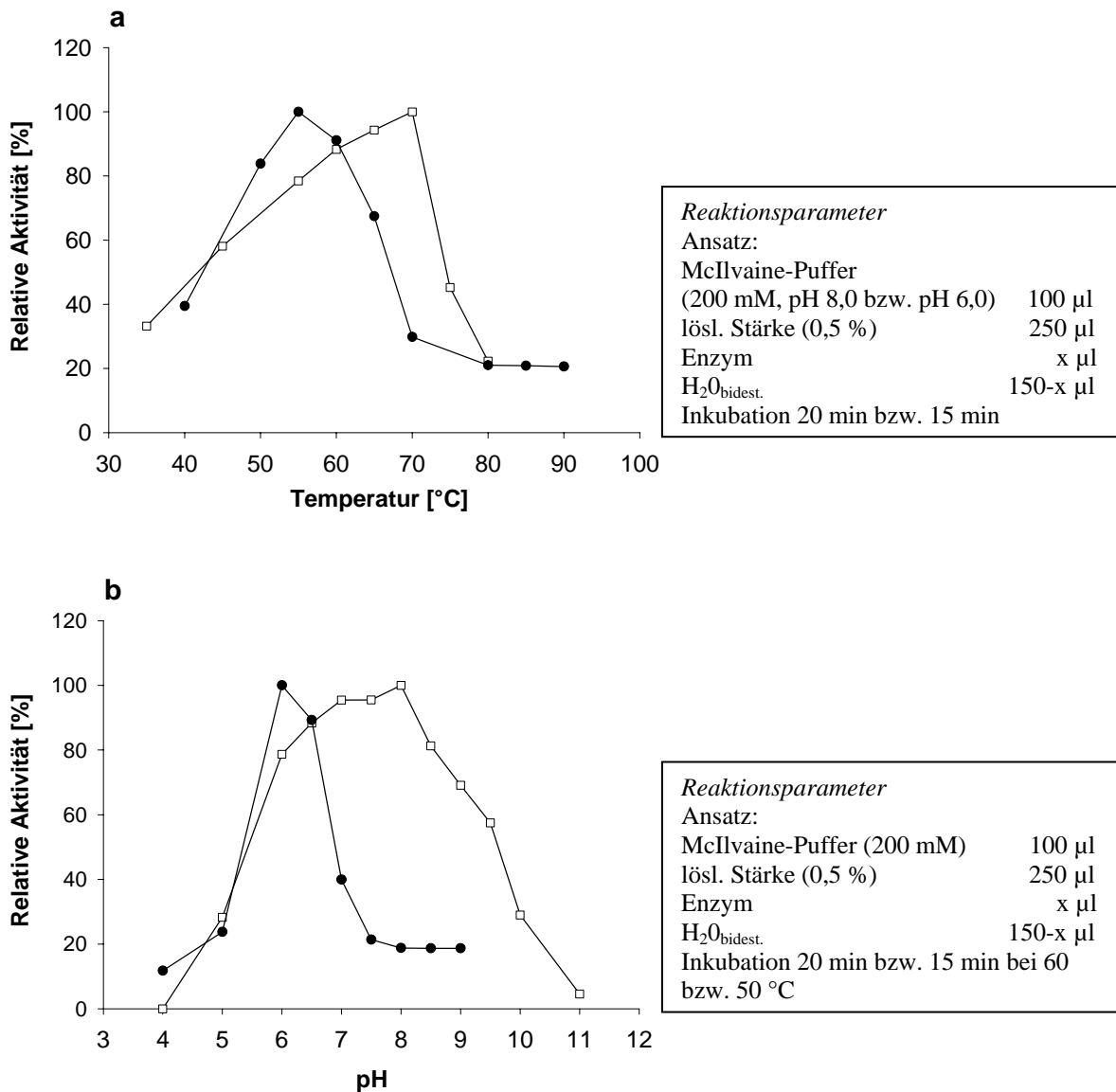


Abb. 66: a) Temperatur- und b) pH-Abhängigkeit der Aktivität von AmyA-Ag (weiße Rauten) und AmyB-Ag (schwarze Quadrate). Dargestellt ist die relative Aktivität, bezogen auf den höchsten Wert der Meßreihe. Alle Messungen wurden als Mehrfachbestimmungen durchgeführt. (Ballschmitter *et al.*, im Druck, modifiziert)

AmyA-Ag zeigte die höchste Aktivität (52 U/mg) in McIlvaine-Puffer. In HEPES- und Tris-Puffer erreichte das Enzym nur etwa 80 % der Aktivität. Ca²⁺-Ionen stimulierten die Aktivität von AmyA-Ag. Dieser Effekt konnte in McIlvaine-Puffer nicht beobachtet werden, da hier die Ca²⁺-Ionen von dem im Puffer enthaltenen Citrat komplexiert werden (Abb. 67).

Im Standard-DNSA-Test (s. II.7.1) mit McIlvaine- und HEPES-Puffer konnte keine Hemmung der AmyA-Ag-Aktivität durch EDTA festgestellt werden. In Tris-Puffer dagegen wurde die Aktivität der α -Amylase durch Zusatz von 5 mM EDTA auf etwa 40 % gesenkt. Der Zusatz von 10 mM EDTA hatte eine vollständige Hemmung der Enzymaktivität zur Folge. Dabei spielte es keine Rolle, ob der Testansatz mit EDTA präinkubiert wurde, oder ob das EDTA direkt zum Reaktionsansatz gegeben wurde (Abb. 67). Möglicherweise wird das Enzym durch Tris-Puffer destabilisiert, so daß im Protein gebundenes Kalzium für den Chelator leichter zugänglich ist. Der durch den Zusatz von 5 mM EDTA eingetretene Aktivitätsverlust konnte durch Zusatz von 10 mM Ca^{2+} vollständig aufgehoben werden (ohne Abbildung). Neben der hydrolytischen Spaltung von α -1,4-Bindungen zeigte AmyA-Ag auch α -4-Glukanotransferase-Aktivität, bei der außer linearen Maltodextrinen auch β -Cyclodextrin entstand. Die spezifische Aktivität der β -Cyclodextrinbildung durch AmyA-Ag lag bei 0,3 U/mg (Ballschmiter *et al.*, 2005).

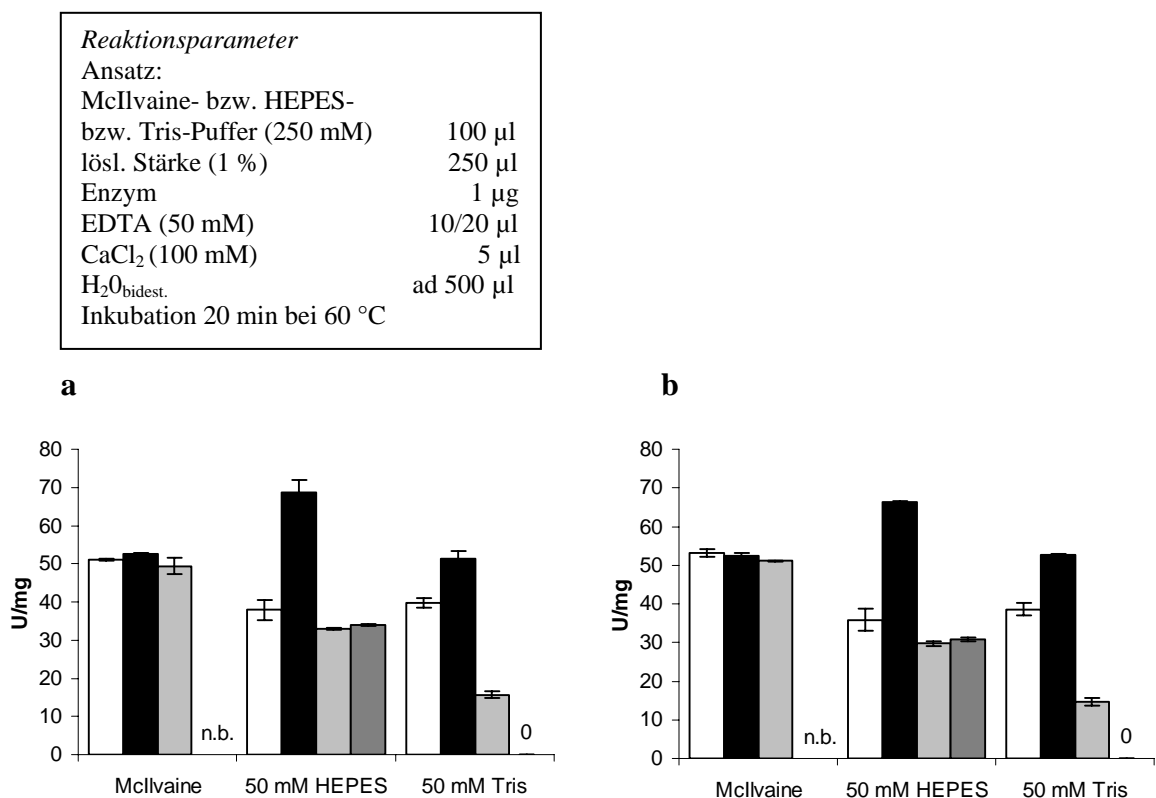


Abb. 67: Einfluß von Ca^{2+} und EDTA auf die Aktivität von AmyA-Ag a) ohne Präinkubation und b) nach 1 h Präinkubation bei 60 °C ohne Substrat. Weiße Balken, ohne Zusatz; schwarze Balken, mit 5 mM CaCl_2 ; hellgraue Balken, mit 5 mM EDTA; dunkelgraue Balken, mit 10 mM EDTA; n.b., Wert nicht bestimmt. Alle Messungen wurden als Mehrfachbestimmungen durchgeführt.

IV. Diskussion

Das Bakterium *Thermotoga maritima* weist in seinem Genom den höchsten bisher bekannten prozentualen Anteil an Genen auf, die für Kohlenhydrat-modifizierenden und -abbauenden Enzyme kodieren. Allein der Prozentsatz der für diese Arbeit relevanten Glykosid-Hydrolasen übersteigt den anderer Prokaryoten bei weitem. Die biochemischen Charakteristika vieler dieser Enzyme wurden in den letzten Jahren aufgeklärt, aber die physiologische Rolle der überwiegenden Mehrheit der Proteine liegt noch immer im Dunkeln. *T. maritima* besitzt mit AmyA-Tm (extrazellulär), AmyB-Tm (intrazellulär) und AmyC-Tm (intrazellulär) drei Enzyme, die zu den mechanistisch gut untersuchten α -Amylasen gehören (Liebl *et al.*, 1997; Fütterer, 2001). Die Enzymklasse der α -Amylasen (EC 3.2.1.1) greift α -1,4-glykosidische Bindungen in aus Glukose-Einheiten bestehenden Poly- und Oligosacchariden (α -Glukanen) mit einem Endo-Mechanismus, d.h. an einer beliebigen Stelle des Moleküls, an. So werden Maltodextrine von variierender Länge hydrolytisch vom Substrat abgespalten. *Anaerobranca gottschalkii* besitzt zwei α -Amylasen, AmyA-Ag (extrazellulär) und AmyB-Ag (intrazellulär) (Prowe, 1996). In *Thermus thermophilus* konnte dagegen noch kein einziges für eine α -Amylase kodierendes Gen gefunden werden (Henne *et al.*, 2004).

1. Die intrazelluläre α -Amylase AmyB-Tm aus *Thermotoga maritima*

1.1. Biochemische Untersuchungen von AmyB-Tm und AmyB-Tt

Das rekombinante AmyB-Tm-Enzym hydrolysiert als bevorzugte Substrate Amylose und lösliche Stärke, aber auch Amylopektin und β -Grenzdextrin werden abgebaut. Die Abbauprodukte sind Glukose, Maltose und Maltooligosaccharide. Maltodextrine mit einer Länge von drei und mehr Glukoseeinheiten werden ebenfalls hydrolysiert, während Glykogen und β -Cyclodextrin nur mit geringer Effizienz abgebaut werden. Als Hauptprodukt bei der Hydrolyse gradzahliger Maltooligosaccharide entsteht Maltose, die von diesem Enzym nicht weiter gespalten wird. Somit kann eine α -Glukosidase-Aktivität des Enzyms ausgeschlossen werden. Weiterhin stellen Panose und Isomaltose keine Substrate für AmyB-Tm dar. Dies belegt, in Übereinstimmung mit der Unfähigkeit Pullulan abzubauen, daß α -1,6-glykosidische Bindungen nicht von AmyB-Tm gespalten werden können. Aufgrund der spezifischen Spaltung von intramolekularen α -1,4-glykosidischen Bindungen wurde AmyB-Tm als α -Amylase charakterisiert. Die höchste Aktivität des Enzyms wurde mit löslicher Stärke als Substrat bei 90 °C, pH 8,5 und einem Zusatz von 10 mM DTT ermittelt (Fütterer, 2001).

Das rekombinant aus *E. coli* BL21(DE3)/pET21c::TT-AB aufgereinigte AmyB-Tt-Protein, dessen Aminosäuresequenz 32 % Identität mit der von AmyB-Tm aufweist, erreichte sein Aktivitätsmaximum mit löslicher Stärke als Substrat bei 70 °C, pH 6,5 und dem Zusatz von 1 mM DTT (s. III.9.5). Das Maximum an Aktivität von AmyB-Tt liegt damit etwa im Temperaturbereich des Wachstumsoptimums von *T. thermophilus*, der aerob bei 75 °C und pH 7,0 wächst (Oshima und Imahori, 1974). AmyB-Tm dagegen erreicht sein Maximum an Aktivität bei 90 °C, und liegt damit ebenfalls im Wachstumsbereich von *T. maritima* (Huber *et al.*, 1986). Trotz ihrer Struktur- und Sequenzähnlichkeit unterscheiden sich die Enzyme demnach in ihren physikochemischen Charakteristika, was als evolutionäre Anpassung der Enzyme an die Lebensumstände der Organismen gedeutet werden kann.

In kinetischen Experimenten mit löslicher Stärke als Substrat wurde für AmyB-Tm eine maximale Geschwindigkeit (V_{\max}) von 1,3 U/mg und ein K_m -Wert von 1,1 mg/ml bestimmt (s. III.3.1.2). Im Kontrast dazu stehen von Fütterer (2001) ermittelte Werte für V_{\max} von 25 U/mg und K_m von 8,7 mg/ml. Im Verlauf dieser Arbeit zeigte die Aktivität des aufgereinigten Enzyms je nach Charge starke Schwankungen; es wurden spezifische Aktivitäten von 0,2 bis 0,6 U/mg gemessen. Fütterer erzielte spezifische Aktivitäten von bis zu 5 U/mg.

Offenbar liegt AmyB-Tm nach der Aufreinigung in einem nicht optimalen Zustand vor. SDS-PAGE-Analysen von Zellfraktionen nach dem Aufschluß zeigten, daß ein ungewöhnlich hoher Anteil an unlöslichem Protein im Zellpellet vorlag (s. III.2.1. und III.2.2). Dies deutet auf Schwierigkeiten bei der Faltung des rekombinanten Proteins hin. Möglicherweise liegt auch ein Teil des löslichen Proteins in einer falschen Konformation vor. Für gewöhnlich werden thermophile Proteine in mesophilen Bakterien korrekt gefaltet, was diese zu geeigneten, weil einfach zu handhabenden, heterologen Wirten macht (Bertoldo und Antranikian, 2001). Auch das mesophile, AmyB-homologe Protein aus *Anabaena* sp., das von Arthur (2003) in *E. coli* exprimiert wurde, lag vollständig in unlöslicher Form vor. Dies spricht dafür, daß die Ursache für die Instabilität von AmyB-Tm nicht in der Thermophilie des Proteins, sondern im heterologen Expressionssystem zu suchen ist. Ein Wechsel des Expressionswirtes von *E. coli* zu *C. glutamicum* konnte jedoch die Aktivität von AmyB-Tm nicht erhöhen (s. III.2.4). Eine Ursache für die große Empfindlichkeit von AmyB-Tm gegenüber hohen Expressionsraten könnte sein, daß das Protein in *T. maritima* auf besondere Faltungshelfer angewiesen ist, die es in heterologen Wirtssystemen nicht vorfindet.

Möglicherweise fehlt dem Protein auch ein für die Aktivität nötiger Cofaktor, der entweder im heterologen Wirt gar nicht oder nur in zu geringem Umfang bereitgestellt wird, oder der während der Aufreinigung des Proteins verloren geht. Die Aktivität von sauberem AmyB-Tm

ließ sich nicht mit *E. coli*-Rohextrakt steigern, wie dies z.B. bei der α -Glukosidase AgIA aus *T. maritima* möglich war. Bei der Aufreinigung von AgIA waren für die Enzym-Aktivität wichtige Cofaktoren verloren gegangen, die jedoch durch Zugabe von *E. coli*-Zellextrakt komplementiert werden konnten (Raasch, 2001). Sollte AmyB-Tm ein Cofaktor für die Aktivität fehlen, wird dieser entweder im Expressionswirt nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen in ausreichender Menge hergestellt, oder er kann, einmal aus dem Protein entfernt, nicht wieder zugeführt werden.

