

**Biochemische und mechanistische
Charakterisierung von Enzymen der
Glycosidhydrolase-Familie 4**

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

**vorgelegt von
Volker Hoffmann
aus Celle**

Göttingen 2005

D 7

Referent:

Prof. Dr. W. Liebl

Korreferent:

Prof. Dr. G. Gottschalk

Tag der mündlichen Prüfung:

27.04.2005

1.	Einleitung.....	1
1.1.	<i>Petrotoga</i> und <i>Thermotoga</i> als Beispielorganismen für extreme Habitate ...	1
1.1.1.	Adaptation an extreme Habitate.....	2
1.1.2.	Polysaccharide.....	4
1.2.	Intention der Arbeit.....	6
2.	Material und Methoden.....	8
2.1.	Bakterienstämme und Plasmide.....	8
2.2.	Zellanzucht.....	12
2.2.1.	Nährmedien.....	12
2.2.2.	Antibiotika und andere Medienzusätze	14
2.2.3.	Zellanzucht.....	14
2.2.4.	Stammhaltung	15
2.2.5.	Bestimmung der optischen Dichte.....	15
2.3.	Molekulargenetische Arbeitstechniken	15
2.3.1.	Grundlegende Techniken für das Arbeiten mit DNA	15
2.3.2.	Isolierung von DNA	17
2.3.3.	Agarose-Gelelektrophorese	20
2.3.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
2.3.5.	Enzymatische Modifikation von DNA	27
2.3.6.	Transformation von <i>E. coli</i>	29
2.3.7.	Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA.....	32
2.4.	Proteinbiochemische Methoden	33
2.4.1.	Standardtechniken für das Arbeiten mit Proteinen	33
2.4.2.	Gewinnung und Aufreinigung von Proteinen	38
2.4.3.	Charakterisierung der Enzymaktivität.....	48
2.4.4.	Kristallisation.....	49
2.4.5.	Fluoreszenzspektroskopie.....	52
2.4.6.	NMR, Physikalische Grundlagen.....	53
2.4.7.	Messverfahren	54
2.4.8.	Meßverfahren.....	56
2.4.9.	ESR.....	58
3.	Experimente und Ergebnisse	61
3.1.	Untersuchung der α -Glukosidase MelA aus <i>E. coli</i> K12.....	61

3.1.1.	Klonierung des MelA-Gens aus <i>E. coli</i> K12	62
3.2.	Anzucht und Aufreinigung	65
3.3.	Charakterisierung der rekombinanten α -Galaktosidase MelA	67
3.3.1.	Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad der α -Galaktosidase MelA aus <i>E. coli</i>	67
3.3.2.	Substratspektrum	69
3.3.3.	Enzymkinetik	70
3.3.4.	Bestimmung des pH-Optimums	72
3.3.5.	Bestimmung des „Temperaturoptimums“	73
3.3.6.	Bestimmung der Thermostabilität	74
3.3.7.	Abhängigkeit der α -Galaktosidase von Cofaktoren	75
3.3.8.	Untersuchung zum zeitlichen Verlauf der Substrathydrolyse	78
3.3.9.	Spektroskopische Untersuchungen mittels NMR	79
3.4.	Kristallisation von MelA	82
3.5.	Untersuchung von <i>T. Maritima</i> AgIA	84
3.5.1.	Identifizierung von „Spot X“	84
3.6.	Kristallisation von AgIA	89
3.7.	Anaerobe Aufreinigungen und Anzuchten	91
3.8.	Fluoreszenz- und Absorptionsuntersuchungen an AgIA	92
3.9.	Enzyme der Glykosidhydrolase-Familie 4 von <i>Petrogala miotherma</i>	96
3.9.1.	Klonierungsstrategie	96
3.10.	Untersuchung des ORFs RPMI00511	97
3.10.1.	Klonierung von RPMI00511 aus <i>P. miotherma</i> in <i>E. coli</i> BL21	97
3.10.2.	Anzucht und Herstellung eines Rohextrakts	101
3.10.3.	Aufreinigung des von RPMI00511 kodierten Enzyms mittels FPLC	101
3.10.4.	Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad des von RPMI00511 kodierten Enzyms	103
3.10.5.	Biochemische Charakterisierung	103
3.11.	Untersuchung des ORFs RPMI00720	104
3.11.1.	Klonierung des ORFs RPMI00720	104
3.11.2.	Anzucht und Herstellung eines Rohextrakts	106
3.11.3.	Aufreinigung des von RPMI00720 kodierten Enzyms mittels FPLC	106

3.11.4.	Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad von RPMI00720	108
3.11.5.	Biochemische Charakterisierung	108
3.12.	Untersuchung des ORFs RPMI01263	116
3.12.1.	Klonierung von RPMI01263 aus <i>P. miotherma</i> in <i>E. coli</i>	116
3.12.2.	Klonierungsstrategie	118
3.12.3.	Anzucht und Herstellung eines Rohextraktes	119
3.12.4.	Aufreinigung des von RPMI01263 kodierten Enzyms mittels FPLC 119	
3.12.5.	Substratspektrum	121
3.12.6.	Enzymkinetik	122
3.12.7.	Biochemische Charakterisierung	123
3.13.	ESR-Untersuchungen an <i>E. coli</i> Mela und das in ORF RPMI01263 kodierte Enzym	128
4.	Diskussion	134
4.1.	Einordnung der O-Glukosidasen	134
4.2.	Glukosidasen der GHF4	134
4.3.	Enzymaktivitäten der GHF4	136
4.3.1.	Optimierte Aufreinigung und Charakterisierung von Mela aus <i>E. coli</i>	136
4.3.2.	putative α -Glukosidase aus ORF RPMI00511 aus <i>P. miotherma</i>	138
4.3.3.	RPMI00720 und RPMI01263 aus <i>P. miotherma</i>	139
4.4.	Mechanistische Untersuchungen	142
4.4.1.	Fluoreszenz- und Absorbtionsspektren	142
4.4.2.	NMR-Untersuchungen zum Mechanismus	144
4.4.3.	Kristallisation von AglA aus <i>T. maritima</i>	145
4.5.	ESR- und Mechanismusuntersuchungen	147
4.5.1.	Auftreten eines unbekanntes Produkts bei der AglA-Reaktion	154
5.	Zusammenfassung	157
6.	Literatur	159
7.	Anhang	169

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig/Doppelstrang-
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii: und andere
EtOH	Ethanol
g	Gramm
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl- β -d-thiogalactopyranosid
k	Kilo-(1×10^3)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	Milli-(1×10^{-3})
M	Molar (mol/l), molekulare Masse

MM	Mineralmedium
max.	maximal, Maximum
μ	Mikro-(1 x 10 ⁻⁶)
MCS	Multiklonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
min	Minute
n	Nano-(1 x 10 ⁻⁹)
NBT	Nitroblue-Tetrazolium
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
<i>Pfu</i> -Polymerase	Polymerase auf <i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
r	resistent/Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sog.	sogenannt(en)
ss	einzelstränig/Einzelstrang-
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i> -Polymerase	Polymerase auf <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Nukleotidbasen