Gleiches gilt für AmyB-Tt. Die gemessene Aktivität ist mit 40 mU/mg ist im Vergleich mit anderen intrazellulären α -Amylasen sehr gering, so daß auch hier ein nicht optimaler Zustand des Proteins nach der Aufreinigung nahe liegt (vergl. IV.1.7, Tab. 15). Da beide Enzyme intrazellulär lokalisiert sind, ist eine Aktivität, wie sie bei extrazellulären α -Amylasen beobachtet wurde, nicht zu erwarten. Solche Aktivitäten können durchaus im Bereich von 5600 U/mg liegen, wie für die native AmyA aus *T. maritima* gezeigt wurde (Liebl *et al.*, 1997). Während der Zweck extrazellulärer Amylasen darin liegt, Stärke als Nahrungsquelle möglichst schnell durch Abbau zu erschließen, ist bei einem intrazellulären Enzym eine schnelle, schwer zu steuernde Reaktion nicht von Vorteil. Die je nach Aufreinigung stark schwankende Aktivität von AmyB-Tm deutet jedoch auf Probleme während der Expression oder der Aufreinigung hin.

Im SDS-PAGE-Gel des gereinigten AmyB-Proteins ist neben der AmyB-Hauptbande eine zweite, schwächere Bande zu sehen, unabhängig vom Expressionssystem oder Wirtsorganismus (s. III.2.1 und III.2.4). Da sie oberhalb der Hauptbande läuft, kann es sich nicht um ein Abbauprodukt des Enzyms handeln. Auch Protein, das eine Gelfiltration durchlaufen hatte und dort als Einzelpeak detektiert worden war, erschien in der SDS-PAGE als Doppelbande. Es könnte sich hierbei um vom Expressionswirt modifiziertes Protein handeln. Da jedoch in der Aminosäuresequenz durch Datenbankvergleiche keine Modifikationsstelle gefunden wurde, und die Struktur von AmyB-Tm keine Elektronendichte aufweist, die einer Proteinmodifikation entsprechen würde, erscheint dies unwahrscheinlich. Posttranslational modifizierte Amylasen sind nur aus Eukaryoten bekannt. So liegen z.B. alle drei in *Aspergillus awamori* identifizierten α -Amylasen glykosyliert vor (Anindyawati *et al.*, 1998). Modifizierte, bakterielle Amylasen sind nicht bekannt.

Das Auftreten der Doppelbande beruht möglicherweise auf einer unvollständigen Denaturierung des AmyB-Proteins im SDS-Auftragspuffer. Interessanterweise verändert sich das Verhältnis von Neben- und Hauptbande im Gel dramatisch, wenn AmyB-Tm kristallisiert. Wird der AmyB-Tm Kristall in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst und einer SDS-PAGE unterworfen, sind beide

Banden etwa gleich stark (s. III.3.6, Abb. 35). Dies spricht dagegen, daß es sich bei der Doppelbande um ein reines Denaturierungsartefakt handelt.

Es konnte gezeigt werden, daß sich die Aktivität von AmyB-Tm durch Reduktionsmittel erheblich steigern ließ. Dabei spielte es eine untergeordnete Rolle, ob es sich um das Reduktionsmittel DTT, L-Cystein oder β -Mercaptoethanol handelte. Entscheidend war offenbar der Redoxzustand des Reaktionsansatzes. Als optimal wurde ein Zusatz von 10 mM DTT ermittelt (s. III.3.2). Eine Abhängigkeit der Aktivität von DTT ist auch von der α -Glukosidase AglA aus *T. maritima* und *T. neapolitana* bekannt. Beide Enzyme sind Mangan-abhängig und benötigen eine DTT-Konzentration von 50 mM (Bibel *et al.*, 1998; Raasch, 2001). Auch die Aktivität der α -Glukosidase MalA aus *T. neapolitana* läßt sich durch eine DTT-Konzentration von 10 mM steigern (Veith, 2001). Die Funktion des Reduktionsmittels ist in diesem Fall noch nicht geklärt. Die β -Glukosidasen aus *Bacillus polymyxa* und der Nierenrinde der Ratte hingegen werden durch DTT in einer Konzentration von 5 bzw. 10 mM gehemmt (Painbeni *et al.*, 1992; Glew *et al.*, 1976). Auf Enzyme, deren Stabilität auf der Ausbildung von Disulfidbindungen beruht, wirkt DTT durch seine reduzierende Wirkung auf die Cysteinreste destabilisierend und deaktivierend, was z.B. für die Phytase PhyA aus *Aspergillus niger* nachgewiesen werden konnte (Wang *et al.*, 2004). Da AmyB-Tm zwei Cysteinreste in den Positionen 142 und 186 besitzt, die auch in der COG1543 weitestgehend konserviert sind, wurde vermutet, daß DTT die reaktiven Thiolgruppen vor dem Angriff von Sauerstoff schützt. Beide Cysteine liegen nahe am aktiven Zentrum und könnten eine Rolle bei der Katalyse spielen. Alternativ könnte ihre Oxidation sich negativ auf die Polypeptidstruktur in dieser wichtigen Region auswirken.

Auch die Aktivität von AmyB-Tt ließ sich durch DTT steigern. Allerdings erwies sich hier eine weit geringere Menge von 1 mM DTT als optimal (s. III.9.5). Im Gegensatz zu AmyB-Tm enthält das Protein aus *T. thermophilus* keine Cysteinreste. Damit wird die ursprüngliche Annahme, AmyB-Tm brauche DTT, um die beiden im Protein enthaltenen Cysteine in einem reduzierten Zustand zu halten, zumindest teilweise entkräftet. Möglicherweise spielt DTT eine Rolle für den Redoxzustand des im Protein nachgewiesenen Eisen-Cofaktors (vergl. IV.1.6)

1.2. Abhängigkeit der AmyB-Tm-Aktivität von Metallionen

AmyB-Tm erwies sich als ungewöhnlich empfindlich gegenüber komplexierenden Agenzien. So wurde bereits durch den Zusatz von 0,1 mM EDTA die Aktivität komplett inhibiert. Die Aktivität konnte durch die Zugabe von 1 mM Kalzium teilweise rekonstituiert werden.

Generell jedoch hemmte die Anwesenheit von Kalzium oder Magnesium die Aktivität von AmyB-Tm (s. III.9.3). Diese Beobachtung und der Hinweis auf eine oft bei Amylasen beobachtete Kalzium-Abhängigkeit des Enzyms, der sich aus der Rekonstitution der inhibierten Aktivität ergab, scheinen sich zu widersprechen. Offenbar wird durch das EDTA ein anderes, zweiwertiges Metallion aus dem Enzym gelöst, was die Inhibierung des Enzyms zur Folge hat. Es ist vorstellbar, daß durch die Zugabe eines Kalziumüberschusses dieses Metallion zumindest teilweise aus dem Komplex mit EDTA verdrängt wird, und somit wieder für AmyB-Tm verfügbar ist, was zu einer Erhöhung der Aktivität führt. Fütterer (2001) konnte mit Thermoaktivierungskinetiken zeigen, daß Kalzium langfristig einen destabilisierenden Einfluß auf AmyB-Tm hat. Nach 6 h Präinkubation des Enzyms bei 90 °C lag die Aktivität ohne Zusatz bei ungefähr 80 % und mit 10 mM Ca^{2+} bei etwa 60 %. Auch hier scheint es möglich zu sein, daß Kalzium im Verlauf der Präinkubationszeit einen essentiellen Cofaktor des Enzyms verdrängt. Neben Ca^{2+} und Mg^{2+} hatten auch Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} und Ba^{2+} in der jeweiligen Konzentration von 5 mM einen hemmenden Effekt auf AmyB-Tm. Hierbei könnte es sich ebenfalls um den Effekt der Verdrängung eines vom Enzym benötigten Kations handeln. Die Hemmwirkung des Anions der eingesetzten Metallsalze spielt eine untergeordnete Rolle, wie Fütterer (2001) in Versuchen mit Sulfat- und Chloridionen zeigen konnte. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit gelang es durch biochemische und spektrometrische Methoden, den im AmyB-Protein gebundenen Metall-Cofaktor zweifelsfrei als Eisen zu identifizieren und zu quantifizieren (s. III.3.4, III.6.3).

Metallionen in Enzymen dienen verschiedenen Zwecken. So können sie stabilisierend auf das Enzym einwirken, eine Oligomerisierung vermitteln, oder an der Substratbindung bzw. der Katalyse beteiligt sein. Ein stabilisierender Effekt von Ca^{2+} und Zn^{2+} wurde von Savchenko *et al.* (2002) für eine α -Amylase aus *P. furiosus* beobachtet. Eine Zn^{2+} -vermittelte Trimerisierung konnte für die Arginase aus *Saccharomyces cerevisiae* festgestellt werden (Green *et al.*, 1991). Anhand einer Gelfiltrationsstudie und des Laufverhaltens in der Nativ-PAGE wurde nachgewiesen, daß AmyB-Tm als Dimer oder als Tetramer vorliegt (s. III.3.5). Da die Zugabe von 0,1 mM EDTA zum Probenauftragspuffer das Laufverhalten von AmyB-Tm in der Nativ-PAGE nicht beeinflussen konnte (s. III.3.5.2, Abb. 35), erscheint eine Rolle des Eisenatoms bei der Oligomerisierung des Enzyms unwahrscheinlich.

Die potentielle Bindestelle für Eisen in der Molekularstruktur von AmyB-Tm wurde in unmittelbarer Nähe (ca. 8 Å) zum katalytischen Zentrum lokalisiert, was eine Rolle bei der Substratbindung oder Katalyse plausibel erscheinen läßt (vergl. IV.1.6).

1.3. Inhibitorischer Effekt von Nukleotiden auf AmyB-Tm

Eine Aktivitätshemmung von AmyB-Tm wurde nicht nur durch EDTA, sondern auch durch ATP, GTP und ADP festgestellt (s. III.3.3). Auch diese Hemmung konnte durch Zugabe von Ca^{2+} teilweise aufgehoben werden. Dies deutet darauf hin, daß es sich bei der Inhibition des Enzyms durch Nukleotide um einen unspezifischer Effekt handelt, der auf die Komplexierung eines Metallions zurückzuführen ist. Weiterhin spricht die Tatsache, daß die Inhibition durch ATP oder GTP etwa gleich stark ist, sowie das Fehlen eines ATP-Bindemotivs in der AmyB-Sequenz gegen eine allosterische Regulation durch ATP.

Eine durch Ca^{2+} aufhebbare Hemmung der Enzymaktivität durch ATP und ADP wurde auch für die extrazelluläre Trehalase des Pilzes *Humicola grisea* beschrieben (Zimmermann *et al.*, 1990). Dieses Enzym ist ebenso wie AmyB-Tm gegenüber EDTA empfindlich, was vermutlich ebenfalls für einen unspezifischen Komplexierungseffekt spricht. Im Gegensatz dazu sind Enzyme, die mutmaßlich durch ATP allosterisch gehemmt werden, gegenüber EDTA unempfindlich, wie bei der Phospho- β -Galaktosidase aus *Streptococcus mutans* gezeigt wurde (Calmes und Brown, 1979). Das bislang einzige amylytische Enzym, für das eine Inhibition durch ATP beschrieben wurde, ist ein Glykogen-Entzweigungsenzym (α -1,6-Glukosidase) aus dem Rinderhirn (Narahara *et al.*, 2001) Ob es sich hier allerdings um einen echten allosterischen Effekt handelt, ist fraglich, da der Einfluß von EDTA auf das Enzym nicht geprüft wurde.

Neben der beschriebenen Hemmung durch Nukleotide beobachtete Fütterer (2001) auch eine Aktivitätssteigerung von AmyB-Tm auf etwa 140 % durch 5 mM cAMP. Der Effekt konnte in dieser Arbeit nicht reproduziert werden. In Gram-negativen Bakterien spielt cAMP eine essentielle Rolle bei der transkriptionellen Kontrolle vieler Gene. Es steht in einem komplexen regulatorischen Zusammenhang mit der Aufnahme von Sacchariden durch das Phosphoenolpyruvat-abhängige Phosphotransferase-System (PEP-PTS). Beim spezifischen PTS-Transport in die Zelle wird z. B. Glukose phosphoryliert, und durch die folgende Phosphorylierungs-Kaskade hat der Typ der aufgenommenen Zucker Einfluß auf die cAMP-Bildung durch die Adenylat-Cyclase. In Abwesenheit von Glukose ist der cAMP-Spiegel hoch, in Anwesenheit von Glukose niedrig. Durch das System der Katabolitrepression (Crp) hat die cAMP-Konzentration einen indirekten regulatorischen Einfluß auf die Transkription unter anderem einer ganzen Reihe von Genen des Zuckerstoffwechsels. Das nahe mit *T. maritima* verwandte Bakterium *T. neapolitana* besitzt, obwohl Gram-negativ, kein PEP-PT-System (Galperin *et al.*, 1996). Für *T. neapolitana* konnte ebenfalls gezeigt werden, daß der Organismus eine cAMP-unabhängige Katabolitrepression besitzt und unabhängig von der

C-Quelle im Medium stets die gleichen niedrigen cAMP-Konzentrationen vorliegen (Vargas und Noll, 1996). Diese Daten lassen sich uneingeschränkt auf *T. maritima* übertragen. Aufgrund der für *T. maritima* fehlenden Bedeutung von cAMP bei der transkriptionellen Regulation der Zuckerverwertung erscheint es unwahrscheinlich, daß gerade cAMP eine Rolle in der allosterischen Regulation des Zuckermetabolismus spielen sollte. Auch entsprechen die von Fütterer bei der Aktivitätssteigerung von AmyB-Tm eingesetzten Mengen von 5 mM nicht physiologischen Bedingungen. Die von Vargas und Noll (1996) gemessenen cAMP-Mengen in *T. neapolitana* Zellen lagen zwischen 44 und 280 fmol pro mg Zellprotein. Bei der von Fütterer gezeigten Aktivitätssteigerung handelt es sich also vermutlich um einen unspezifischen Effekt.

1.4. AmyB-Tm als Protein der GHF 57

Thermotoga maritima besitzt, obwohl auf Basis der phylogenetischen Einordnung eher als primitiv anzusehen, ein großes Repertoire an Glykosidhydrolasen. Die Klassifizierung von Glykosidhydrolasen erfolgt einerseits aufgrund ihrer Substratspezifität und andererseits aufgrund der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der Enzyme. Eine Gliederung nach ersterem Kriterium, bei der strukturelle Aspekte nicht berücksichtigt werden, erfolgt durch die IUB-MB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*). Oft mangelt es jedoch an einer eindeutigen Substratpräferenz der Enzyme, da häufig Nebenaktivitäten vorhanden sind. Unter *in vitro* Bedingungen können die Parameter des Versuchsaufbaus einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Substratpräferenz der Enzyme haben. Die Klassifizierung nach Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit in der *Carbohydrate-Active Enzymes* (CAZY)-Datenbank umgeht diese Problematik (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>; Henrissat, 1991; Henrissat und Bairoch, 1996). Mit dieser Zuordnung wird den strukturellen Eigenschaften der Enzyme, die in direkter Beziehung zur Aminosäuresequenz stehen, Rechnung getragen. Zusätzlich wird die evolutionäre Beziehung zwischen Enzymen unterschiedlicher Substratspezifität deutlich.

Zur Zeit umfaßt die CAZY-Datenbank 99 Glykosid-Hydrolase-Familien (GHF). Proteine, die wie die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme als α -Amylasen (EC 3.2.1.1) klassifiziert wurden, sind in den Familien 13 und 57 zu finden. Während Familie 57 momentan 52 Proteine umfaßt, wird die gut untersuchte GHF 13 von 2014 zum Großteil putativen Proteinen gebildet und stellt damit die größte Glykosid-Hydrolase-Familie dar. Die *A. gottschalkii* Amylasen AmyA-Ag und AmyB-Ag sind aufgrund ihrer Aminosäuresequenz beide in die GHF 13 einzuordnen.

Die α -Amylasen AmyB-Tm aus *T. maritima* und AmyB-Tt aus *T. thermophilus* haben keinerlei Ähnlichkeit zur ‚ α -Amylase-Familie‘ GHF 13. Sie weisen große strukturelle Analogien zur 4- α -Glukanotransferase aus *T. litoralis* (Imamura *et al.*, 2003) auf, welche ein Vertreter der GHF 57 ist. In dieser Familie sind neben α -Amylasen und 4- α -Glukanotransferasen (EC 2.4.1.25) auch α -Galaktosidasen (EC 3.2.1.22) und Amylopullulanasen (3.2.1.41) zu finden. Bislang jedoch wurden nur sieben Vertreter der Familie biochemisch charakterisiert.

Die Übereinstimmung von AmyB-Tm und der GHF 57 ist auf Aminosäuresequenz-Ebene nur gering. Der Versuch, die Enzyme der COG1543 in die GHF 57 einzugliedern zeigt, daß diese innerhalb der GHF 57 eine distinkte Unterfamilie bilden (Abb. 68). Ebenso ist aus dem Phylogramm ersichtlich, daß die GHF 57 in drei Unterfamilien zerfällt, die von jeweils einer Gruppe von Enzymen mit gleichem Reaktionstypus gebildet werden. Aufgrund der insgesamt niedrigen Homologie der COG1543-Proteine zu denen der GHF 57 ist es möglich, daß die COG1543 eine eigene, zweifellos nahe mit der GHF 57 verwandte GHF darstellt.

Die meisten Glykosidasen enthalten ein $(\beta/\alpha)_8$ -Faß, eine der am weitesten verbreiteten Supersekundärstrukturen überhaupt, als gemeinsames Faltungsmotiv (Orengo *et al.*, 1997; Nagano *et al.*, 2001). Dieses besteht aus je acht alternierenden β -Strängen und α -Helices. Die β -Stränge bilden, ähnlich den Dauben eines Fasses, ein paralleles β -Faltblatt um einen Hohlraum in der Mitte. Die α -Helices umgeben das so gebildete Faß an der Außenseite. Diese charakteristische Form war namensgebend für das $(\beta/\alpha)_8$ -Faß oder TIM-*barrel*, wie es nach der Triosephosphat-Isomerase, bei der es zuerst beobachtet wurde, auch genannt wird. Die große Mehrheit der Glykosid-Hydrolase-Familien, deren Molekularstruktur bekannt ist, besteht aus Proteinen mit einem solchen Faltungsmotiv, darunter auch die ‚ α -Amylase Familie‘ GHF 13.

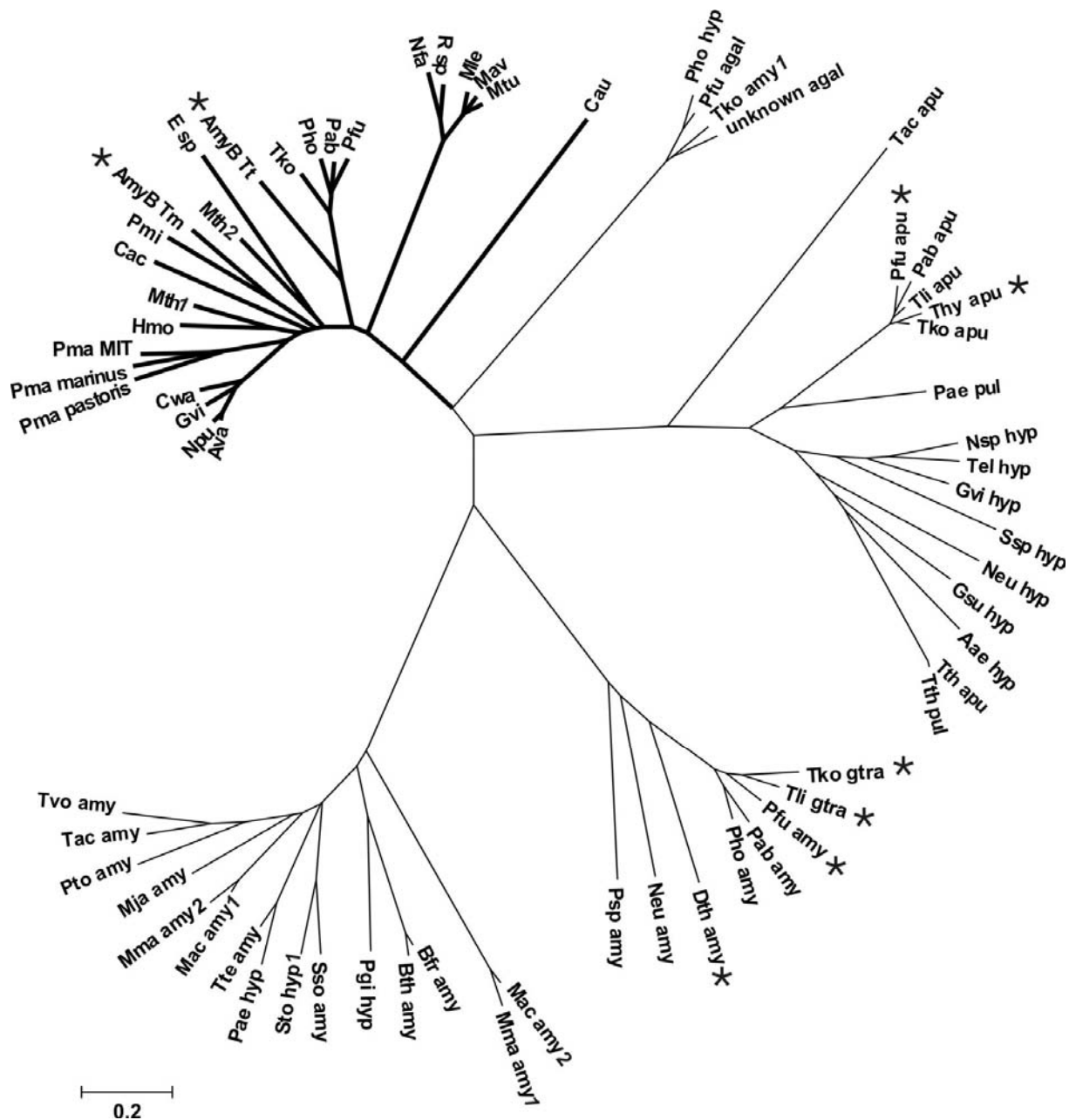


Abb. 68: Phylogenetische Analyse der GHF 57 und der COG1543 Proteine auf Basis der Aminosäuresequenzen. Das Phylogramm wurde mit dem Programm Mega 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) aus einem ClustalW-Alignment mit der *Neighbor Joining*-Methode erstellt. Der aus den AmyB-ähnlichen Proteinen der COG1543 gebildete Zweig ist durch dicke Linien gekennzeichnet. Biochemisch charakterisierte Enzyme sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Die Beschriftung der GHF 57 Proteine bezieht sich auf den Herkunftsorganismus und ihre Funktion, die Beschriftung der COG1543 Proteine bezieht sich nur auf ihren Herkunftsorganismus. Amy, α -Amylase; apu, Amylopullulanase; gtra, 4- α -Glukanotransferase; agal, α -Galaktosidase; hyp, hypothetisches Protein. Die Bezeichnungen der Organismen können Tab. 3 (COG1543, s. III.1.2) bzw. der Auflistung der GHF 57-Proteine im Anhang entnommen werden.

Die Strukturaufklärung von AmyB-Tm zeigte, daß das Enzym ein verzerrtes, siebensträngiges (β/α)-Faß besitzt. Im Gegensatz zum (β/α)₈-Faß ist dieses Motiv sehr selten. Bisher konnte laut SCOP-Datenbank (*Structural Classification of Proteins*, <http://scop.berkeley.edu>) eine solche Supersekundärstruktur erst in elf Proteinstrukturen gefunden werden (Murzin *et al.*, 1995; Andreeva *et al.*, 2004). Dabei handelt es sich neben AmyB-Tm um vier eukaryotische Cellulasen, eine putative Phosphoesterase-Domäne (YcdX) aus *E. coli*, eine putative Polysaccharid-Deacetylase (PdaA) aus *B. subtilis*, zwei α -Mannosidasen aus *Bos taurus* und *Drosophila melanogaster*, die der GHF 38 angehören, eine Hyaluronidase aus *Apis mellifera*, die der GHF 56 angehört, und die 4- α -Glukanotransferase aus *T. litoralis*, die zur GHF 57 gehört (Spezio *et al.*, 1993; Zou *et al.*, 1999; Varrot *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2000; Teplyakov *et al.*, 2003; van den Elsen *et al.*, 2001; Heikinheimo *et al.*, 2003; Forouhar *et al.*, nicht publ.; Markovic-Housley *et al.*, 2000; Imamura *et al.*, 2003). Interessanterweise handelt es sich hierbei mit Ausnahme der Phosphoesterase um Polysaccharid-abbauende oder -modifizierende Enzyme. Auch das Protein AmyB-Tt, dessen Molekularstruktur in der RCSB Protein Datenbank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) hinterlegt ist, enthält ein solches (β/α)₇-Faß (Iufa, Idaka *et al.*, nicht publ.). Aufgrund der sehr hohen Sequenzähnlichkeit der anderen COG1543-Proteine mit AmyB-Tm und AmyB-Tt kann man davon ausgehen, daß sich das Faltungsmotiv des (β/α)₇-Fasses auf die gesamte COG1543 übertragen läßt. Es kann darüber spekuliert werden, ob das (β/α)₇-Motiv eine Variation des (β/α)₈-Fasses darstellt und aus dieser weit verbreiteten Struktur evolutionär hervorgegangen ist. Abb. 69 zeigt die Faßstrukturen der TAKA-Amylase (GHF 13), der GTase aus *T. thermophilus* (GHF 57) und von AmyB-Tm im Vergleich.

Bisher ist neben der GHF 57 nur von den Glykosid-Hydrolase-Familien 38 und 56 ein (β/α)₇-Faß bekannt. Die GHF 56 umfaßt 48 ausschließlich eukaryotische Hyaluronidasen (EC 3.2.1.35). Die GHF 38 wird von 136 Proteinen gebildet, bei denen es sich, sofern ihre Funktion bekannt ist, ausschließlich um α -Mannosidasen (EC 3.2.1.24, EC 3.2.1.114) handelt. Imamura *et al.* (2003) vermuten aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit, daß die GH-Familien 57 und 38 einen gemeinsamen evolutionären Ursprung haben. Diese Verwandtschaft wird dadurch untermauert, daß sich die katalytischen Reste der α -Mannosidase aus dem Golgi-Apparat von *Drosophila melanogaster* mit denen der Glukanotransferase aus *T. litoralis* in ihrer räumlichen Lage im Enzym decken.

Aufgrund der vergleichsweise hohen Zahl an archaeellen und eukaryotischen Proteinen wurden die GHF 57 und GHF 38 von Imamura *et al.* (2003) als archaelle bzw. eukaryotische Glykosid-Hydrolase Familien bezeichnet. Mit der steigenden Anzahl sequenzierter

bakterieller Genome und dem damit verbundenen Anstieg an bekannten Proteinsequenzen ist jedoch der Anteil an prokaryotischen Proteinen in diesen Familien gestiegen, so daß bei den GHFs 38 und 57 von exklusiv eukaryotischen oder archaeellen Glykosid-Hydrolase-Familien keine Rede mehr sein kann. Weitere Strukturaufklärungen werden zeigen, ob das $(\beta/\alpha)_7$ -Faß als gemeinsame Struktur der GHFs 38, 56 und 57 bestätigt werden kann.

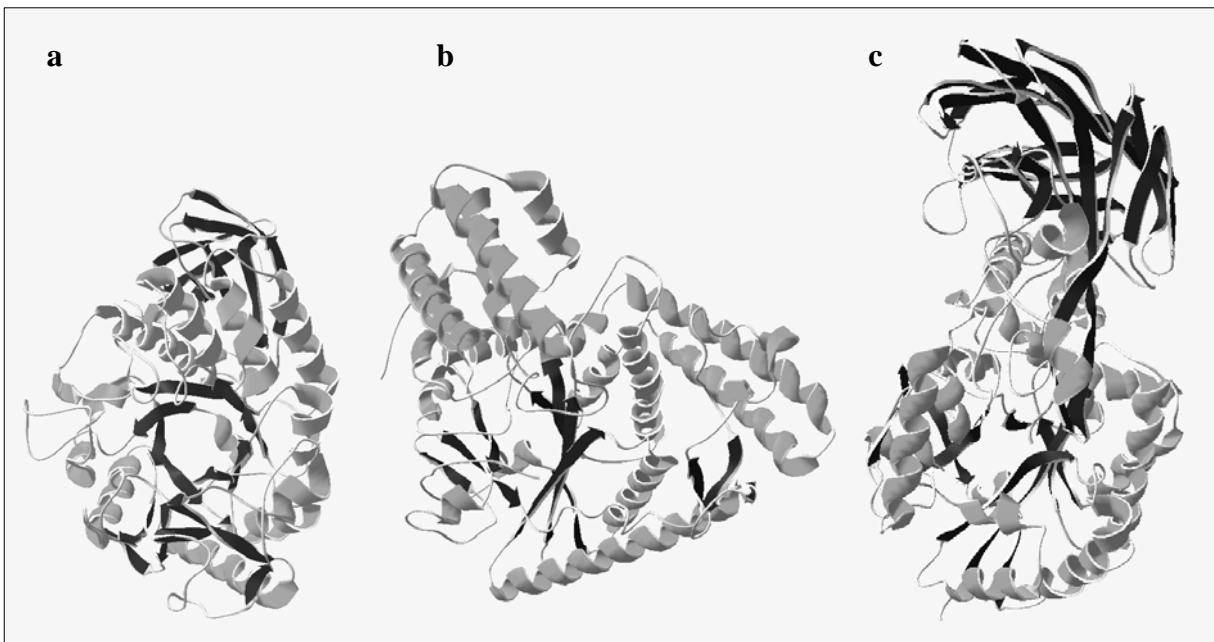


Abb. 69: Proteinstrukturen a) der TAKA-Amylase, GHF 13 (Brzozowski *et al.*, 1997), b) des AmyB-Tm-Proteins und c) der 4- α -Glukanotransferase aus *T. litoralis*, GHF 57 (Imamura *et al.*, 2003).

1.5. Das katalytische Zentrum von AmyB-Tm

Die enzymatische Hydrolyse von Glykosidbindungen basiert, von Sonderfällen (GHF 4) abgesehen, auf zwei möglichen Mechanismen. Entweder wird durch einen einstufigen Katalysemechanismus (*single displacement*) die Konformation des anomeren Kohlenstoffatoms beibehalten (Retention) oder durch einen zweistufigen Mechanismus (*double displacement*) umgekehrt (Inversion). In beiden Fällen haben die katalytischen Aminosäurereste endständige Carboxylgruppen, d.h. es handelt sich um Aspartat oder Glutamat. Die für diese Arbeit relevanten Enzymklassen der α -Amylasen und 4- α -Glukanotransferasen haben einen Katalysemechanismus, der eine Retention der Konformation des anomeren C-Atoms zur Folge hat.

Bei retendierenden Glykosid-Hydrolasen läuft folgender Zweischrittmechanismus ab. Die als Säure/Base-Katalyst fungierende Carboxylgruppe protoniert im ersten Schritt das

Sauerstoffatom der glykosidischen Bindung. Die als Nukleophil agierende Carboxylgruppe greift dann das anomere Zentrum des Zuckersubstrats an und bildet ein Glykosyl-Intermediat. Im zweiten Schritt wird das Akzeptor-Molekül durch die Säure/Base-Funktion deprotoniert und der Aglykonrest darauf übertragen, d.h. der Rest, der über eine glykosidische Bindung mit der reaktiven Gruppe des Zuckers (Glykon), von dem die glykosidische Bindung ausgeht, verknüpft ist. Als Akzeptor kann ein Wassermolekül (Hydrolyse), ein anderes Zuckermolekül (Transglykosylierung) oder ein Phosphatmolekül (Phosphorolyse) fungieren (Sinnot, 1990; McCarter und Withers, 1994; Davies und Henrissat, 1995).

Für die 4- α -Glukanotransferase aus *T. litoralis* wurden Glu123 und Asp214 als katalytische Reste identifiziert (Imamura *et al.*, 2001; Imamura *et al.*, 2003), wobei Glu123 als Nukleophil agiert und Asp214 die Säure/Base-Funktion darstellt. Durch Vergleich der Primär- und Tertiärstruktur von AmyB-Tm mit der der Glukanotransferase konnten in AmyB-Tm Glu185 und Asp349 als Nukleophil bzw. Säure/Base-Funktion identifiziert werden (s. III.7.2). Daher läßt sich ein retendierender Mechanismus der Katalyse unter Beteiligung von Glu185 und Asp349 postulieren. Im Unterschied zur Glukanotransferase, die eine Transglykosylierung katalysiert, dient bei der α -Amylase AmyB-Tm, die die glykosidische Bindung hydrolysiert, H₂O als Akzeptor des Aglykonrests (Abb. 70).