A	Purinbase Adenin	G	Purinbase Guanin
T	Pyrimidinbase Thymin	C	Pyrimidinbase Cytosin

Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Aspartat	P	Prolin
E	Glutamat	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

1. Einleitung

1.1. *Petrotoga* und *Thermotoga* als Beispielorganismen für extreme Habitate

Thermotoga maritima (DSM 3109) wurde ursprünglich aus geothermal erhitzten marinen Sedimenten bei Vulcano, Italien, isoliert. Charakteristisch für dieses Gram-negative Stäbchen mit einem GC-Gehalt von etwa 46 % ist die sogenannte Toga, die an den Zellpolen ähnlich zwei Ballons aufgetrieben vorliegt. Im sequenzierten Genom von *T. maritima* wurde festgestellt, daß fast 24 % seiner Gene am ähnlichsten zu Genen aus Archaeen sind. Bei diesem Organismus handelt es sich um ein nicht-sporenbildendes, stäbchenförmiges Bakterium (Huber et al., 1986). *T. maritima* ist in der Lage in einem Temperaturbereich von 55°C – 90°C und einem pH-Bereich von 5,5 – 9,0 zu wachsen, das Wachstumsoptimum liegt bei 80°C und pH 6,5. Es handelt sich um ein obligat heterotrophes Bakterium, welches Kohlenhydrate, wie z.B. Stärke strikt anaerob zu L(+)-Lactat, Acetat, CO₂ und H₂ fermentiert (HUBER et al., 1986). Verstoffwechselt werden verschiedene einfache und komplexe Substrate, wie Glukose, Saccharose, Stärke, Xylan und Cellulose (Huber und Stetter, 1992), die zu 85 % über den Embden-Meyerhoff-Parnas-Weg (EMP-Weg) und zu 15 % über den Entner-Doudoroff-Weg (ED-Weg) metabolisiert werden (Selig et al., 1997). Im rein fermentativ ablaufenden Stoffwechsel bildet *T. maritima* Acetat, CO₂, H₂ und in geringen Mengen L-Lactat.

Petrotoga miotherma wurde ursprünglich aus Erdölreservoirs in Texas und Oklahoma, USA, isoliert, ähnlich wie *P. mexicana* (Miranda-Tello et al., 2004). Es besitzt im Gegensatz zu *P. mobilis* (Lien T. et al., 1998), *P. olearia* (L'Haridon et al., 2002) keine Flagellen und wächst unter strikt anaeroben Bedingungen. *P. miotherma* hat mit 40 mol % einen ähnlich hohen GC-Gehalt wie *T. maritima*. Das Temperaturoptimum liegt bei 55°C, wohingegen in einem Bereich von 35-65°C Wachstum zu beobachten ist. Das Wachstums-pH-Optimum von *P. miotherma* liegt bei 6,5, Wachstum ist aber in einem Bereich von pH 5,5-9,0 zu verzeichnen. Verschiedene Substrate wie Arabinose, Mannose, Stärke, Maltodextrin, Glukose,

Lactose, Sucrose, Galaktose, Maltose und Xylose werden verwertet, wobei nach Wachstum auf Glukose die Fermentationsprodukte H_2 , CO_2 , Acetat und Ethanol gefunden wurden. Xylan und Cellulose können nicht verwertet werden (Davey et al., 1993). *P. miotherma* toleriert im Gegensatz zu *T. maritima* zwischen 2% und 10% NaCl. *P. miotherma* besitzt die Fähigkeit, elementaren Schwefel zu H_2S zu reduzieren

1.1.1. Adaptation an extreme Habitate

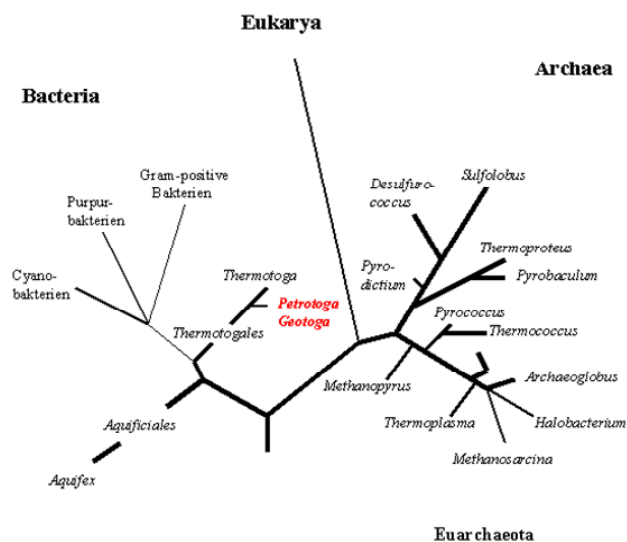


Abbildung 1: Auf 16S rRNA beruhender phylogenetischer Stammbaum. Die Positionen hyperthermophiler Organismen sind mit dicken Linien gekennzeichnet. (nach Selig et al., 1997, modifiziert)

Thermophile und noch stärker hyperthermophile Organismen stehen vor dem Problem, bei extremen Temperaturen oder pH-Werten ihren Stoffwechsel aufrecht erhalten zu müssen, bei denen Proteine normalerweise denaturieren. Unter solchen widrigen Umständen müssen sie gegen chemische Reaktionen, wie z.B. Desaminierung, β -Eliminierungen, Hydrolyse, Oxidation und Maillard-Reaktionen, resistent sein (Daniel et al., 1996; Jaenicke und Böhm, 1998).

Wie sich die Organismen vor diesen Bedingungen schützen und die Proteine stabilisieren, ist noch nicht vollständig geklärt (Sterner und Liebl., 2001), es gibt aber Hinweise auf diverse Faktoren, die näher untersucht wurden (Jaenicke und Böhm, 1998):

1. vermehrte Wasserstoffbrückenbindungen
2. zusätzliche hydrophobe Interaktionen und Salzbrücken
3. erhöhte Dichte oder kürzere Aminosäureketten
4. vermehrte α -Helizes
5. Metallionenbindungen
6. Ersatz von instabilen Aminosäuren durch Glycin
7. vermehrte Anzahl von Prolin und β -verzweigte Aminosäuren in den Loops
8. weniger thermolabile Aminosäuren, wie Asparaginsäure, Glutamin, Cystein und Methionin

Die Lipide der Archaea besitzen Etherbindungen zwischen Glycerin und deren hydrophoben Seitenketten. Diese Seitenketten sind ungewöhnlicherweise verzweigt, sie bestehen aus sich wiederholenden Isopreneinheiten. Glycerindiether und Glycerintetraether sind die wesentlichen Lipidklassen der Archaea. In einem Tetraethermolekül sind die Phytanylseitenketten zweier Glycerinmoleküle kovalent miteinander verbunden (Madigan et al., 2001). Dies führt in einer Membranstruktur zu einer einlagigen Lipidschicht, die hitzebeständiger ist als die Lipiddoppelschicht der Bakterien und Eukaryoten.