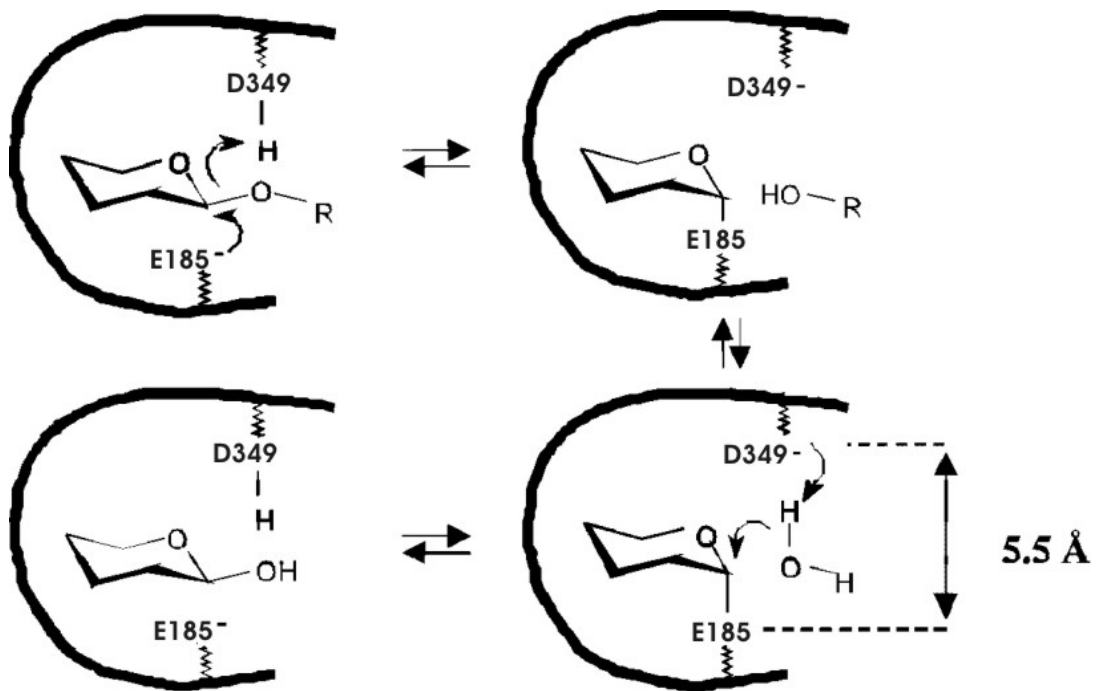


Abb. 70: Mutmaßlicher Mechanismus der Katalyse im katalytischen Zentrum von AmyB-Tm. R steht als Platzhalter für einen α -Glukanrest (nach Davies und Henrissat, 1995, modifiziert).

Analog zu AmyB-Tm lassen sich für AmyB-Tt Glu184 und Asp352 als katalytische Reste identifizieren (s. III.7.2). Sowohl der Glutamat- als auch der Aspartatrest sind in der GHF 57 hoch konserviert. Das Gleiche gilt für beide Aminosäuren und ihre Umgebung innerhalb der COG1543. Interessanterweise ist in der COG1543 auch das direkt auf das Glutamat folgende Cystein (Cys186) hochkonserviert, was für eine wichtige Rolle dieser Aminosäure im katalytischen Zentrum spricht. Das aktive Zentrum liegt bei TIM-*barrel* Enzymen immer am C-terminalen Ende des $(\beta/\alpha)_8$ -Fasses. Für α -Amylasen der GHF 13 bedeutet dies, daß der als Nukleophil fungierende Aminosäurerest immer am C-Terminus des β_4 -Stranges lokalisiert ist. Auch bei AmyB-Tm und der Glukanotransferase aus *T. litoralis* liegt das Nukleophil am C-Terminus des $(\beta/\alpha)_7$ -Fasses (Imamura *et al.*, 2003).

In der COG1543 sind unter anderem drei Histidinreste (His10, His12 und His146 in AmyB-Tm) hochkonserviert. Diese liegen ebenfalls in vielen GHF 57-Proteinen vor. Imamura *et al.* (2003) postulieren, daß zwei der entsprechenden Histidinreste der 4- α -Glukanotransferase (His11 und His13) mit der -1 *subsite* des Substrats interagieren und so an der Substratbindung während der Katalyse beteiligt sind. His11 formt dabei eine H-Brücke mit dem Substrat, während His13 indirekt über ein Wassermolekül mit dem Substrat interagiert. Auch für α -Amylasen der GHF 13 wird postuliert, daß zwei Histidinreste den Übergangszustand während der Katalyse an der *subsite* -1 stabilisieren (MacGregor *et al.*, 2001). Dies ist zumindest für die Amylase aus Gerste belegt (Sögaard *et al.*, 1993). In der Terminologie der TAKA-Amylase, der Modell-Amylase der GHF 13, sind dies die Histidinreste 122 und 296, die in den konservierten Regionen I und IV liegen. In der räumlichen Struktur ähneln sie in ihrer Lage zueinander und zum Substrat den Resten His12 und His146 aus AmyB-Tm. Im Widerspruch hierzu läßt die Lage der Histidinreste 10 und 12 in der AmyB-Tm-Struktur vermuten, daß diese Reste zusammen mit Cys146 und His142 ein Eisenzentrum bilden.

1.6. Eisen als Metallcofaktor von AmyB-Tm

Nachdem durch Komplexierungsexperimente bereits Hinweise auf die Gegenwart eines Metallions im AmyB-Tm Enzym vorlagen, konnte die Präsenz von Eisen im Protein sowohl biochemisch (s. III.3.4) als auch spektroskopisch (s. III.6.3) nachgewiesen werden. Es konnte jedoch keine Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Menge des im Enzym gebundenen Eisens festgestellt werden. Die zur Quantifizierung des Eisengehalts angewendete Methode erfaßt Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen gleichermaßen. Der ebenfalls beobachtete, positive Effekt von Reduktionsmitteln auf die Aktivität von AmyB-Tm läßt den Schluß zu, daß nicht nur die Anwesenheit von Eisen, sondern auch dessen Oxidationstufe von Bedeutung

für AmyB-Tm sein könnte. Unter den gegebenen Umständen würde das bedeuten, daß das im Enzym gebundene Eisenion in seiner reduzierten Form als Fe^{2+} vorliegen muß, um einen positiven Einfluß auf die Aktivität von AmyB-Tm zu haben.

Eisen ist ein unerwarteter Cofaktor der α -Amylase AmyB-Tm, da eine Bindung dieses Metalls bisher vor allem von Enzymen, die einen Elektronenfluß vermitteln, z.B. Oxidoreduktasen, bekannt ist. Als Cofaktor glykosidischer Enzyme ist Eisen bisher nicht in Erscheinung getreten. Viele α -Amylasen der GHF 13 sind Ca^{2+} -abhängig, wobei Ca^{2+} hier zur Stabilisierung der Enzyme beiträgt (Vihinen und Mäntsälä, 1989). So wird etwa die Thermostabilität der zweiten intrazellulären α -Amylase von *T. maritima* (AmyC) durch Ca^{2+} erhöht (Lim *et al.*, 2003). Auch die 4- α -Glukanotransferase aus *T. litoralis* bindet ein Ca^{2+} -Ion pro Untereinheit (Imamura *et al.*, 2003).

Von den α -Glukosidasen der GHF 4 ist bekannt, daß sie manganabhängig sind. So benötigt die α -Glukosidase Ag1A aus *T. maritima* 1 mM Mn^{2+} für maximale enzymatische Aktivität (Raasch *et al.*, 2000). Mit dem kürzlich aufgeklärten Mechanismus des Enzyms BglT (6-Phospho- β -Glukosidase) aus *T. maritima* konnten Varrot *et al.* (2005) zeigen, daß das Mangan bei diesem Enzym aus der GHF 4 sowohl an der Substratbindung, in diesem Fall pNP- β -Glukose-6-Phosphat, als auch im Zusammenspiel mit NAD^+ am katalytischen Mechanismus beteiligt ist. Diese Ergebnisse lassen sich vermutlich auf Ag1A übertragen.

In AmyB-Tm konnte eine potentielle Bindestelle für Eisen identifiziert werden, die in unmittelbarer Nähe zum katalytischen Zentrum des Enzyms liegt. Diese wird aus His10, His12, His146 und Cys142 oder Cys186 gebildet. Die Aminosäurereste His10 und His12 sind sowohl in den Proteinen der GHF 57 als auch der COG1543 durchgehend konserviert. Auch Cys186 und His146 sind in der COG1543 stark konserviert, während Cys142 häufig durch ein Serin substituiert ist. Ein Vergleich der räumlichen Struktur von AmyB-Tm mit der Liganden-Bindestellen-Datenbank des (*Patterns in Non-homologous Tertiary Structures*) PINTS-Servers zeigte, daß die räumliche Lage der Reste His10, His12, His146 und Cys142 Metall-Bindestellen aus diversen Oxidoreduktasen gleicht (<http://www.russell.embl.de/pints>, Stark *et al.*, 2003). Die so gefundenen ähnlichen Bindestellen koordinieren die Metalle Eisen, Kupfer, Kobalt oder Zink (Abb. 71).

Sollte das Eisenion in AmyB-Tm tatsächlich durch die genannten Aminosäurereste koordiniert werden, wäre es in unmittelbarer Nähe zu den katalytischen Seitenketten des Enzyms lokalisiert. Diese Lage würde eine Beteiligung an der Katalyse oder der Substratbindung implizieren. Eine Beteiligung an der Katalyse erscheint jedoch fraglich, da bei AmyB-Tm alle nötigen Funktionen für einen retendierenden Glykosid-Hydrolyse-

Mechanismus von den Resten Glu185 und Asp349 übernommen werden können. Sollten die Histidinreste His10 und His12 an der Substratbindung an der -1 *subsite* beteiligt sein (vergl. IV.1.5), könnte die potentielle Bindung von Eisen einer bestimmten Oxidationsstufe die Substratbindung stören. Linden *et al.* (2003) konnten für die α -Amylase PWA aus *Pyrococcus wosei* zeigen, daß die Bindung von Zn^{2+} an die -1 *subsite* die Aktivität des Enzyms inhibiert. Das gleiche konnten Boel *et al.* (1990) für Ca^{2+} bei einer α -Amylase von *Aspergillus niger* beobachten. Eine Behinderung der Substratbindung in der -1 *subsite* durch ein Eisenion, welches mit den die Bindung vermittelnden Histidin-Resten interagiert, könnte eine Erklärung für die schwankende Aktivität der AmyB-Aufreinigungen darstellen.

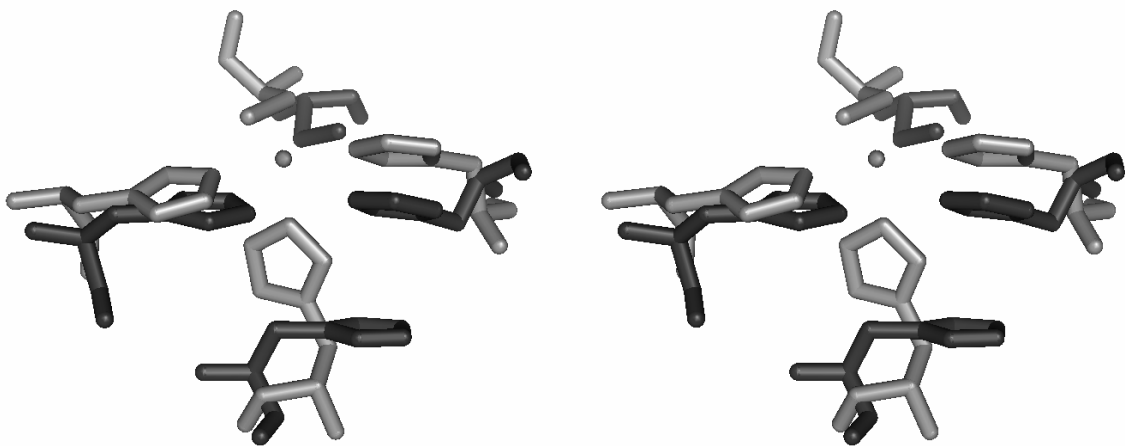


Abb. 71: Stereobild der Überlagerung der Aminosäurereste der potentiellen Eisenbindestelle von AmyB-Tm mit denen der Eisenbindestelle der Superoxid-Reduktase aus *P. furiosus* (1dqi) (Yeh *et al.*, 2000). Die Reste His10, His12, His146 und Cys142 von AmyB-Tm (dunkelgrau) entsprechen dabei den Eisen koordinierenden Resten His47, His41, His16 und Cys111 der Superoxid-Reduktase (hellgrau).

1.7. Die Rolle von AmyB-Tm im *T. maritima* Stoffwechsel

Da in der Sequenz von AmyB kein Signalpeptid gefunden wurde, und es keine Hinweise auf einen Export des Enzyms gibt, wird davon ausgegangen, daß es sich bei AmyB um eine cytoplasmatische α -Amylase von *T. maritima* handelt. Während die Funktion von extrazellulären Amylasen eindeutig im möglichst schnellen Abbau von Maltodextrinen und Stärke zur Erschließung als C-Quelle liegt, ist die Rolle von Amylasen im Zusammenspiel der intrazellulären Enzyme weniger eindeutig. Die biochemisch charakterisierten intrazellulären α -Amylasen unterscheiden sich in ihren Eigenschaften oft erheblich. Unterschiedliche *in vitro* Testmethoden und -bedingungen zur Charakterisierung der Aktivität machen die Eigenschaften der Amylasen schwer vergleichbar, und Schlüsse auf potentielle *in vivo* Funktionen fast unmöglich (Tab. 15).

Tab. 15: Eigenschaften ausgewählter intrazellulärer α -Amylasen.

| | AmyB-Tm (Tm1438) | AmyC-Tm (Tm1650) | AmyB-TT | AmyB-Ag | Amy 1 | AmyA | PFlA | TVAII |
|------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------|
| Organismus | <i>T. maritima</i> | <i>T. maritima</i> | <i>T. thermophilus</i> | <i>A. gottschalkii</i> | <i>D. thermophilum</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. furiosus</i> | <i>T. vulgaris</i> |
| Größe | 528 | 422 | 520 | 443 | 686 | 495 | - | 585 |
| kDA | 63 | 50 | 59 | 52 | 81 | 56 | 66 | - |
| Temperatur | 90 | 80 (70) | 70 | 55 | 90 | 45 | 100 | 40 °C |
| pH | 8,5 | 6,0 (7,0) | 6,5 | 6,0 | >5,5 | 7,2 | 7,0 | 6,0 |
| Substrate | Amylose, Stärke, Maltodextrine, β - Cyclodextrin | β -Grenzextrin Amylose | Stärke | Stärke, Maltodextrine β -Cyclodextrin | Stärke | Amylose, Stärke, Maltodextrine | Stärke, Maltodextrine | Amylose, Pullulan, Maltodextrine |
| Produkt | Maltodextrine, Maltose, Glukose | Maltose | - | Maltose, Maltotriose | Maltodextrine, Maltose, Glukose | Maltodextrine, Maltose, Glukose | Maltodextrine, Maltose, Glukose | Maltodextrine, Maltose, Glukose |
| Additive | 10 mM DTT | - | 1 mM DTT | - | - | - | - | - |
| Aktivität | 0,6 U/mg | 45 U/mg mit lösl. Stärke | 30 mU/mg mit lösl. Stärke | 220 U/mg mit lösl. Stärke | 0,87 U/mg mit lösl. Stärke | 120 U/mg mit lösl. Stärke | 37,5 U/mg mit lösl. Stärke | - |
| K_m | 1,07 mg/ml mit lösl. Stärke | 317 mg/ml mit β - Grenzextrin | - | - | - | - | 3,7 mg/ml mit Stärke | 0,0064 (mM) mit Amylose |
| Quartärstruktur | Dimer/Tetramer | Monomer/Dimer | - | Monomer | - | - | Dimer | - |
| GHF | 57 | 13 | 57 | 13 | 13 | 13 | 57 | 13 |
| Besonderheiten | Fe-Cofaktor, Hemmung durch Acarbose | - | - | - | - | - | Transferase Aktivität mit G2 und G3 | Hemmung durch Maltose und Panose |
| Referenz | Diese Arbeit und Fütterer, 2001 | Fütterer, 2001, Lim <i>et al.</i> , 2003 | Diese Arbeit | Ivanova, mündl. Mitteilung | Fukusumi <i>et al.</i> , 1988 | Raha <i>et al.</i> , 1992 | Laderman <i>et al.</i> , 1993 | Tonzuka <i>et al.</i> , 1995 |

Als Substrate für intrazelluläre Amylasen sind prinzipiell Maltodextrine und Glykogen denkbar. Maltodextrine werden im Zuge des extrazellulären Polysaccharidabbaus gebildet und durch das MalEFGK₂-Transportsystem in die Zelle geschleust. Glykogen dagegen ist ein von den Zellen gebildetes Speicherpolymer. Grundsätzlich wäre die Beteiligung von AmyB-Tm an beiden Stoffwechselwegen denkbar. Die Organismen, in denen AmyB-ähnliche Enzyme vorkommen (s. Tab. 6, III.1.2) sind in ihrer phylogenetischen Herkunft über das ganze Spektrum der Eubakterien verteilt, es finden sich darunter Cyanobakterien sowie Gram-positive Bakterien und Spirochaeten. Hinzu kommen mit mehreren *Pyrococcus*-Arten auch Archaeen. Eine Gemeinsamkeit aller Organismen ist die bewiesene oder durch Anwesenheit des Glykogensynthase-Gens vermutete Bildung von Glykogen als Speicherstoff, so daß aufgrund der Physiologie der Organismen, die ein AmyB-Tm-ähnliches Protein haben, weder eine Rolle im Glykogen- noch im Maltose-Stoffwechsel ausgeschlossen werden kann.