Proteine aus extremen Habitaten haben ein hohes biotechnologisches Potential (Nissen et al., 1992). Bei der Verzuckerung von Stärke kommen bereits thermostabile Amylasen und Entzweigungsenzyme zum Einsatz. Durch Anwendung einer Cyclodextringlycosyltransferase (CGTase) aus dem thermophilen Bakterium *Anaerobranca gottschalkii* lassen sich aus Stärke sogenannte Cyclodextrine herstellen (Grote und Antranikian, 2001; Stetter et al., 1996). Diese ringförmigen Zuckermoleküle, die einen hydrophoben Hohlraum besitzen, in dem Moleküle wie z.B. Pharmaka oder Duftstoffe eingeschlossen werden können, werden u.a in der Pharmazie, Kosmetik und Lebensmittelindustrie eingesetzt (Andrade et al., 1999). In letzterer haben auch Pullulanasen und saccharolytische Amylasen Einzug gefunden, um verschiedene Zuckersirups aus Stärke herzustellen (Crabb et al., 1996). Diverse Xylanasen verwendet man zum Klären von Fruchtsäften (Ferreira-Filho et al., 1994). Xylanasen kommen bei der Tierfutterherstellung und Papierbleiche zum Einsatz.

Hitzestabile Proteasen und Cellulasen finden als Additive in Wasch- und Geschirrspülmitteln Anwendung.

Viele Reaktionen können bei hohen Temperaturen in Kombination mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt werden (Andrade et al., 1999). Dazu kommt, daß ein höherer Diffusionskoeffizient durch niedrigere Viskosität des Lösungsmittels wesentlich höhere Umsatzraten möglich macht (Krahe et al., 1996; Becker et al., 1997; Eichler et al., 2001). Außerdem lassen sich bestimmte Reaktionen wesentlich kostengünstiger durchführen, als auf dem klassischen Weg der chemischen Synthese, da sich kostspielige Lösungsmittel durch kostengünstiges Wasser ersetzen lassen und Reaktionen zugänglich sind, die sich sonst nur auf Umwegen verwirklichen lassen.

In der Biotechnologie haben insbesondere DNA-Polymerasen Einzug gefunden. Die Taq-DNA-Polymerase von *T. aquaticus* ist das klassische Enzym für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mit PCR. Durch ihre hohe Genauigkeit bei der DNA-Synthese sind die *Pfu*-Polymerase aus *P. furiosus* (Lundberg et al., 1991) und KOD-Polymerase aus *Pyrococcus* sp. Strain KOD1 (Takagi et al., 1997) im Laboralltag weit verbreitet.

1.1.2. Polysaccharide

Die meisten in der Natur vorkommenden Kohlenhydrate liegen als Polysaccharide vor. Die auch als Glycane bezeichneten Polysaccharide unterscheiden sich in der Art ihrer sich wiederholenden Monosaccharideinheiten, in ihrer Kettenlänge, in der Form der Bindungen zwischen den Einheiten und im Ausmaß der Verzweigung. Homopolysaccharide bestehen nur aus einem einzigen Typ des entsprechenden Monomers. Dagegen enthalten Heteropolysaccharide zwei oder mehr unterschiedliche monomere Untereinheiten. Diese Polysaccharide dienen meist als Speicher für Brennstoffe (z. B. Stärke und Glycogen). Andere Homopolysaccharide dienen als Strukturelement in den Zellwänden von Pflanzen (z.B. Cellulose) oder als Außenskelett (z.B. Chitin) bei Tieren. Stärke aus Pflanzen stellt eine ubiquitär vorhandene Energiequelle dar, die ausschließlich aus α -Glukose-Einheiten aufgebaut ist. Stärke ist ein natürliches α -D-Glukan, aufgebaut aus Amylose (20-30 %) und Amylopectin (70-80 %). Diese wiederum setzt sich aus unverzweigten Ketten

der D-Glukose zusammen, die α -1,4-glycosidisch miteinander verknüpft sind. Die Glukoseketten nehmen eine schraubenförmige Konformation ein. Amylopektin hat denselben Aufbau und ist zusätzlich alle ca. 25 Untereinheiten über eine 1,6-Stellung verzweigt. Amylopektin hingegen verfügt neben linearen Bereichen zusätzlich über α -1,6-glycosidisch verknüpfte Verzweigungen. Neben Cellulose ist Stärke das zweithäufigste von Pflanzen produzierte Polysaccharid und dient ausschließlich als Speichersubstanz. Die Stärketypen verschiedener Herkunft unterscheiden sich bezüglich der Verzweigung, des Polymerisationsgrades und anderer Eigenschaften erheblich (SCHLEGEL, 1992).

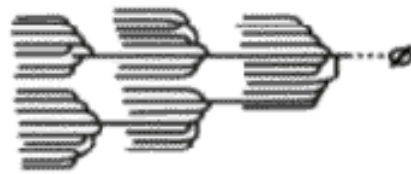


Abbildung 2: schematische Darstellung Amylopektin

Die glykosidische Bindung ist die stabilste Verknüpfung aller natürlich vorkommenden Biopolymere mit einer Halbwertszeit von ca. fünf Millionen Jahren (Wolfenden et al., 1998). Glukosidasen haben im Laufe der Evolution hochspezialisierte aktive Zentren zur Stabilisierung des Übergangszustandes gebildet, mit denen die Hydrolyse des Acetals ungefähr um den Faktor 10^{17} beschleunigt wird. Sie lassen sich zum einen in *endo*- und zum anderen in *exo*-Glukosidasen einteilen, je nachdem ob die Modifikation an endständigen oder internen Kohlenhydraten stattfindet und zum anderen in α - und β -Glukosidasen, je nach Konfiguration des anomeren Zentrums der Glykoside. Eine Vielzahl an Mikroorganismen ist in der Lage Stärke als C-Quelle zu nutzen. Entscheidend für ein Wachstum auf diesem komplexen Kohlenhydrat sind extrazelluläre amylytische Enzyme zur Spaltung der α -1,4- bzw. α -1,6-glykosidischen Bindungen. Der enzymatische Abbau von Glukanen kann in drei Typen eingeteilt werden. Im Falle der Phosphorolyse durch Phosphorylasen wird ein Glykosylrest zwischen einem Zucker-Hydroxyl und einem Phosphat-Hydroxyl übertragen. Eine weitere Art des Glukanabbaus ist die Hydrolyse einer glykosidischen Bindung durch Übertragung

eines Glykosylrestes zwischen einem Zucker-Hydroxyl und einem OH-Rest aus dem Wasser. Die Hydrolyse wird wiederum in Retention, d.h. unter Beibehaltung der anomeren Konfiguration (z.B. α -Glukosidasen) (Brown et al., 1966; Brown et al., 1993) und Inversion, also unter Umkehrung der anomeren Konfiguration (z.B. β -Amylasen) unterschieden. Die dritte Art ist die Transglycolysierung, bei welcher die Übertragung eines Glykosylrestes von einem Zucker-Hydroxyl auf ein anderes stattfindet (Glykosyltransferasen).

Extrem thermophile Bakterien und Archaeen sind eine wichtige Quelle für interessante Biokatalysatoren (Niehaus et al., 1999). Die den hohen Temperaturen entsprechend angepaßten Enzyme besitzen ein breites Anwendungspotential in den verschiedenen Bereichen der modernen Biotechnologie. Thermostabile amylolytische Enzyme (Bragger et al., 1989) werden heute bereits in der stärkeverarbeitenden Industrie, bei der Stärkeumwandlung und der Herstellung von Zuckersirups, in der Brotherstellung und der Bierproduktion eingesetzt (Cowan, 1996, Bertoldo und Antranikian 2001).

1.2. Intention der Arbeit

Diese Arbeit beschäftigt sich mit drei α -Glukosidasen aus *P. miotherma*, einer α -Galaktosidase aus *E. coli* K12 und einer α -Glukosidase aus *T. maritima*, die alle zur GHF4 gehören. Die Enzyme der GHF4 sind NAD^+ -abhängig und besitzen N-terminal gelegen eine hochkonservierte Sequenz Gly-Xxx-Gly-Ser (GXGS). Dieses Motiv hat gewisse Ähnlichkeit mit einem konservierten Sequenzmotiv des Rossmann-Fold, bestehend aus einer alternierenden Abfolge von β -Strängen und α -Helizes ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$), die eine konservierte strukturelle Region für die Bindung eines Cofaktors in Proteinen darstellt. Im klassischen Rossmann-Fold Motiv ist eine glycinreiche Sequenz innerhalb des ersten β -Strangs wichtig (GXGXXG), die über eine Schleife den ersten β -Strang mit der folgenden α -Helix verbindet. Diese ist maßgeblich an der NAD^+ -Bindung beteiligt. Neben der Abhängigkeit von NAD^+ benötigen die Enzyme für ihre Funktion Mn^{2+} -Ionen und stark reduzierende Bedingungen durch Anwesenheit von DTT (Raasch et al., 2000).

Das Gen für die α -Glukosidase AglA aus *T. mairtima* wurde im Rahmen der Dissertation von C. Raasch kloniert und charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit

wurden weitergehende Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus des Enzyms angestellt. Die drei α -Glukosidasen RPMI00511, RPMI00720 und RPMI01263 aus *P. miotherma* wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend charakterisiert. Ebenso wurde mit der α -Galaktosidase MelA aus *E. coli* K12 verfahren, um sie anschließend zu kristallisieren. Zum Reaktionsmechanismus wurden NMR-, Fluoreszenz- und ESR-spektroskopische Untersuchungen vorgenommen.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

Alle in der Arbeit verwendeten Bakterienstämme mit ihren charakteristischen Merkmalen sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Bakterienstämme

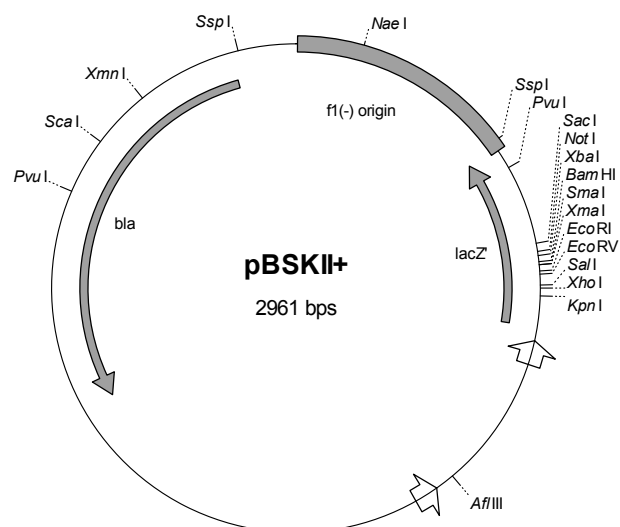
Spezies und Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>hsdF</i> , <i>gal</i> (λ c/ts857 <i>ind1</i> <i>Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1</i>)	Studier und Moffat, 1986
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	<i>thi1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (Nal ^r), <i>supE44</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> , λ , <i>lac</i> , <i>rpsL</i> (Sm ^r), [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , <i>lacZ</i> Δ M15, Tn10 (Tc ^r)]	Bullock et al., 1987
<i>Petrotoga miotherma</i>	Typstamm (DSM 10691)	Davey et al., 1993
<i>E. coli</i> JM 83	<i>ara</i> , Δ [<i>lac-proAB</i>], <i>rspL</i> , [Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15]	Yanisch- Peron et al, 1985
<i>E. coli</i> M15	pREP4 (Repressor-Plasmid)	Qiagen (Hilden)

Alle in der Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 2 aufgeführt.

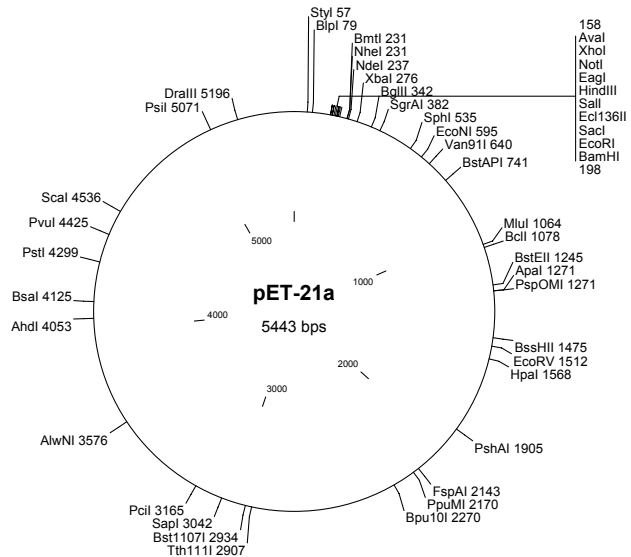
Tab. 2: Verwendete Plasmide

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Resistenz	Herkunft/Referenz
pBluescript II SK ⁺	<i>lac POZ'</i>	Amp ^r	Stratagene, San Diego, Cal., USA
pET-24c(+)	T7 Promoter, <i>lacI</i>	Kan ^r	Stratagene, San Diego, Cal., USA
pQE-30	ColE1, 6x His Tag	Amp ^r	Qiagen, Hilden
pET - 21a (+)	T7 Promoter, <i>lacI</i>	Amp ^r	Stratagene, San Diego, Cal., USA
pDrive	T7 Promoter, <i>lacZ'</i>	Kan ^r /Amp ^r	Qiagen, Hilden