Glykogenmetabolismus

Im Genom von *T. maritima* liegen die für den Glykogenstoffwechsel nötigen Gene der Glykogensynthase (*tm0895*), der α -Glukan-Phosphorylase (*agpA*) und zweier Glukose-1-P Adenyltransferasen (*tm0239*, *tm0240*) vor, was darauf schließen läßt, daß der Organismus zur Bildung von Glykogen befähigt ist. Die α -Glukan-Phosphorylase AgpA (Bibel *et al.*, 1998) weist eine nahezu identische Aminosäuresequenz zu dem Protein Tm1168 auf. Interessanterweise wurde Tm1168 wie AmyB-Tm im Zuge der Genomsequenzierung als Protein mit einem ‚authentischen *frameshift*‘ bezeichnet und wird in der ERGO-Datenbank als zwei ORFs dargestellt (RTM02667/02666).

In *T. maritima* liegen im Gegensatz zu *E. coli* die Gene für Glykogensynthese und -abbau nicht in einem Cluster vor. Ein Verzweigungsenzym (‚*branching enzyme*‘) konnte in *T. maritima* noch nicht gefunden werden. Armbrecht (2003) spekulierte, daß der ORF *tm1844*, der Ähnlichkeit zu Genen von Isoamylasen und Verzweigungsenzymen aufweist, für das Verzweigungsenzym kodieren könnte. Das vorhergesagte Protein Tm1844 besitzt ein N-terminales Signalpeptid, was eine periplasmatische Lokalisierung des Genprodukts vermuten läßt. Die dadurch implizierte Lokalisierung des Glykogens im Periplasma ist jedoch fraglich, da weder die Glykogensynthase noch AgpA ein Signalpeptid für den Export ins Periplasma haben. Die Rolle des Verzweigungsenzyms scheint daher einem andern, bisher nicht charakterisierten Enzyme von *T. maritima* zuzufallen. Auch in *T. thermophilus* konnten die Gene für die Glykogensynthese und den Abbau gefunden werden. Bemerkenswert ist auch

hier, daß die Glykogen-Phosphorylase (TTC808) außerhalb des Glykogen-Synthese-Clusters (TTC1976-1981) liegt.

Die Bildung eines Speicherglukans durch *T. maritima* wurde in dieser Arbeit erstmalig biochemisch nachgewiesen. Es konnten etwa 56 mg α -Glukan /g Zellen (Naßgewicht) aus einer Kultur in der späten logarithmischen Wachstumsphase isoliert werden (s. III.5.2). Boeck und Schinzel (1998) konnten aus *T. thermophilus* in der gleichen Wachstumsphase 28 mg Glykogen /g Zellen isolieren.

Neben den essentiellen Enzymen des Glykogenabbaus, der Glykogen-Phosphorylase und der α -1,6-Glukosidase (Entzweigungsenzym), sind vermutlich weitere Enzyme an der Degradation von Glykogen und deren Regulation beteiligt. So können zum Beispiel α -Amylasen den Abbau des Polymers beschleunigen, indem sie α -1,4-Bindungen innerhalb des Moleküls hydrolysieren und so mehr reduzierende C4-Enden, d.h. Angriffspunkte für die Glykogen-Phosphorylase schaffen. Das genaue Zusammenspiel von Glykogen-degradierenden Enzymen liegt auch bei gut untersuchten Glykogenabbau-Systemen noch teilweise im Dunkeln. So spekuliert Pallen (2003) auf Basis von Aminosäuresequenz-Vergleichen, daß die α - und β -Untereinheiten der menschlichen Phosphorylase-Kinase (Phk) und die Phosphorylase-Kinase (PkgA) aus *E. coli* neben ihrer regulatorischen Funktion eine bislang übersehene glukoamylolytische Funktion haben könnten.

Wie die Genomsequenzierung zeigte, besitzt *T. maritima* viele intrazelluläre, amylytische Enzyme, für die eine Beteiligung am Glykogenmetabolismus denkbar wäre (Nelson *et al.*, 1999). Man kann davon ausgehen, daß Gene, deren Transkription durch Stärke induziert wird, Genprodukte kodieren, die am Abbau von Stärke bzw. der darauf folgenden Verstoffwechslung von Maltodextrinen beteiligt sind. Im Umkehrschluß könnten Gene, die in Anwesenheit von Stärke und Glukose keine oder nur geringe Änderungen in der Expressionsstärke zeigen, eine Rolle bei im Glykogenstoffwechsel spielen. Zu den intrazellulären Proteinen von *T. maritima*, deren Gene in Anwesenheit von Stärke oder Glukose keinen Expressionsunterschied zeigen und damit möglicherweise am Glykogenstoffwechsel beteiligt sind, gehören die MTase (Tm0767), AmyC (Tm1650), eine putative α -Glukosidase (Tm0752), zwei putative Typ I-Glykosyltransferasen (Tm0392, Tm0744), die Glykogensynthase (Tm0895) und überraschenderweise AglA (Tm1834), obwohl das Gen für letzteres mit diversen Genen des Stärkeabbaus in einem Cluster vorliegt. Die Expression anderer Gene dieses Clusters, *AmyA* (*tm1840*), *PulA* (*tm1845*) und *aglB* (*tm1835*), wird erwartungsgemäß in Anwesenheit von Stärke induziert (Chhabra *et al.*, 2003). Über die Expression des *amyB-Tm(Tm1438)*-Gens liegen bisher keine Erkenntnisse vor.

Es kann vermutet werden, daß sich die gesamte Kontrolle des Zuckerstoffwechsels von *T. maritima* von der des Modellorganismus *E. coli* unterscheidet. Indizien dafür sind die ungewöhnlich hohe Zahl an Kohlenhydrat-aktiven Enzymen, die hohe Zahl an spezifischen Zuckertransportern, das Fehlen eines PEP-PT-Systems und die dadurch cAMP-unabhängige Regulation der Katabolitrepression (Nelson *et al.*, 1999; Galperin *et al.*, 1996; Vargas und Noll, 1996). Auch bei *T. thermophilus* konnten bisher keine Gene gefunden werden, die für Komponenten des PEP-PT-Systems kodieren (Henne *et al.*, 2004).

Für *T. thermophilus* konnten Boeck und Schinzel (1998) zeigen, daß die Regulation des Glykogenmetabolismus von der von *E. coli* abweicht. So ist die Bildung von Glykogen in *E. coli* abhängig vom Stickstoffhaushalt der Zellen und der Art der C-Quelle. Stickstofflimitiertes Wachstum induziert die Glykogenbildung (Preiss, 1984, Preiss und Romeo, 1989). Bei *T. thermophilus* ist dies nicht der Fall. Dort wird Glykogen sowohl im Vollmedium als auch unter N-limitierten Bedingungen gebildet. Die Glykogen-Akkumulation beginnt bereits in der logarithmischen Wachstumsphase und die Glykogen-Phosphorylase wird nicht durch Glukose gehemmt (Boeck und Schinzel, 1998). Auch König *et al.* (1982) beobachteten beim Archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* zwar eine Abhängigkeit der Glykogen-Bildung von der C-Quelle, jedoch keine Steigerung durch niedrige N-Konzentrationen. Beim Wachstum in Medium mit Hefeextrakt ohne zusätzliche C-Quelle produzierte *S. acidocaldarius* 0,45 mg Glykogen/mg Zellprotein, was die gebildete Glykogenmenge beim Wachstum unter N-limitierten Bedingungen mit Maltose oder Laktose als C-Quelle um ein dreifaches übertraf. Die Erkenntnisse über den Glykogenstoffwechsel von *S. acidocaldarius* und *T. thermophilus* sind auch für *T. maritima* von Bedeutung, da der Organismus als den Archaeen sehr nahestehender Vertreter der Bakterien gilt. Das thermophile Bakterium *T. thermophilus* stammt ebenfalls aus einem recht ursprünglichen Zweig der Bakterien. Ferner kodiert das Gen *TTC1540* aus *T. thermophilus* das AmyB-Tm-homologe Protein AmyB-Tt, welches möglicherweise am Glykogenmetabolismus beteiligt ist.

In dieser Arbeit konnte für in Vollmedium mit Glukose als C-Quelle kultivierte *T. maritima*-Zellen die Präsenz eines Speicherglukans in der späten log-Phase gezeigt werden, welches in der stationären Phase nicht mehr nachweisbar war. Die Anwesenheit von AmyB-Tm in den Zellen konnte durch Western-Blots ebenfalls nur für die logarithmische Phase nachgewiesen werden, was zusätzlich zur Substratspezifität von AmyB-Tm für eine Beteiligung des Enzyms am Glykogenstoffwechsel spricht (s. III.4.2).

AmyB-Tm konnte auch in *T. maritima*-Zellen nachgewiesen werden, die in Vollmedium ohne zusätzliche C-Quelle gewachsen waren und in Zellen, die in Vollmedium mit Stärke als C-

Quelle gewachsen waren. In Zellen, die in Mineralmedium mit Stärke als C-Quelle abgezogen wurden, ließ sich AmyB-Tm dagegen nicht nachweisen (s. III.4.1). Sollte die Anwesenheit von AmyB-Tm tatsächlich mit der Anwesenheit von Glykogen verknüpft sein, wären die Western-Blots ein Hinweis darauf, daß Glykogen auch in *T. maritima* unabhängig von einer N-Limitierung, wie sie in *E. coli* Voraussetzung für die Glykogensynthese ist, gebildet wird.

Maltose-Metabolismus

Neben einer Rolle im Glykogenmetabolismus ist für AmyB-Tm auch eine Rolle beim intrazellulären Abbau von Maltooligosacchariden denkbar. Maltodextrine einer Größe von bis zu 7-8 Glukoseeinheiten, die durch den extrazellulären Abbau von Polysacchariden entstanden sind, werden durch den Maltosetransporter MalEFGK₂ in die Zelle geschleust. Dort werden sie von α -Glukosidasen abgebaut. Für AgpA stellen die Maltodextrine vermutlich neben Glykogen ein weiteres Substrat dar, und werden so zumindest teilweise zu Glukose-1-Phosphat abgebaut. Der Abbau von Maltodextrinen durch AgpA liegt nahe, da AgpA die einzige α -Glukan-Phosphorylase von *T. maritima* zu sein scheint. In *E. coli* dagegen liegen zwei Phosphorylasen vor, die spezifisch entweder Maltodextrine (MalP) oder Glykogen (glgP) abbauen (Boos und Shuman, 1998).

Es ist möglich, daß es zwischen Glykogenstoffwechsel und Maltoseabbau eine Verbindung besteht. Im Zusammenspiel von MalP, MalQ und MalZ beim Maltoseabbau in *E. coli* ist die Anwesenheit eines endogenen Maltodextrin-Primers von mindestens drei Glukoseeinheiten nötig. Beim Wachstum auf Maltose, bei dem keine Maltodextrine in die Zelle eintreten, muß dieser Primer im Zellinneren zu Verfügung gestellt werden. Möglicherweise fällt diese Aufgabe einer intrazellulären α -Amylase zu, die Maltotriose aus Glykogen freisetzt (Boos und Shuman, 1998). In *T. maritima* wäre diese Rolle für AmyB-Tm möglich.

Neben Glykogen stellen auch kurzkettige Maltodextrine mit einer Kettenlänge von mehr als drei Glukoseeinheiten ein Substrat für AmyB-Tm dar. Dies macht eine Beteiligung von AmyB-Tm, zusätzlich zu den α -Glukosidasen, am hydrolytischen Abbau der in die Zelle geschleusten Maltodextrine denkbar. Auch eine Beteiligung des Enzyms am Abbau von verzweigten Maltodextrinen, die zur Regulation des osmotischen Drucks im Cytoplasma von gebildet werden könnten, ist möglich.

Überraschend fanden Nguyen *et al.* (2004) in *T. maritima* Hinweise auf einen regulatorischen Zusammenhang zwischen der für die Zellen verfügbaren C-Quelle und intrazellulären Redox-Prozessen bzw. der Expression von Eisen-Schwefel-Cluster enthaltenden Enzymen und Eisen-Transportern. Ob dies von Bedeutung für die einen Eisen-Cofaktor bindende und in ihrer Aktivität stark durch DTT beeinflussbare Amylase AmyB-Tm sein könnte, ist beim

jetzigen Stand der noch in den Anfängen steckenden Transkriptionsanalyse von *T. maritima* noch nicht abzusehen.

2. Vergleich zweier α -Amylasen aus *Anaerobranca gottschalkii*

Das anearobe thermoalkaliphile Bakterium *A. gottschalkii* besitzt zwei α -Amylasen, AmyA-Ag und AmyB-Ag, von denen eine extrazellulär und eine im Cytoplasma lokalisiert ist. Für die extrazelluläre Amylase (AmyA-Ag) wird ein Lipoprotein-Signalpeptid vorhergesagt. Sie kann, obwohl wahrscheinlich membranassoziiert, im Überstand von *A. gottschalkii*-Kulturen nachgewiesen werden. AmyB-Ag besitzt kein Signalpeptid und ist als einziges amylytisches Enzym im *A. gottschalkii*-Rohextrakt nachweisbar (s. III.10). Beide Enzyme zeigen die für α -Amylasen typische Präferenz für intramolekulare α -1,4-Bindungen von α -Glukanen, und aufgrund ihrer Aminosäuresequenz sind beide Proteine, anders als AmyB-Tm und AmyB-Tt, der Glykosid-Hydrolase-Familie 13 zuzuordnen. Die Aminosäuresequenzen beider Enzyme, deren Identität bei 33 % liegt, besitzen die für α -Amylasen dieser Familie typischen vier konservierten Regionen. Weiterhin ist allen Proteinen der GHF 13 das $(\beta/\alpha)_8$ -Faß als Faltungsmotiv gemeinsam. Im Gegensatz zur GHF 57 umfaßt die GHF 13 eine ausreichende Zahl biochemisch charakterisierter Proteine, um statistische Aussagen über den Zusammenhang von bestimmten Sequenzabschnitten und der Enzymaktivität treffen zu können. So sind die beiden letzten Aminosäurereste in der konservierten Region II von GHF 13-Proteinen laut MacGregor *et al.* (2001) ausschlaggebend für die Substratspezifität. Sowohl bei AmyA-Ag als auch bei AmyB-Ag befinden sich an dieser Stelle ein Lysin und ein Histidin, was die Beobachtung bestätigt, daß diese beiden Reste an der genannten Position eine Präferenz für α -1,4-Bindungen der GHF 13 Enzyme bedingen (Tab. 16).

Tab. 16: Vergleich der vier hochkonservierten GHF 13 α -Amylase-Regionen von AmyA-Ag und AmyB-Ag mit denen der TAKA-Amylase aus *Aspergillus oryzae*, dem Modellenzym der GHF 13 (Toda *et al.*, 1982). Die drei katalytischen Aminosäuren sind schwarz unterlegt, die die α -1,4,-Spezifität vermittelnden Reste sind grau hinterlegt. Die Numerierung der Aminosäuresequenzen beginnt am Amino-Terminus des jeweiligen (prozessierten) Enzyms.

| Enzym | Region I | Region II | Region III | Region IV |
|--------------|------------|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| TAKA-Amylase | 117 DVVANH | 202 GLRIDTVK KH | 229 GEV L LD | 292 FVEN H D |
| AmyA-Ag | 150 DLVVNH | 238 GFRLD AA KH | 276 GE I WD | 339 FLSN H D |
| AmyB-Ag | 108 DIVVNH | 180 GFRI D TVK H | 212 GE V WH | 274 FIDN H D |

Auf die beschriebenen biochemischen und katalytischen Eigenschaften der Enzyme, z.B. die β -Cyclodextrinbildung durch AmyA-Ag (Ballschmiter *et al.*, 2005), wird an dieser Stelle nicht weiter eingegangen. Statt dessen soll der Blick auf die physikochemischen Unterschiede der α -Amylasen gelenkt werden. In diesen spiegelt sich deutlich die unterschiedliche zelluläre Lokalisierung von AmyA-Ag und AmyB-Ag in *A. gottschalkii* wider. Insbesondere das pH-Optimum und der pH-Bereich der jeweiligen enzymatischen Aktivität zeigen die Anpassung der Amylasen an ihre Umgebung (s. III.10). AmyA-Ag zeigt Aktivität im Bereich von pH 6,0 - 9,5 mit einem Optimum bei pH 8,0. Als Lipoprotein ist das Enzym direkt dem alkalischen Milieu der Umgebung ausgesetzt, in der *A. gottschalkii* lebt. Das Bakterium selbst wächst zwischen pH 6,0 und 10,5, was etwa dem Aktivitätsbereich von AmyA-Ag entspricht (Prowe und Antranikian, 2001). Auch die zwei anderen bisher untersuchten extrazellulären Enzyme von *A. gottschalkii*, eine Pullulanase und eine CGTase, zeigen eine solche Anpassung an den pH-Bereich des Ursprungsorganismus (Bertoldo *et al.*, 2004; Thiemann *et al.*, 2004).