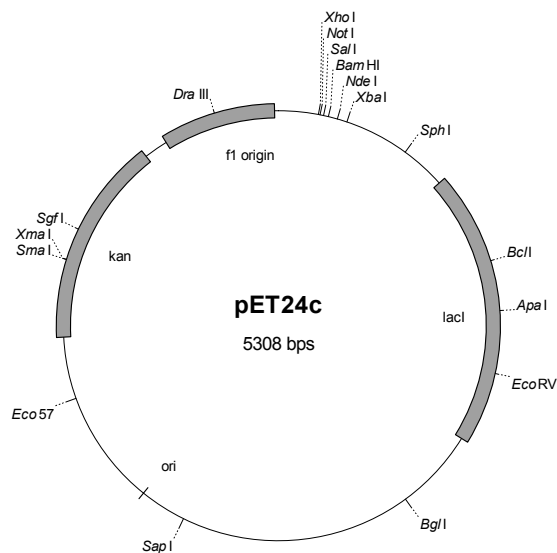
Das Plasmid pBluescript II SK⁺ ist ein Klonierungsvektor mit einem Ampicillinresistenzgen. Das in der Multiple- Cloning-Site (MCS) enthaltene *lacZ'*-Gen ermöglicht eine blau/weiß-Selektion.



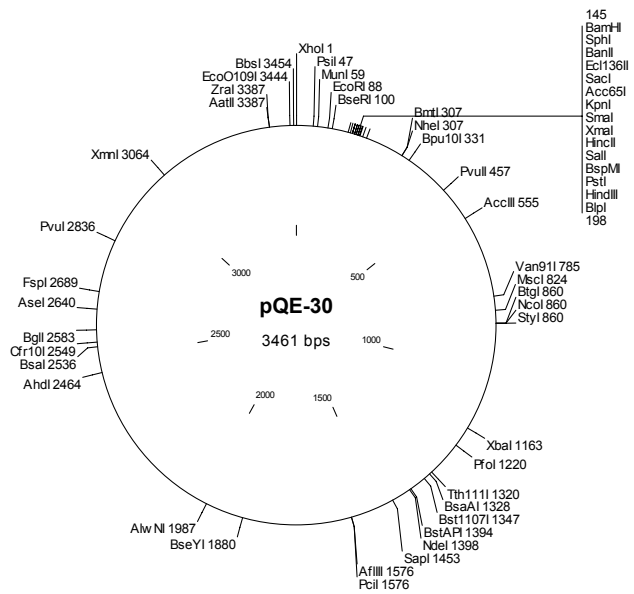
Das Plasmid pET-21a ist ein Überexpressionsvektor mit einem Ampicillinresistenzgen. Die klonierten Gene stehen unter der Kontrolle eines starken T7-Promoters und können mit IPTG induziert werden



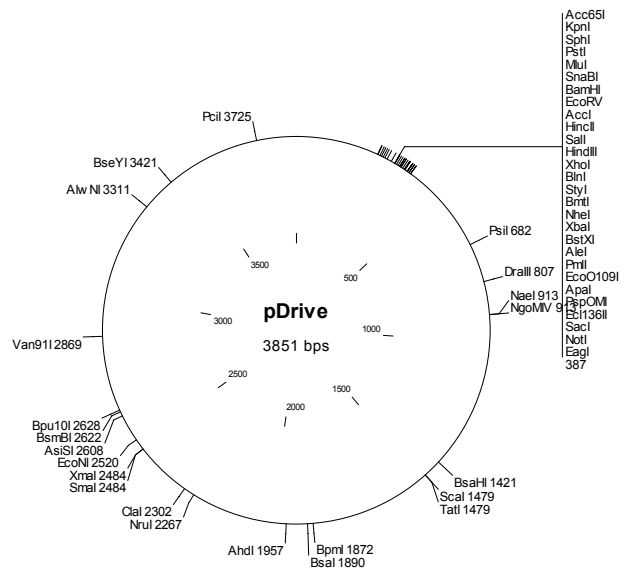
Das Plasmid pET24c ist ein Überexpressionsvektor mit einem Kanamycinresistenzgen. Die klonierten Gene stehen unter der Kontrolle eines starken T7-Promoters und können mit IPTG induziert werden.



Das Plasmid pQE-30 ist ein Überexpressionsvektor mit einem Kanamycinresistenzgen. Die klonierten Gene stehen unter der Kontrolle eines starken T7-Promoters und können mit IPTG induziert werden.



Das Plasmid pDrive ist ein Klonierungsvektor mit einem Ampicillinresistenzgen.



2.2. Zellanzucht

2.2.1. Nährmedien

Alle Medien wurden, falls nicht anders angegeben, durch 20-minütiges Autoklavieren sterilisiert.

2.2.1.1. Nährmedien für *E. coli*-Stämme:

LB-Medium (Sambrook et al., 1989):

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

LB-Agarplatten:

Für LB-Agarplatten wurde dem Medium Agar in einer Endkonzentration von 1,5 % (w/v) zugegeben.

Anaerob-Medium (mündl. Mitteilung)

Trypton	32 g
Hefe	20 g
Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
Glukose	3,6 g
L-Tryptophan	0,5 g
Spurenelementelösung (Widdel et al., 1984)	10 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Die Erlenmeyerkolben wurden unter aeroben Bedingungen angeimpft und mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen. Die Kultur hat sich anschließend selbst anaerobisiert.

2.2.1.2. Nährmedien für *P. miotherma*:

Grundmedium (Davey et al., 1993):

Stärke	1 g
Hefeextrakt	0,5 g
NaCl	33,3 g
CaCl ₂ x2H ₂ O	7,6 g
MgCl ₂ x6H ₂ O	2,5 g
Pipes	6,8 g
NH ₄ Cl	0,5 g
Spurenelementelösung	1 ml
Resazurin	1 mg
α-Glycerophosphat	0,4 g
Ascorbinsäure	0,02 %
Cystein-HCl	0,01 %
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Spurenelementelösung (Widdel et al., 1984):

HCl (25%)	10 ml
FeCl ₂ x4H ₂ O	1,5 g in HCl lösen
CoCl ₂ x6H ₂ O	190 mg
MnCl ₂ x4H ₂ O	100 mg
ZnCl ₂	70 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	36 mg
NiCl ₂ x6H ₂ O	24 mg
CuCl ₂ x2H ₂ O	2 mg
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Für die Anzucht von *Petrotoga miotherma*, einem strikt anaeroben Organismus, musste das Medium sauerstofffrei gemacht werden. Dazu wurde es nach Verschließen der Serumflasche mit einem Druck von 1 bar je dreimal ent- bzw. mit Stickstoff begast. Vor dem Autoklavieren musste durch Abziehen der Schläuche von den Kanülen der Druck in den Flaschen auf Null gebracht werden. Der zu Beginn violette Redoxindikator Resazurin entfärbt sich unter anaeroben Bedingungen beim Autoklavieren. Beim Eindringen von Sauerstoff schlägt er nach rot um.

Die Spurenelementlösung wurde nach dem Autoklavieren des Mediums zugegeben.