Die intrazelluläre α -Amylase AmyB-Ag hat ein pH-Optimum von pH 6,0 und ist insgesamt in einem viel engeren pH-Bereich als AmyA-Ag aktiv (s. III.10). Das niedrigere pH-Optimum stellt eine Anpassung an die intrazellulären Bedingungen dar, denn der intrazelluläre pH-Wert alkaliphiler Bakterien liegt für gewöhnlich 1-2 pH-Einheiten unter dem pH-Wert des sie umgebenden Mediums. Auch sind Schwankungen des internen pH-Werts aufgrund der zellulären pH-Homeostasis gering, wodurch sich die geringere Toleranz der intrazellulären α -Amylase gegenüber pH-Änderungen erklärt. Im Umgebungsmedium ist dies anders. Das thermoalkaliphile Bakterium *A. gottschalkii* stammt aus einer Heißwasserquelle im Natron See Lake Bogoria, Kenia (Prowe und Antranikian, 2001). Hier dringt heißes Süßwasser in den See ein und vermischt sich mit dem alkalischen Wasser. Es ist also zu erwarten, daß der Organismus, und damit auch seine extrazellulären Enzyme, pH-Schwankungen in seinem Habitat ausgesetzt sind. Die extrazelluläre α -Amylase mit ihrem größeren pH-Spektrum ist in der Lage, ihre Aktivität auch unter wechselnden Bedingungen aufrechtzuerhalten.

Die Temperatur, bei der AmyA-Ag und AmyB-Ag maximale Aktivität zeigen, unterscheidet sich mit 70 °C bzw. 55 °C (s. III.10). Bemerkenswerter noch ist der Unterschied in der Thermostabilität der Enzyme. Während die Aktivität von AmyA-Ag bei 70 °C eine Halbwertszeit von 48 h hat, sinkt die Aktivität von AmyB-Ag bei dieser Temperatur bereits nach 10 min auf 50 %. Auch hier spiegelt sich offenbar die unterschiedliche Lokalisierung wider. AmyB-Ag könnte durch die intrazelluläre Umgebung (hohe Polymerkonzentration, Anwesenheit von Chaperonen) in gewissem Ausmaß geschützt werden. Aber auch im Falle einer raschen Denaturierungsrate *in vivo* ist vorstellbar, daß AmyB-Ag schnell in

ausreichender Konzentration neu synthetisiert werden kann, während die Neusynthese und nachfolgende Sekretion von AmyA-Ag ungleich energieaufwendiger wäre.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei AmyB-Tm aus *T. maritima* hatte Kalzium auf die Aktivität von AmyA-Ag einen positiven Effekt. EDTA kann jedoch die Aktivität unter bestimmten Bedingungen, namentlich in Tris-Puffer, senken. In MacIlvaine- und HEPES-Puffer hat EDTA keinen Effekt auf die Aktivität. Dabei spielte es keine Rolle, ob das Enzym bei der Reaktionstemperatur (60 °C) mit EDTA präinkubiert wurde oder ob auf diesen Schritt verzichtet wurde (s. III.10.). Dies deutet darauf hin, daß die Temperatur und damit die hitzebedingte höhere Flexibilität der Peptidketten im Enzym keinen Einfluß auf die Empfindlichkeit gegenüber EDTA hat. Vielmehr scheint es sich hier um einen reinen Puffereffekt zu handeln. Möglicherweise wird ein im Enzym sehr fest gebundenes Kalzium-Ion nur dann freigesetzt, wenn das Enzym durch Tris destabilisiert wird. Dieser durch Tris ausgelöste Effekt wurde bisher noch nicht beobachtet, aber bei mehreren α -Amylasen wurde eine Wirkung von Tris als kompetitiver Inhibitor beschrieben (Linden *et al.*, 2003; Aghajari *et al.*, 1998). Mit Ausnahme der Testansätze mit Tris-Puffer hat sich die Amylase Amy-Ag als Chelator-resistent erwiesen, was sie zusammen mit ihrer hohen Temperaturtoleranz und ihrem alkalischen pH-Optimum zu einem geeigneten Enzym für industrielle Anwendungen macht. Die pH- und Temperaturspektren von AmyA-Ag und AmyB-Ag demonstrieren die evolutionäre Anpassung der α -Amylasen aus *A. gottschalkii* an die verschiedenartigen Erfordernisse ihrer jeweiligen Umgebung. Die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften zeigen, daß trotz gemeinsamen Faltungsmotivs (TIM-barrel) und gemeinsamer invariabler Regionen, trotz 33 % Identität der Aminosäuresequenz und einem gemeinsamen Herkunftsorganismus durch kleine Variationen große Veränderungen der Enzymeigenschaften möglich sind.

V. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die α -Amylasen AmyB aus *T. maritima* (AmyB-Tm), AmyB aus *T. thermophilus* (AmyB-Tt) und AmyA sowie AmyB aus *A. gottschalkii* (AmyA-Ag und AmyB-Ag) untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf dem Enzym aus *T. maritima*. Nach Überexpression in *E. coli* und Aufreinigung durch Hitzedenaturierung der Wirtsproteine und Anionenaustauschchromatographie betrug die spezifische Aktivität des rekombinanten AmyB-Tm-Proteins 0,6 U/mg, gemessen bei 90 °C in 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0 ^{90°C}) mit löslicher Stärke als Substrat. Die Aktivität von AmyB-Tm ließ sich durch Reduktionsmittel (L-Cystein, β -Mercaptoethanol, DTT) steigern, wobei die maximale Aktivität in Anwesenheit von 10 mM DTT erreicht wurde. Durch kinetische Studien konnte der V_{\max} -Wert mit 1,3 U/mg und der K_m -Wert mit 1,1 mg/ml bestimmt werden. AmyB-Tm ist außergewöhnlich empfindlich gegenüber komplexierenden Agenzien und wurde bereits von 0,1 mM EDTA vollständig gehemmt. Auch Mg^{2+} und Ca^{2+} haben ebenso wie Acarbose eine hemmende Wirkung auf das Enzym. Es konnte nachgewiesen werden, daß die in einer früheren Arbeit beobachtete Hemmung von AmyB-Tm durch ATP und ADP ein unspezifischer Effekt ist, der auf der komplexierenden Wirkung der Nukleotide beruht. Eisen konnte biochemisch und röntgenspektroskopisch als Cofaktor von AmyB-Tm nachgewiesen werden. Die Abhängigkeit des Enzyms von Reduktionsmitteln spricht dafür, daß Eisen als Fe^{2+} vorliegen muß, um einen positiven Effekt auf AmyB-Tm zu haben.

Ein Großteil von AmyB-Tm liegt bei der heterologen Expression in unlöslicher Form vor. Weder durch einen Wechsel des Expressionsvektors noch durch einen Wechsel des Expressionswirts hin zu *C. glutamicum* gelang es, den Anteil an unlöslichem Protein zu senken, bzw. die je nach Aufreinigung schwankende spezifische Aktivität des rekombinanten Proteins zu steigern. Auch durch die anaerobe Aufarbeitung des AmyB-Tm-Proteins konnte keine Steigerung der Aktivität erzielt werden. Es gibt Hinweise darauf, daß die Wachstumsphase des Expressionswirts und die Menge des produzierten rekombinanten Proteins Einfluß auf die Aktivität haben.

Durch immunologische Methoden wurde die Anwesenheit von nativem AmyB-Tm in *T. maritima* in der logarithmischen Wachstumsphase nachgewiesen. In der stationären Phase des Wachstums ließ sich AmyB-Tm nicht nachweisen.

T. maritima besitzt mehrere vorhergesagte Enzyme des Glykogenmetabolismus. In dieser Arbeit konnte erstmalig aus *T. maritima* ein Speicherpolysaccharid isoliert (56 μ g/g Zellen nach Wachstum auf Vollmedium mit 0,5 % Glukose) und als α -Glukan charakterisiert werden. In Wachstumsversuchen konnte die Präsenz des α -Glukans unabhängig von einer

Stickstoff-Limitierung in der späten logarithmischen Phase nachgewiesen werden. Das gleichzeitige, wachstumsabhängige Auftreten des nativen AmyB-Tm-Proteins und des α -Glukans in *T. maritima* spricht dafür, daß AmyB-Tm am Glykogenmetabolismus beteiligt ist. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ficner (Molekulare Strukturbiologie, Göttingen) gelang die Kristallisation und Röntgenstrukturaufklärung von AmyB-Tm mit einer Auflösung von 2,3 Å. Durch die Strukturanalyse zeigte sich, daß das Enzym ein verzerrtes, siebensträngiges (β/α)-Faß-Faltungsmotiv besitzt. Eine solche Supersekundärstruktur ist im Gegensatz zu dem weit verbreiteten (β/α)₈-Faß erst in wenigen Proteinen gefunden worden. Als katalytische Aminosäuren von AmyB-Tm konnten Glu185 und Asp349, die am C-Terminus des (β/α)₇-Fasses liegen, identifiziert werden. In unmittelbarer Nähe zum katalytischen Zentrum wurde eine potentielle Eisenbindestelle gefunden, gebildet aus den Seitenketten der Aminosäuren His10, His12, Cys142 und His146. Durch gezielte ortsspezifische Mutagenese wurde das in der Nähe des katalytischen Zentrums liegende Cys186 in ein Serin überführt. Dadurch konnte jedoch keine signifikante Veränderung der biochemischen Eigenschaften von AmyB-Tm herbeigeführt werden.

Das zu AmyB-Tm ähnliche Protein AmyB-Tt aus *T. thermophilus* wurde in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt. Die spezifische Aktivität des rekombinanten Proteins betrug 40 mU/mg. Die höchste katalytische Aktivität des Enzyms wurde im Aktivitätstest mit löslicher Stärke bei 70 °C und pH 6,5 (50 mM PIPES-Puffer) in Anwesenheit von 1 mM DTT gemessen.

Die Enzyme AmyB-Tm und AmyB-Tt gehören zu den in der COG1543 zusammengefassten Proteinen. Durch die biochemische Charakterisierung von AmyB-Tm und AmyB-Tt als α -Amylasen konnte der COG1543 erstmals eine Funktion zugewiesen werden. Gleichzeitig konnte die COG1543 als Unterfamilie der GHF 57 identifiziert werden.

Ein weiterer Teil der Arbeit befaßte sich mit zwei zur GHF 13 gehörenden α -Amylasen von *A. gottschalkii*, einem thermoalkaliphilen Bakterium. Im Rohextrakt von *A. gottschalkii* konnte die α -Amylase AmyB-Ag nachgewiesen und damit die vermutete intrazelluläre Lokalisierung des Enzyms bestätigt werden. Für die extrazelluläre α -Amylase AmyA-Ag konnte gezeigt werden, daß die Zugänglichkeit des vermutlich im Enzym gebundenen Kalziums für Chelatoren vom Puffersystem abhängig ist. In MacIlvaine- und HEPES-Puffer konnte kein Effekt von EDTA auf AmyA-Ag beobachtet werden, während Tris-Puffer das Enzym offenbar soweit destabilisiert, daß das Ca²⁺ für EDTA zugänglich wird. Die Eigenschaften von AmyA-Ag und AmyB-Ag spiegelten ihre zelluläre Lokalisation (extrazellulär bzw. intrazellulär) wider.

VI. Literaturverzeichnis

- Achenbach-Richter, L., R. Gupta, K. O. Stetter und C. R. Woese.** 1987. Were the original eubacteria thermophiles? *Syst Appl Microbiol* **9**:34-9.
- Aghajari, N., G. Feller, C. Gerday und R. Haser.** 1998. Crystal structures of the psychrophilic alpha-amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. *Protein Sci* **7**:564-72.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-402.
- Andreeva, A., D. Howorth, S. E. Brenner, T. J. Hubbard, C. Chothia und A. G. Murzin.** 2004. SCOP database in 2004: refinements integrate structure and sequence family data. *Nucleic Acids Res* **32**:D226-9.
- Anindyawati, T., R. Melliawati, K. Ito, M. Iizuka und N. Minamiura.** 1998. Three different types of alpha-amylases from *Aspergillus awamori* KT-11: their purifications, properties and specificities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**:1351-1357.
- Armbrecht, M.** 2003. Lokalisierung und Charakterisierung amylolytischer Enzyme aus *Thermotoga maritima* MSB8 und *Anaerobranca gottschalkii*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität Göttingen.
- Arthur, P. K.** 2003. Analysis of novel amylase genes. Master's Thesis am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen, unveröffentlicht.
- Bachmann, B. J.** 1987. Linkage map of *Escherichia coli* K12, p. 807-876. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and U. H. E. (Hrsg.), *Escherichia coli* and *Salomonella typhimurium*: Cellular and molecular biology, 7. Ausg. ASM, Washington, D.C.
- Ballschmiter, M.** 2001. Klonierung, Expression und Charakterisierung einer alpha-Amylase aus *Anaerobranca gottschalkii*. Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen, unveröffentlicht.
- Ballschmiter, M., M. Armbrecht, K. Ivanova, G. Antranikian und W. Liebl.** 2005. AmyA, an alpha-Amylase with beta-cyclodextrin-forming activity, and AmyB from the thermoalkaliphilic *Anaerobranca gottschalkii*: two alpha-Amylases adapted to their different cellular localization. *Appl Environ Microbiol*. Im Druck.
- Belkin, S., C. O. Wirsén und H. W. Jannasch.** 1986. A new sulfur-reducing, extremely thermophilic eubacterium from a submarine thermal vent. *Appl Environ Microbiol* **51**:1180-1185.
- Bertoldo, C. und G. Antranikian.** 2001. Amylolytic enzymes from hyperthermophiles. *Methods Enzymol* **330**:269-89.

- Bertoldo, C., M. Armbrecht, F. Becker, T. Schafer, G. Antranikian und W. Liebl.** 2004. Cloning, sequencing, and characterization of a heat- and alkali-stable type I pullulanase from *Anaerobranca gottschalkii*. *Appl Environ Microbiol* **70**:3407-16.
- Bibel, M., C. Brettl, U. Gossler, G. Kriegshauser und W. Liebl.** 1998. Isolation and analysis of genes for amylolytic enzymes of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *FEMS Microbiol Lett* **158**:9-15.
- Birnboim, H. C. und J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-23.
- Bloch, E., R. Rachel, S. Burggraf, D. Hafenbradl, H. W. Jannasch und K. O. Stetter.** 1997. *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 degrees C. *Extremophiles* **1**:14-21.
- Boeck, B. und R. Schinzel.** 1998. Growth dependence of alpha-glucan phosphorylase activity in *Thermus thermophilus*. *Res Microbiol* **149**:171-6.
- Boel, E., L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. Derewenda, G. G. Dodson, V. J. Jensen, S. B. Petersen, H. Swift, L. Thim und H. F. Woldike.** 1990. Calcium binding in alpha-amylases: an X-ray diffraction study at 2.1-A resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry* **29**:6244-9.
- Boos, W. und H. Shuman.** 1998. Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:204-29.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
- Brzozowski, A. M. und G. J. Davies.** 1997. Structure of the *Aspergillus oryzae* alpha-amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 A resolution. *Biochemistry* **36**:10837-45.
- Bullock, W., J. Fernandez und J. Short.** 1987. XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**:376-378.
- Calmes, R. und A. T. Brown.** 1979. Regulation of lactose catabolism in *Streptococcus mutans*: purification and regulatory properties of phospho-beta-galactosidase. *Infect Immun* **23**:68-79.
- Chhabra, S. R., K. R. Shockley, S. B. Connors, K. L. Scott, R. D. Wolfinger und R. M. Kelly.** 2003. Carbohydrate-induced differential gene expression patterns in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J Biol Chem* **278**:7540-52.
- Davies, G. und B. Henrissat.** 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **3**:853-9.