2.2.2. Antibiotika und andere Medienzusätze

Von den in Tab. 3 aufgeführten Antibiotika und Medienzusätzen wurden Stammlösungen angesetzt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Die Lösungen wurden dem autoklavierten Medium nach dessen Abkühlung auf unter 55°C in entsprechender Menge zugegeben.

Tab. 3: Konzentration der verwendeten Antibiotika und der weiteren Medienzusätze

Substanz	Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Endkonzentration
Ampicillin	100	H ₂ O _{bidest}	100 µg/ml
Kanamycin	50	H ₂ O _{bidest}	25 µg/ml
IPTG	24	H ₂ O _{bidest}	24 µg/ml
X-Gal	20	Dimethylformamid	64 µg/ml

2.2.3. Zellanzucht

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte schwenkend und aerob bei 37°C . Flüssigkulturen bis zu 5 ml wurden direkt mit einer Einzelkolonie von der Agarplatte, größere Anzuchten mit 2-3 % des Volumens einer gut angewachsenen Vorkultur angeimpft. Plasmidtragende Stämme wurden durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums unter Selektionsdruck gehalten. Die Kultivierung auf Agarplatten erfolgte bei 37°C über Nacht.

Zur Expression rekombinanter Proteine, die unter Kontrolle des *lac*-Promoters stehen, wurden Kulturen bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 mit IPTG induziert.

Die Anzucht von *P. miotherma* erfolgte in Serumflaschen unter aneroben Bedingungen bei 55°C für etwa 5 Tage. Da sich Medienbestandteile schnell absetzen und somit für die Bakterien schwieriger zugänglich sind, wurden die Kulturen unter Schütteln inkubiert.

2.2.4. Stammhaltung

Für Zeiträume von bis zu vier Wochen wurden *E. coli*-Stämme auf LB-Agarplatten bei 4°C gelagert. Für eine längere Konservierung wurden 500 µl einer gut gewachsenen Flüssigkultur (gegebenenfalls unter Selektionsdruck) mit 500 µl Glycerin (87 % (w/v)) vermischt und bei -70°C gelagert.

Zur Stammhaltung von *P. miotherma* konnte eine gut bewachsene Serumflasche über mehrere Monate hinweg bei 4°C gelagert und daraus neu beimpft werden.

2.2.5. Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte von Flüssigkulturen wurde in Einmalküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt (Pharmacia Biotec; Ultraspec 3000). Als Referenz wurde unbewachsenes Medium verwendet. Bei OD-Werten über 0,6 wurden die Proben mit dem entsprechenden Medium verdünnt, da bei Werten über 0,6 keine lineare Beziehung zwischen der Bakterienzahl/ml und ΔE_{600} gegeben ist.

2.3. Molekulargenetische Arbeitstechniken

2.3.1. Grundlegende Techniken für das Arbeiten mit DNA

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

Um eine Kontamination mit Nukleasen zu vermeiden, wurden alle thermostabilen Geräte, Lösungen und Materialien autoklaviert. Nicht autoklavierbare Materialien

sowie der Arbeitsplatz wurden mit 70 %-igem (v/v) Ethanol behandelt. Thermolabile Lösungen wie Antibiotika wurden sterilfiltriert.

2.3.1.2. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen und anderen Verunreinigungen aus DNA-Lösungen wurden diese i.d.R. mit einem Volumen eines 25:24:1 (v/v/v)-Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol versetzt und kräftig gemischt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde die obere wässrige, DNA enthaltende Phase vorsichtig abgenommen. Zur Entfernung von Phenolresten wurde anschließend mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, (v/v)) extrahiert.

2.3.1.3. Fällung von DNA

2.3.1.4. Fällung von DNA mit Ethanol

Dazu wurde die DNA-Lösung mit 2,5 Volumen eiskaltem unvergälltem Ethanol (96 % (v/v)) versetzt. Nach Durchmischung erfolgte eine Lagerung bei -20°C für 0,5-12 h. Die gefällte DNA wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 70 %-igem (v/v) Ethanol (mindestens 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.

2.3.1.5. Fällung von DNA mit Isopropanol

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen einer 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) und 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällung erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur. Die gefällte DNA wurde durch 30-minütige Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 70 %-igem (v/v) Ethanol (mindestens 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.

2.3.2. Isolierung von DNA

2.3.2.1. Isolierung genomischer DNA

Durchführung:

Für die Isolierung genomischer DNA wurde eine 10 ml-Kultur durch fünfminütige Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4°C geerntet. Das Pellet wurde in 100 µl 1 M NaCl-Lösung resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13.000 Upm und 4°C. Nach Aufnahme des Pellets in 500 µl TE-Saccharose-Puffer (20% (w/v)) wurden 400 µl DEP und 100 µl SDS-Lösung (1 % Endkonzentration) zugegeben. Die Lyse erfolgte für 2-4 h bei 37°C. Der DNA-Extrakt wurde anschließend mit 100 µl Sarkosyl-ProteinaseK-Lösung versetzt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Um die DNA-Lösung aufzureinigen erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion, wobei 20 min auf Eis inkubiert wurde, bevor die Probe für 20 min bei 13.000 Upm und 4°C zentrifugiert wurde. Die Extraktion wurde im Anschluss daran wiederholt. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben, in einen geeigneten Dialyseschlauch überführt, und für 5-7 h bei 4°C gegen 0,5 l TE-Puffer dialysiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Dialyse gegen 1 l TE-Puffer bei 4°C über Nacht.

Lösungen:

TE-Puffer:

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0	

TE-Saccharose-Puffer :

Saccharose	20 g
TE-Puffer	100 ml

DNA-Extraktionspuffer (DEP) :

Tris	100 mM
Na ₂ EDTA	100 mM
Na ₂ HPO ₄	100 mM
NaCl	1,5 M

CTAB 1 %
pH 8,0

Sarkosyl-Lösung:

Sarkosyl 5 g
H₂O_{bidest} 100 ml

ProteinaseK-Lösung:

20 % (w/v), steril filtrieren

Sarkosyl-ProteinaseK-Lösung:

Sarkosyl-Lösung 1 ml
ProteinaseK-Lösung 25 µl

2.3.2.2. 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. Bei niedrigen Temperaturen erfolgt unter der Einwirkung von SDS und NaOH (Puffer 2) eine Lyse der Bakterienzellwand und die Denaturierung der hochmolekularen chromosomalen DNA. Durch einen hohen pH-Wert sowie durch EDTA in Puffer 1 wird DNase-Aktivität verhindert. Bei der 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 Ethanol (2.3.1.4) oder Isopropanol (2.3.1.5) gefällt werden kann.

Durchführung:

Eine 5 ml Kultur wurde unter Selektionsdruck über Nacht bei 37°C angezogen. Anschließend wurden 3 ml der Zellen in einem E-Cup durch Zentrifugation (13.000 Upm, 30-60 s) geerntet. Das Pellet wurde in 200 µl P1 (mit RNase A) vollständig

resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl P2 und vorsichtigem Schwenken bei RT wurden die Zellen lysiert. Die Lyse sollte jedoch nicht länger als 5 min erfolgen. Zur Fällung von Proteinen und chromosomaler DNA wurde der Ansatz mit 200 µl P3 neutralisiert, 2x geschwenkt und für 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe bei 13.000 Upm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues E-Cup überführt, bei Bedarf mit Phenol extrahiert (II 3.1.2) und anschließend mit Ethanol (2.3.1.4) oder Isopropanol (2.3.1.5) gefällt.

Lösungen:

P1 (TE-Puffer):

Tris-HCl	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	1 mg/ml
pH 8,0	

Es wurde eine RNase A-Stammlösung angesetzt. Gelöst wurde die RNase A in 10 mM Tris-HCl und 15 mM NaCl (pH 7,5) oder in 50 mM Tris-HCl und 10 mM EDTA (pH 8,0). Die Stammlösung wurde 15 min im Wasserbad gekocht und konnte nach dem Abkühlen bei -20°C gelagert werden.

Die Zugabe der RNase zum TE-Puffer erfolgte nach dem Autoklavieren. Der Puffer konnte anschließend bei 4°C gelagert werden.

P2 (Lysis-Puffer):

NaOH	0,2 M
SDS	1 % (w/v)

P3 (Neutralisationspuffer):

Kaliumacetat	3 M
pH mit Eisessig auf 5,5 einstellen	

2.3.2.3. Plasmidisolierung durch „QIAprep Spin Miniprep“

Dieser Plasmidisolierungskit der Firma QIAGEN (Hilden) ermöglicht die Präparation kleinerer Mengen hochreiner DNA (etwa 20 µg aus 1,5 ml ü.N.-Kultur von *E. coli*).

Die Methode basiert ebenfalls auf der alkalischen Lyse in Verbindung mit der Verwendung einer Säule, welche selektiv Plasmid-DNA bindet. Proteine und andere zelluläre Verunreinigungen können nicht binden und werden somit abgetrennt. Die Aufreinigung erfolgte gemäß der vom Hersteller mitgelieferten Versuchsvorschrift.

2.3.3. Agarose-Gelelektrophorese

2.3.3.1. Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Molekülgröße. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wandern 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 Auftrennung von Nukleinsäuren wurden horizontale Elektrophoresekammern (Hoefer[®] HE33 Mini Horizontal Submarine Unit; Pharmacia Biotech) verwendet. Die Agarose-Gele wurden aus 0,8 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer, welcher zugleich auch als Elektrophoresepuffer diente, hergestellt. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 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) für 10-20 min gefärbt und anschließend im Wasserbad kurz entfärbt. In der Gel-Dokumentationsanlage (BioRad[®] GelDoc 1000) konnte die DNA bei UV-Licht durch das eingelagerte Ethidiumbromid sichtbar gemacht, photographisch dokumentiert und eventuell nachträglich bearbeitet werden (Multi-Analyst-V.1.1.1.-Dokumentationsprogramm).

Lösungen:50x TAE-Puffer:

Tris-HCl	242 g
Eisessig	57,1 ml
Na ₂ EDTAx2 H ₂ O	37,2 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml
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

Ethidiumbromid-Färbebad:

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

2.3.3.2. Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Prinzipiell wurde bei der präparativen Gelelektrophorese wie bei dem unter II 3.3.1 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.

2.3.3.3. Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten erfolgte nach Auftrennung im Agarosegel anhand 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. Die Fragmentgrößen der 1 kb-Leiter sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Fragmentgrößen der 1kb-Leiter

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Größe [kb]	10	8	6	5	4	3,5	3	2,5	2	1,5	1	0,75	0,5	0,25

2.3.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird ein DNA-Molekül (Template) *in vitro* vervielfältigt. Falls erforderlich, werden die zu amplifizierenden DNA-Bereiche mit neuen Restriktionsschnittstellen versehen, weshalb die Primer entsprechend der neuen Schnittsequenzen Fehlpaarungen zum Matrizenstrang aufweisen. Das zwischen den beiden Primern liegende DNA-Stück wird über das folgende, mehrfach zu durchlaufende Zyklenschema amplifiziert:

Zunächst wird die DNA denaturiert, wobei sich die beiden Stränge der Template-DNA trennen. Danach hybridisieren die Oligonukleotid-Primer bei optimaler Bindungstemperatur an die einzelsträngige Template-DNA. Durch Erhöhung der Temperatur auf das entsprechende Temperaturoptimum der DNA-Polymerase werden die Primer verlängert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA gleicht.

Die Hybridisierungs- (Annealing-) Temperatur ist von der Länge und der Zusammensetzung der Oligonukleotid-Primer abhängig. Je höher der G+C-Gehalt ist, desto höher liegt die Annealingtemperatur. Es gilt folgende Näherung:

$$T_A(^{\circ}\text{C}) = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - (650 / \text{Länge Oligos})$$

Zur Durchführung der PCR-Läufe wurden programmierbare Thermoblöcke (Primus 96^{plus}, MWG-Biotech) verwendet. Die Primer wurden bei der MWG-Biotech AG (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Für die PCR wurden die *Taq*-Polymerase (Eigenherstellung) oder *Pfu*-Polymerase (Promega) verwendet oder KOD-Polymerase (Novagen).

Die PCR wurde zur Amplifikation der zu klonierenden *P. miotherma* DNA und der zu klonierenden *E. coli* DNA und zur späteren Überprüfung der Klone eingesetzt.

Zur Amplifikation der potentiellen Glukosidase-Gene aus *P. miotherma* wurde die KOD-Polymerase verwendet, da diese eine „proof-reading“-Funktion besitzt, wodurch die Fehlerrate bei der Elongation gegenüber der *Taq*-Polymerase um ein Wesentliches verringert wird. Die Reinigung des für die Klonierung einzusetzenden PCR-Amplifikats von Primern, Polymerase und evtl. Nebenprodukten erfolgte durch präparative Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung mit Hilfe eines Kits (2.3.2.3).