- Davies, G. J., A. M. Brzozowski, M. Dauter, A. Varrot und M. Schulein.** 2000. Structure and function of *Hemicola insolens* family 6 cellulases: structure of the endoglucanase, Cel6B, at 1.6 Å resolution. *Biochem J* **348 Pt 1**:201-7.
- DeLong, E. F.** 2001. A phylogenetic perspective on hyperthermophilic microorganisms. *Methods Enzymol* **330**:3-11.
- Di Giulio, M.** 2003. The universal ancestor was a thermophile or a hyperthermophile: tests and further evidence. *J Theor Biol* **221**:425-36.
- Engel, A. M., Z. Cejka, A. Lupas, F. Lottspeich und W. Baumeister.** 1992. Isolation and cloning of Omp alpha, a coiled-coil protein spanning the periplasmic space of the ancestral eubacterium *Thermotoga maritima*. *Embo J* **11**:4369-78.
- Fish, W. W.** 1988. Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods Enzymol* **158**:357-64.
- Forouhar, F., W. Edstrom, J. Khan, L. Ma, Y. Chiang, T. B. Acton, G. T. Montelione, J. F. Hunt und L. Tong.** Crystal Structure of Polysaccharide Deacetylase (Pdaa_Bacsu) from *B. subtilis* (Pdaa_Bacsu) Northeast Structural Genomics Research Consortium (Nesg) Target Sr127. Nicht publiziert.
- Fukui, T., H. Atomi, T. Kanai, R. Matsumi, S. Fujiwara und T. Imanaka.** 2005. Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res* **15**:352-63.
- Fukusumi, S., A. Kamizono, S. Horinouchi und T. Beppu.** 1988. Cloning and nucleotide sequence of a heat stable amylase gene from an anaerobic thermophile, *Dictyoglomus thermophilum*. *Eur J Biochem* **174**:15-21.
- Fütterer, O.** 2001. Vergleichende Untersuchung von drei Amylasen des hyperthermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* MSB8. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Galperin, M. Y., K. M. Noll und A. H. Romano.** 1996. The glucose transport system of the hyperthermophilic anaerobic bacterium *Thermotoga neapolitana*. *Appl Environ Microbiol* **62**:2915-8.
- Glew, R. H., S. P. Peters und A. R. Christopher.** 1976. Isolation and characterization of beta-glucosidase from the cytosol of rat kidney cortex. *Biochim Biophys Acta* **422**:179-99.
- Gouet, P., E. Courcelle, D. I. Stuart und F. Metoz.** 1999. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**:305-8.
- Green, S. M., A. Ginsburg, M. S. Lewis und P. Hensley.** 1991. Roles of metal ions in the maintenance of the tertiary and quaternary structure of arginase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**:21474-81.

- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**:557-80.
- Heikinheimo, P., R. Helland, H. K. Leiros, I. Leiros, S. Karlsen, G. Evjen, R. Ravelli, G. Schoehn, R. Ruigrok, O. K. Tollersrud, S. McSweeney und E. Hough.** 2003. The structure of bovine lysosomal alpha-mannosidase suggests a novel mechanism for low-pH activation. *J Mol Biol* **327**:631-44.
- Henne, A., H. Bruggemann, C. Raasch, A. Wiezer, T. Hartsch, H. Liesegang, A. Johann, T. Lienard, O. Gohl, R. Martinez-Arias, C. Jacobi, V. Starkuviene, S. Schlenczeck, S. Dencker, R. Huber, H. P. Klenk, W. Kramer, R. Merkl, G. Gottschalk und H. J. Fritz.** 2004. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat Biotechnol* **22**:547-53.
- Henrissat, B.** 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **280** (Pt 2):309-16.
- Henrissat, B. und A. Bairoch.** 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem J* **316** (Pt 2):695-6.
- Huber, R., T. A. Langworthy, H. Köning, M. Thomm, C. R. Woese, U. B. Sleytr und K. O. Stetter.** 1986. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch Microbiol* **144**:324-333.
- Huber, R. und K. O. Stetter.** 1992. The order *Thermotogales*, p. 3809-3815. In A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder und K. H. Schleifer (Hrsg.), *The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York.
- Idaka, M., T. Terada, K. Murayama, H. Yamaguchi, O. Nureki, R. Ishitani, S. Kuramitsu, M. Shirouzu und S. Yokoyama.** Crystal Structure of Tt1467 from *Thermus Thermophilus* HB8. Nicht publiziert.
- Illingworth, B., J. Larner und G. T. Cori.** 1952. Structure of glycogens and amylopectins. I. Enzymatic determination of chain length. *J Biol Chem* **199**:631-40.
- Imamura, H., S. Fushinobu, B. S. Jeon, T. Wakagi und H. Matsuzawa.** 2001. Identification of the catalytic residue of *Thermococcus litoralis* 4-alpha-glucanotransferase through mechanism-based labeling. *Biochemistry* **40**:12400-6.
- Imamura, H., S. Fushinobu, M. Yamamoto, T. Kumasaka, B. S. Jeon, T. Wakagi und H. Matsuzawa.** 2003. Crystal structures of 4-alpha-glucanotransferase from *Thermococcus litoralis* and its complex with an inhibitor. *J Biol Chem* **278**:19378-86.
- Jeon, B. S., H. Taguchi, H. Sakai, T. Ohshima, T. Wakagi und H. Matsuzawa.** 1997. 4-alpha-glucanotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: enzyme purification and characterization, and gene cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **248**:171-8.
- König, H., R. Skorko, W. Zillig und W. D. Reiter.** 1982. Glycogen in thermoacidophilic Archaeobacteria of the genera *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Desulfurococcus* and *Thermococcus*. *Arch Microbiol* **132**:297-303.

- Koyama, Y., T. Hoshino, N. Tomizuka und K. Furukawa.** 1986. Genetic transformation of the extreme thermophile *Thermus thermophilus* and of other *Thermus* spp. J Bacteriol **166**:338-40.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen und M. Nei.** 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics **17**:1244-5.
- Laderman, K. A., B. R. Davis, H. C. Krutzsch, M. S. Lewis, Y. V. Griko, P. L. Privalov und C. B. Anfinsen.** 1993. The purification and characterization of an extremely thermostable alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. J Biol Chem **268**:24394-401.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-5.
- Lengeler, J. W., G. Drews und H. G. Schlegel.** 1999. Biology of the Prokaryotes, 1. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Liebl, W., A. Bayerl, B. Schein, U. Stillner und K. H. Schleifer.** 1989. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. FEMS Microbiol Lett **53**:299-303.
- Liebl, W., A. J. Sinskey und K. H. Schleifer.** 1992. Expression, secretion, and processing of staphylococcal nuclease by *Corynebacterium glutamicum*. J Bacteriol **174**:1854-61.
- Liebl, W., I. Stemplinger und P. Ruile.** 1997. Properties and gene structure of the *Thermotoga maritima* alpha-amylase AmyA, a putative lipoprotein of a hyperthermophilic bacterium. J Bacteriol **179**:941-8.
- Lim, W. J., S. R. Park, C. L. An, J. Y. Lee, S. Y. Hong, E. C. Shin, E. J. Kim, J. O. Kim, H. Kim und H. D. Yun.** 2003. Cloning and characterization of a thermostable intracellular alpha-amylase gene from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. Res Microbiol **154**:681-7.
- Linden, A., O. Mayans, W. Meyer-Klaucke, G. Antranikian und M. Wilmanns.** 2003. Differential regulation of a hyperthermophilic alpha-amylase with a novel (Ca,Zn) two-metal center by zinc. J Biol Chem **278**:9875-84.
- MacGregor, E. A., S. Janecek und B. Svensson.** 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. Biochim Biophys Acta **1546**:1-20.
- Markovic-Housley, Z., G. Miglierini, L. Soldatova, P. J. Rizkallah, U. Müller und T. Schirmer.** 2000. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. Structure Fold Des **8**:1025-35.
- McCarter, J. D. und S. G. Withers.** 1994. Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. Curr Opin Struct Biol **4**:885-92.

- Murzin, A. G., S. E. Brenner, T. Hubbard und C. Chothia.** 1995. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J Mol Biol* **247**:536-40.
- Nagano, N., C. T. Porter und J. M. Thornton.** 2001. The $(\beta/\alpha)_8$ glycosidases: sequence and structure analyses suggest distant evolutionary relationships. *Protein Eng* **14**:845-55.
- Narahara, E., Y. Makino und K. Omichi.** 2001. Glycogen debranching enzyme in bovine brain. *J Biochem (Tokyo)* **130**:465-70.
- Nelson, K. E., R. A. Clayton, S. R. Gill, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, W. C. Nelson, K. A. Ketchum, L. McDonald, T. R. Utterback, J. A. Malek, K. D. Linher, M. M. Garrett, A. M. Stewart, M. D. Cotton, M. S. Pratt, C. A. Phillips, D. Richardson, J. Heidelberg, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, J. A. Eisen, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, J. C. Venter und C. M. Fraser.** 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**:323-9.
- Nguyen, T. N., A. D. Ejaz, M. A. Brancieri, A. M. Mikula, K. E. Nelson, S. R. Gill und K. M. Noll.** 2004. Whole-genome expression profiling of *Thermotoga maritima* in response to growth on sugars in a chemostat. *J Bacteriol* **186**:4824-8.
- Nisbet, E. G. und N. H. Sleep.** 2001. The habitat and nature of early life. *Nature* **409**:1083-91.
- Nolling, J., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin, und D. R. Smith.** 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **183**:4823-38.
- Orengo, C. A., A. D. Michie, S. Jones, D. T. Jones, M. B. Swindells und J. M. Thornton.** 1997. CATH: a hierarchic classification of protein domain structures. *Structure* **5**:1093-108.
- Oshima, T. und K. Imahori.** 1974. Physiochemical properties of deoxyribonucleic acid from an extreme thermophile. *J Biochem (Tokyo)* **75**:179-83.
- Painbeni, E., S. Valles, J. Polaina und A. Flors.** 1992. Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**:3087-91.
- Pallen, M. J.** 2003. Glucoamylase-like domains in the alpha- and beta-subunits of phosphorylase kinase. *Protein Sci* **12**:1804-7.
- Patton, C., S. Thompson und D. Epel.** 2004. Some precautions in using chelators to buffer metals in biological solutions. *Cell Calcium* **35**:427-431.
- Preiss, J.** 1984. Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annu Rev Microbiol* **38**:419-58.

- Preiss, J. und T. Romeo.** 1989. Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Adv Microb Physiol* **30**:183-238.
- Prowe, S.** 1996. Characterization of extracellular amyolytic enzymes and sodium coupled energy transduction of a newly isolated thermoalkaliphilic bacterium *Thermoalcalibacter bogoriae*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie der Technischen Universität Hamburg-Harburg.
- Prowe, S. G. und G. Antranikian.** 2001. *Anaerobranca gottschalkii* sp. nov., a novel thermoalkaliphilic bacterium that grows anaerobically at high pH and temperature. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:457-65.
- Raasch, C., W. Streit, J. Schanzer, M. Bibel, U. Gossler und W. Liebl.** 2000. *Thermotoga maritima* AglA, an extremely thermostable NAD⁺-, Mn²⁺-, and thiol-dependent alpha-glucosidase. *Extremophiles* **4**:189-200.
- Raasch, C.** 2001. Molekulare, biochemische und strukturelle Untersuchungen an amyolytischen Enzymen von *Thermotoga maritima* MSB8. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Raha, M., I. Kawagishi, V. Muller, M. Kihara und R. M. Macnab.** 1992. *Escherichia coli* produces a cytoplasmic alpha-amylase, AmyA. *J Bacteriol* **174**:6644-52.
- Savchenko, A., C. Vieille, S. Kang und J. G. Zeikus.** 2002. *Pyrococcus furiosus* alpha-amylase is stabilized by calcium and zinc. *Biochemistry* **41**:6193-201.
- Schröder, C., M. Selig und P. Schönheit.** 1994. Glucose fermentation to acetate, CO₂ and H₂ in the anaerobic hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*: involvement of the Embden-Meyerhof pathway. *Arch Microbiol* **161**:460-470.
- Selig, M., K. B. Xavier, H. Santos und P. Schönheit.** 1997. Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. *Arch Microbiol* **167**:217-32.
- Sinnot, M. L.** 1990. Catalytic mechanisms of enzymatic glycosyl transfer. *Chem. Rev.* **90**:1171-1202.
- Sögaard, M., A. Kadziola, R. Haser und B. Svensson.** 1993. Site-directed mutagenesis of histidine 93, aspartic acid 180, glutamic acid 205, histidine 290, and aspartic acid 291 at the active site and tryptophan 279 at the raw starch binding site in barley alpha-amylase 1. *J Biol Chem* **268**:22480-4.
- Spezio, M., D. B. Wilson und P. A. Karplus.** 1993. Crystal structure of the catalytic domain of a thermophilic endocellulase. *Biochemistry* **32**:9906-16.
- Stark, A. und R. B. Russell.** 2003. Annotation in three dimensions. PINTS: Patterns in Non-homologous Tertiary Structures. *Nucleic Acids Res* **31**:3341-4.

- Steinke, C.** 2004. Präparation und röntgenkristallographische Untersuchungen an archaebakteriellen Box C/D sRNPs und einer neuartigen Glukosyltransferase aus *Thermotoga maritima* MSB8. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität Göttingen.
- Stetter, K. O.** 1999. Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett* **452**:22-5.
- Stryer, L.** 1995. Biochemie, 4. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Teplyakov, A., G. Obmolova, P. P. Khil, A. J. Howard, R. D. Camerini-Otero und G. L. Gilliland.** 2003. Crystal structure of the *Escherichia coli* YcdX protein reveals a trinuclear zinc active site. *Proteins* **51**:315-8.
- Thiemann, V., C. Donges, S. G. Prowe, R. Sterner und G. Antranikian.** 2004. Characterisation of a thermoalkali-stable cyclodextrin glycosyltransferase from the anaerobic thermoalkaliphilic bacterium *Anaerobranca gottschalkii*. *Arch Microbiol* **182**:226-35.
- Toda, H., K. Kondo und K. Narita.** 1982. The Complete Amino Acid Sequence of Taka-Amylase A. *Proc. Jpn. Acad.* **58**:208-212.
- Tonozuka, T., S. Mogi, Y. Shimura, A. Ibuka, H. Sakai, H. Matsuzawa, Y. Sakano und T. Ohta.** 1995. Comparison of primary structures and substrate specificities of two pullulan-hydrolyzing alpha-amylases, TVA I and TVA II, from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47. *Biochim Biophys Acta* **1252**:35-42.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4.
- van den Elsen, J. M., D. A. Kuntz und D. R. Rose.** 2001. Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *Embo J* **20**:3008-17.
- van der Rest, M. E., C. Lange und D. Molenaar.** 1999. A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**:541-5.
- Vargas, M. und K. M. Noll.** 1996. Catabolite repression in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* is independent of cAMP. *Microbiology* **142 (Pt 1)**:139-44.
- Varrot, A., T. P. Frandsen, I. von Ossowski, V. Boyer, S. Cottaz, H. Driguez, M. Schulein und G. J. Davies.** 2003. Structural basis for ligand binding and processivity in cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens*. *Structure (Camb)* **11**:855-64.
- Varrot, A., V. L. Yip, Y. Li, S. S. Rajan, X. Yang, W. F. Anderson, J. Thompson, S. G. Withers und G. J. Davies.** 2005. NAD(+) and Metal-ion Dependent Hydrolysis by Family 4 Glycosidases: Structural Insight into Specificity for Phospho-beta-d-glucosides. *J Mol Biol* **346**:423-35.

- Veith, B.** 2001. Die thermostabilen alpha-Glucosidasen AglB aus *Thermotoga maritima* MSB8 und MalA aus *Thermotoga neapolitana* NS-E:Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der rekombinanten Enzyme. Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen, unveröffentlicht.
- Vihinen, M. und P. Mäntsälä.** 1989. Microbial amylolytic enzymes. Crit Rev Biochem Mol Biol **24**:329-418.
- Wang, X. Y., F. G. Meng und H. M. Zhou.** 2004. The role of disulfide bonds in the conformational stability and catalytic activity of phytase. Biochem Cell Biol **82**:329-334.
- Wiegel, J.** 1998. Anaerobic alkalithermophiles, a novel group of extremophiles. Extremophiles **2**:257-67.
- Winterhalter, C., P. Heinrich, A. Candussio, G. Wich und W. Liebl.** 1995. Identification of a novel cellulose-binding domain within the multidomain 120 kDa xylanase XynA of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. Mol Microbiol **15**:431-44.
- Yanish-Perron, C., J. Vieira und J. Messing.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33**:103-109.
- Yeh, A. P., Y. Hu, F. E. J. Jenney, M. W. Adams, and D. C. Rees.** 2000. Structures of the superoxide reductase from *Pyrococcus furiosus* in the oxidized and reduced states. Biochemistry **39**:2499-2508.
- Zehnder, A. J. und K. Wuhrmann.** 1976. Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. Science **194**:1165-6.
- Zimmermann, A. L., H. F. Terenzi und J. A. Jorge.** 1990. Purification and properties of an extracellular conidial trehalase from *Humicola grisea* var. thermoidea. Biochim Biophys Acta **1036**:41-6.
- Zou, J., G. J. Kleywegt, J. Stahlberg, H. Driguez, W. Nerinckx, M. Claeysens, A. Koivula, T. T. Teeri und T. A. Jones.** 1999. Crystallographic evidence for substrate ring distortion and protein conformational changes during catalysis in cellobiohydrolase Ce16A from *Trichoderma reesei*. Structure Fold Des **7**:1035-45.

Anhang**Anhang A: Alignment der Aminosäuresequenzen von AmyB-Tm, AmyB-Tt und der GTase aus *T. litoralis*.**

```

AmyB_Tm 1  -MRGKILIFLHAHLPEYVHHPEYDHFLEERWLFEAITETIYIPLLMFDEIEDFRLTMSITP 59
AmyB_Tt 1  MAR--FALVLHAHLPEYVRAHGMWPFGEET-LYEAMAETYLPLLRVLERLRAEGVEAPFTL 57
Gtra_Tl 1  MERINFI FGIHNHQPLGNF--GWVF-EEA-----YNSYRPFMEILEEFPEMKVNVHFSG 52

AmyB_Tm 60  PLMEMLSSRDLQEKYER--HMEKLIELANKEVERTKKEHPLKHKMAKIFYREHFEEKILNVF 117
AmyB_Tt 58  GITPILAEQLADPRIKEGFWAYAKDRLEAQQDYQRYRGTALEASARHQVAFWELTLDHF 117
Gtra_Tl 53  PLEWIEENKPDYLDLLR----- 70

AmyB_Tm 118 RSYDGNILEGFKKYQETCKLEIVTCNATHAFLPLYQMPYEVVNAQITVGVKNYEKHMKKH 177
AmyB_Tt 118 QRLSGDLVAAFRKAEEGGQVELITSNATHGYSPLLG-YDEALWAQIKTGVSTYRRHFPAKD 176
Gtra_Tl 70  -----SLIKRGQLEIVVAGFYEPVLAAI--PKEDRLVQIT-EMLKDYARKLGYD 115

AmyB_Tm 178 PRGIWLAECGY---YQGLDLYLAQNVEYFFVDSHAFWFA-DEQPRYGVYRPIMTPSGVF 233
AmyB_Tt 177 PTGFWLPEMAYRPRGPWKPPVEGPPGVRPGVDELMLRAGIRYTFVDAHLVQGGEPLSPY 236
Gtra_Tl 116 AKGVWLTIRV---WQPELVKSLREAGIEYVVVDYHFMSAGLSKEELFWPYTEDGGEVI 172

AmyB_Tm 234 AFARDPESSEQVWSAAVGYPGDPYREFYRDIG-----FDREMEYIKDYIDPSGVRI 285
AmyB_Tt 237 GEAAALGPVESQEATYYVHELESGLRVLARNPETTLQVWSADYGYPGEGLYREFHRKDPLS 296
Gtra_Tl 173 TVFPIDEKLRYLIPFRPVKKTIEYLESLSDDPS----- 206

AmyB_Tm 286 N--TGIKYHRITSKSLDASQKEYYDIDLAMEAVEEHARDFLHKKESQARRLMDIMGVPEV 343
AmyB_Tt 297 GLHHWRVTHRKADLAEK---APYDPEAAFAKTEEHARHFVGLLER-----LAGRHPEGV 347
Gtra_Tl 206 -----KV 208

AmyB_Tm 344 IVAPFD AELFGHWVFEVGFVFLKRFELVNESKDLKLV TASEVIDTLEEVO-----IATP 397
AmyB_Tt 348 ILSFYDAELFGHWVYEGVAWLEAVLRLLAQSPKVRPVTAREAVQGPVRT-----ALP 400
Gtra_Tl 209 AVFHDDGEKFGVWPGTYEWVYEGWLRREFFDAITSNEKINLMTYSEYLSKFTPRGLVYLP 268

AmyB_Tm 398 ADSWAGAGGYETWLN GTNDWIYRHLHEMIERMIDLSKKYNNSS----- 441
AmyB_Tt 400 -EGSWGRGGDHRVWLN EKTLDYWEKVYRAEGAMREAARR----- 438
Gtra_Tl 268 -IASYFE--MSEWSLPAKQAKLVEFVFEQLKEEGKFEKYRVFVRGGIWKNNFFFKYPESNF 325

AmyB_Tm 441 -----DPLVERVLNQMLRELFLAQSSDWFIMTTRTSVQYAENRTKLHIKRFLNLYDQ 494
AmyB_Tt 438 -----GVLPEGVLRQAMRELLLEASDWPFLIDTGQAEAYAREFYEEHARAFFHLLKG 491
Gtra_Tl 326 MHKRLMLVSKAVRDNPEARKYILKAQCNDAYWHGVFGGIYLPHLRRITVWENIIKAQRYLK 385

AmyB_Tm 495 LVSGRIDDEMLRYEWTDAIFPEINFRVMARDVI----- 528
AmyB_Tt 492 ASPEELRALEERDNPFPEANPRLYLSQEA----- 520
Gtra_Tl 386 PENKILDVDFDGRAEIMVENDGF IATIKPHYGGSIFELSSKRKAVNYNDVLP RRWEHYHE 445

AmyB_Tm 528
AmyB_Tt 520
Gtra_Tl 446 VPEATKPEKESEEGIASIHEL GKQIPEEIRRELAYDWQLRAILQDHF IKPEETLDNYRLV 505

AmyB_Tm 528
AmyB_Tt 520
Gtra_Tl 506 KYHELGD FVNQPYEYEMIENGVKLWREGGVYAEKIPARVEKKIELTEDGFI AKYRVLLE 565

AmyB_Tm 528
AmyB_Tt 520
Gtra_Tl 566 KPYKALFGVEINLAVHSVMEKPEEF EAKEFEVNDPYGIGKVRIELDKAAKVWKFPIKTLS 625

AmyB_Tm 528
AmyB_Tt 520
Gtra_Tl 626 QSEAGWDFIQQGVSYTMLFPIEKELEFTVRFREL 659

```

Anhang B: Alignment der Aminosäuresequenzen von TTC1540 (*T. thermophilus* HB27) und Tt1467 (*T. thermophilus* HB8).

```
Tth_HB27      MARFALVLHAHLPYVRAHGMWPFGEETLYEAMAETYLPLIRVLERLRAEGVEAPFTLGIT 60
Tth_HB8      MARFALVLHAHLPYVRAHGMWPFGEETLYEAMAETYLPLIRVLERLRAEGVEAPFTLGIT 60
*****

Tth_HB27      PILAEQLADPRIKEGFWAYAKDRLERAQGDYQRYRGTALEASARHQVAFWELTDHFQRL 120
Tth_HB8      PILAEQLADARIKEGFWAYAKDRLERAQGDYQRYRGTALEASARHQVAFWELTDHFQRL 120
*****

Tth_HB27      SGDLVAAFRKAEEGGQVELITSNATHGYSPLLGDEALWAQIKTGVSTYRRHFAKDPTGF 180
Tth_HB8      SGDLVAAFRKAEEGGQVELITSNATHGYSPLLGDEALWAQIKTGVSTYRRHFAKDPTGF 180
*****

Tth_HB27      WLPEMAYRPRGPWKPPVEGPPVEGVRPGVDELMLRAGIRYTFVDAHLVQGGEPLSPYGEAA 240
Tth_HB8      WLPEMAYRPGKGPWKPPVEGPPVEGVRPGVDELMLRAGIRYTFVDAHLVQGGEPLSPYGEAA 240
*****

Tth_HB27      LGPVESQEATYYVHELESGLRVLARNPETTLQVWSADYGYPGEGLYREFHRKDPLSGLHH 300
Tth_HB8      LGPVESQEATYHVHELESGLRVLARNPETTLQVWSADYGYPGEGLYREFHRKDPLSGLHH 300
*****

Tth_HB27      WRVTHRKADLAEKAPYDPEAAFAKTEEHARHFVGLLERLAGRHPEGVILSPYDAELFGHW 360
Tth_HB8      WRVTHRKADLAEKAPYDPEAAFAKTEEHARHFVGLLERLAGRHPEGVILSPYDAELFGHW 360
*****

Tth_HB27      WYEGVAWLEAVLRLLAQSPKVRPVTAREAVQGPAVRTALPEGSWGRGGDHRVWLNEKTLD 420
Tth_HB8      WYEGVAWLEAVLRLLAQNPKVRPVTAREAVQGPAVRTALPEGSWGRGGDHRVWLNEKTLD 420
*****

Tth_HB27      YWEKVYRAEGAMREAARRGVLPEGVLRQAMRELLLLLEASDWPFLIDTGQAEAYARERYEE 480
Tth_HB8      YWEKVYRAEGAMREAARRGVLPEGVLRQAMRELLLLLEASDWPFLMETGQAEAYARERYEE 480
*****

Tth_HB27      HARAFFHLLKGASPEELRALEERDNPFPPEANPRLYLSQEA 520
Tth_HB8      HARAFFHLLKGASPEELRALEERDNPFPPEADPRLYLFREA 520
*****
```


Anhang C: Proteine der GHF 57, Stand 1.3.05

| Protein | Organismus | EC# | GenBank |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| Aq_720 | <i>Aquifex aeolicus</i> VF5 | n.d. | AE000704 NC_000918 |
| BF1000 | <i>Bacteroides fragilis</i> YCH46 | n.d. | AP006841 |
| BT4305 | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> VPI-5482 | n.d. | AE016944 NC_004663 |
| α -amylase 1 (AmyA) GSU3255 | <i>Dictyoglomus thermophilum</i> <i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA | 3.2.1.1 n.d. | X07896 AE017218 NC_002939 |
| GII1326 | <i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421 | n.d. | AP006572 NC_005125 |
| α -amylase (MJ1611) | <i>Methanococcus jannaschii</i> | 3.2.1.1 | U67601 NC_000909 |
| MMP1291 | <i>Methanococcus maripaludis</i> S2 | n.d. | BX957222 |
| MA4052 | <i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A | n.d. | AE011117 NC_003552 |
| MA4053 | <i>Methanosarcina acetivorans</i> str. C2A | n.d. | AE011117 NC_003552 |
| MM0861 | <i>Methanosarcina mazei</i> Goel | n.d. | AE013311 NC_003901 |
| MM0862 | <i>Methanosarcina mazei</i> Goel | n.d. | AE013311 NC_003901 |
| MCA2118 | <i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath | n.d. | AE017282 |
| MCA2119 | <i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath | n.d. | AE017282 |
| NE2031 | <i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718 | n.d. | BX321863 NC_004757 |
| NE2032 (AmyA) | <i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718 | n.d. | BX321863 NC_004757 |
| Alr1310 | <i>Nostoc</i> sp. PCC 7120 | n.d. | AP003585 NC_003272 |
| PTO1240 | <i>Picrophilus torridus</i> DSM 9790 | n.d. | AE017261 |
| RB2160 | <i>Pirellula</i> sp. 1 | n.d. | BX294136 NC_005027 |
| PG1683 | <i>Porphyromonas gingivalis</i> W83 | n.d. | AE017177 NC_002950 |
| PAE3428 | <i>Pyrobaculum aerophilum</i> IM2 | n.d. | AE009930 NC_003364 |
| PAE3454 | <i>Pyrobaculum aerophilum</i> IM2 | n.d. | AE009932 NC_003364 |
| PAB0118 (amyA) | <i>Pyrococcus abyssi</i> | n.d. | AJ248283 NC_000868 |
| PAB0122 (apu) | <i>Pyrococcus abyssi</i> | n.d. | AJ248283 NP_125873 |
| α -amylase (AmyA;PF0272) | <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638 | 3.2.1.1 | L22346 AE010151 NC_003413 |
| α -galaktosidase (Gala, PF0444) | <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638 | 3.2.1.22 | AF195244 AE010167 NC_003413 |
| amylopullulanase (PF1935) | <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638 | 3.2.1.41 | AF016588 AE010287 NC_003413 |
| PH0193 (α -amylase) | <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 | 3.2.1.1 | AP000001 NC_000961 |
| PH0368 | <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 | n.d. | AP000002 NC_000961 |
| α -amylase (AmyA;SSO1172) | <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 | 3.2.1.1 | AE006733 NC_002754 |

| | | | |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------|-----------------------|
| SSO0988 | <i>Sulfolobus solfataricus</i> P2 | 3.2.1.1 | AE006718 NC_002754 |
| ST0817 | <i>Sulfolobus tokodaii</i> 7 | n.d. | AP000983 NC_003106 |
| ST1102 | <i>Sulfolobus tokodaii</i> 7 | n.d. | AP000985 NC_003106 |
| slr0337 | <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 | n.d. | D63999 NC_000911 |
| amylopullulanase | <i>Thermococcus hydrothermalis</i> | 3.2.1.41 | AF113969 |
| 4- α -glukanotransferase (TK1809) | <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 | 2.4.1.- | D87907 AP006878 |
| TK1436 | <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 | n.d. | AP006878 |
| TK1774 | <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 | n.d. | AP006878 |
| TK1830 | <i>Thermococcus kodakaraensis</i> KOD1 | n.d. | AP006878 |
| 4- α -glukanotransferase | <i>Thermococcus litoralis</i> | 2.4.1.- | D88253 |
| amylopullulanase (Apu) | <i>Thermococcus litoralis</i> | 3.2.1.1 | AB054186 |
| Ta0129 | <i>Thermoplasma acidophilum</i> DSM1728 | 3.2.1.41 n.d. | AL445063 NC_002578 |
| Ta0339 | <i>Thermoplasma acidophilum</i> DSM1728 | n.d. | AL445064 NC_002578 |
| α -amylase (TVG0421416) | <i>Thermoplasma volcanium</i> GSS1 | n.d. | AP000992 NC_002689 |
| AmyA | <i>Thermoproteus tenax</i> | n.d. | AJ621296 |
| TH1277 | <i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1 | n.d. | AP005373 NC_004113 |
| TTC1828 | <i>Thermus thermophilus</i> HB27 | n.d. | AE017307 NC_005835 |
| TTHA0158 | <i>Thermus thermophilus</i> HB8 | n.d. | AP008226 |
| TDE1395 | <i>Treponema denticola</i> ATCC 35405 | n.d. | AE017250 NC_002967 |
| TP0147 | <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> str. Nichols | n.d. | AE001199 NC_000919 |
| Sequence 4 Patent US 5958751 (α -Galaktosidase) | Unknown | n.d. | - |
| Sequence 4 Patent US 6644756 | Unknown. | n.d. | - |

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. W. Liebl für die Betreuung dieser Arbeit, insbesondere für die Bereitschaft, sich wenn nötig die Zeit zu nehmen, über auftauchende Probleme ausführlich nachzudenken.

Prof. Dr. G. Gottschalk danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. R. Ficner und Dr. A. Dickmanns danke ich für die nette Zusammenarbeit bei der Kristallisation von AmyB-Tm.

Mein besonderer Dank gilt allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe – Angel Angelov, Anika Apelles, Patrique Arthur, Mechthild Bömeke, Susan Brandenburg, Marta Brewinska, Julia Busse, Christian Elend, Elke Heinz, Volker Hoffmann, Krassimira Ivanova, Jessica Jabin, Jörg Kleine, Steve Klopffleisch, Sabrina Koßmehl, Susanne Keese, Monika Nöller, Christina Schipper, Christel Schmeißer, Inga Schulte, Wolfgang Streit, Andzelika Solczyk, Andrea Thürmer, Mladen Tzevtkov, Alexandra Uesbeck, Sonja Voget, Anne Vor, Jörn Voß und Silja Wittenberg – für die einzigartig freundschaftliche Atmosphäre im Labor und ihre zuverlässige Unterstützung.

Vor allem möchte ich mich bei Carsten Raasch, Ole Fütterer, Ute Ludwig und Martin Armbrecht bedanken, von denen ich im Labor, über das Labor und außerhalb des Labors unsagbar viel gelernt habe.

Heike, Sonja, Christel, Christian und Angel danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit.

Lebenslauf

| | |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Juli 1975 | Geburt in Göttingen |
| 1982-1986 | Besuch der Grundschule in Witzenhausen |
| 1986-1992 | Besuch der Gesamtschule in Witzenhausen |
| 1992-1995 | Besuch der Gymnasialen Oberstufe der Rhenanus-Schule in Bad Sooden-Allendorf |
| Mai 1995 | Abitur |
| Oktober 1995 | Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen im Fach Biologie |
| Juli 1997 | Vordiplom in den Fächern Mikrobiologie, Botanik, Anorganische- und Physikalische Chemie |
| September 1997- Juli 1998 | Studium an der University of California, Santa Cruz, mit einem Stipendium des Kalifornischen Studienzentrums der Georg-August-Universität |
| Februar 2001 | Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Genetik und Organische Chemie |
| Mai 2001- November 2001 | Experimentelle Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. W. Liebl mit dem Titel ‚Klonierung, Expression und Charakterisierung einer α -Amylase aus <i>Anaerobranca gottschalkii</i> ‘ |
| Januar 2002 | Beginn der experimentellen Arbeit zur vorliegenden Dissertation |