Primer für die PCR-Amplifikation des MelA-Gens aus genomischer *E. coli* –DNA sind in Tabelle 5 aufgeführt:

Tabelle 5: Primer für die Amplifizierung des MelA-Gens

Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 6')	Schnittstelle
MelA_forward	GGG <u>GGA TCC</u> ATG ATG TCT GCA CCC AAA ATT ACA	<i>Bam</i> HI
MelA_reverse	GGG <u>AAG CTT</u> TTA ACG GTG CAA CCA GCC	<i>Hind</i> III

Der PCR-Ansatz ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: PCR-Ansatz für die Amplifizierung des MelA-Gens

Substanz	Volumen [μ l]
<i>Pfu</i> -Polymerase-Puffer (10-fach)	5,0
dNTP-Mix (10 mM)	2,0
Template-DNA	2,0
Primer „MelA forward“ *	0,5
Primer „MelA reverse“ *	0,5
<i>Pfu</i> -Polymerase	1,0
DMSO	5,0
H ₂ O _{bidest}	34,0
Gesamtvolumen	50,0

Das Programm für die PCR ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Programm für die PCR des MelA-Gens

	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]	Reaktion
1	95,0	10:00	Denaturierung
2	95,0	1:00	Denaturierung
3	40,0-50,0 Gradient	0:45	Primer-Annealing
4	72,0	2:00	Primer-Verlängerung
5	72,0	10:00	End-Verlängerung
6	8,0	∞	Kühlen

} 34x

2.3.4.1. A-Überhänge an *Pfu*-PCR-Produkt

Der pDrive Cloning Vektor ist Teil eines Qiagen PCR Cloning Kits, welches einen linearisierten Klonierungsvektor enthält, der an seinen Enden einen einzelsträngigen U-Überhang trägt. Durch diese „sticky ends“ wird eine hochspezifische Hybridisierung mit A-Überhang tragenden PCR-Fragmenten gewährleistet. A-Überhänge werden durch Amplifikation mit *Taq*-Polymerase und anderen DNA-Polymerasen ohne Korrekturleseaktivität erhalten, nicht jedoch durch Amplifikation mit der hier verwendeten *Pfu*-Polymerase, die Korrekturleseaktivität aufweist. Deshalb werden auf folgende Weise die A-Überhänge angefügt:

<i>Pfu</i> -Produkt (aus Gelextraktion 2.3.3.2)	50 µl
Taq-Polymerase	2 U
dATP (100 mM)	1 µl
Puffer (10x)	10 µl
H ₂ O _{bidest}	38 µl

Diesen Ansatz lässt man für 1 h bei 72°C inkubieren und arbeitet es wie folgt auf. Man überschichtet den Ansatz mit 100 µl Chloroform, schüttelt es vorsichtig und zentrifugiert anschließend für zwei Minuten bei 4°C. Die obere Phase neutralisiert man mit 10 µl NaAcetat (pH 5,2). Danach fällt man die DNA (2.3.1.3) und nimmt sie in 10 µl H₂O_{bidest} auf.

Im folgenden sind die Bedingungen für die Klonierung der *P. miotherma*-Enzyme aufgeführt.

Tabelle 8: PCR-Ansatz der *P. miotherma*-Enzyme

Substanz	Volumen [μ l]
PCR Grade Water	28,6
dNTP-Mix (2 mM)	5
Template-DNA	1
Primer „forward“	4
Primer "reverse“	4
KOD HiFi DNA Polymerase	0,4
MgCl ₂ 10 mM	5,0
10x Puffer	5
Gesamtvolumen	50,0

Tabelle 9: Pcr-Prgramm der *P. miotherma*-Enzyme

Temperatur [°C]	Zeit [sek]	Reaktion
98	15	Denaturierung
Gradient 60-80	5	Primerannealing
72	40	Primerverlängerung

} 30x

Tabelle 10: Verwendete Primer der PCR

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Schmelztemperatur	Bseonderheiten/ Anwendung
511_for+400	ggg cct ttg gtt gaa tct cct gta	62,7 °C	Template
511_rev+200	ggg ttt ttg taa agg aaa gat agt tac cga	62,7°C	Template
511_gen_for	ggg <u>cat agt</u> cca gtt aaa att tct ttt ata gga	63,3°C	Schnittstelle <i>NdeI</i>
511_gen_rev	ggg <u>aag ctt</u> tta cct tct ata atg ctc ctt cat tcc	68,3°C	Schnittstelle <i>HindIII</i>
720_for_+400	ggg aat tcc ccc tgc ttt ttt tgt	61,0°C	Template
720_rev+200	ggg agc tat tcc tga aga agt gga	62,7°C	Template
1263_720_for_gen	ggg <u>cat atg</u> aca gct atc aag tta	59,3°C	Schnittstelle <i>NdeI</i>
1263_720_gen_rev	ggg <u>aag ctt</u> cta ttt ttt gct gta gtg ctt	64,0°C	Schnittstelle <i>HindIII</i>

2.3.5. Enzymatische Modifikation von DNA

2.3.5.1. Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Diese Methode des Schneidens von DNA beruht auf der hohen Spezifität der aus Prokaryonten 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 10-fach konzentrierten Restriktionspuffers und dem gewünschten Restriktionsenzym (1-5 U/µg DNA) versetzt und für 2-4 h inkubiert. Bei Doppelverdauansätzen konnte man

nach verschiedenen Methoden verfahren. Zum einen konnte man einen Puffer, in dem beide Enzyme gut schneiden, verwenden. Gab es keinen für beide Enzyme kompatiblen Puffer, so wurde die DNA-Lösung nach dem Schneiden mit dem ersten Enzym aufgereinigt (2.3.2.3) und anschließend mit dem zweiten Enzym und dem dazugehörigen Puffer erneut verdaut.

Standard-Restriktionsansatz:

DNA-Lösung	x µl
Restriktionspuffer (10x)	2 µl
Restriktionsenzym	1-5 U/µg DNA
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

2.3.5.2. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation restriktionsverdauter Plasmid-DNA zu vermeiden, konnten die 5'-Phosphatgruppen enzymatisch mit Antarctic Phosphatase (Novagen) abgespalten werden.

Durchführung:

Zu einem 100 µl Restriktionsverdau wurden 20 µl H₂O_{bidest}, 15 µl Phosphatase und 15 µl 10x Phosphatasepuffer zugegeben. Nach einer Inkubation für 45 min bei 37°C erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 20 min bei 65°C. Wenn die DNA für weitere Präparationen verwendet werden sollte, erfolgte im Anschluss eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (II 2.3.1.2) mit anschließender Ethanol- bzw. Isopropanolfällung (II 2.3.1.3).

2.3.5.3. Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation wird eine Phosphodiesterbindung zwischen doppelsträngigen DNA-Fragmenten gebildet, die mindestens ein freies 3'-Hydroxyende und 5'-Phosphatende besitzen. Sollen zwei verschiedene Fragmente miteinander verknüpft werden, so empfiehlt sich das kleinere Fragment im Überschuss hinzuzufügen.

Ligationsansatz:

Vektor DNA*	3 µl
Insert DNA*	12 µl
10x Ligationspuffer	2 µl
T4-DNA-Ligase (Promega)	1 U
H ₂ O	ad 20 µl

Inkubation bei 16°C ü.N.

* bei gleicher Konzentration

2.3.6. Transformation von *E. coli*

2.3.6.1. Transformation durch Elektroporation

Bei dieser Methode wird die Zellmembran durch kurze elektrische Impulse für DNA passierbar gemacht. Die Transformationseffizienz liegt hier bei ca. 10^9 - 10^{10} Transformanten pro µg DNA. Entscheidend bei der Methode sind die Stärke des elektrischen Feldes, die Dauer des Pulses und die Konzentration der DNA.

Lösungen:

LB-Medium:

2.2.1.1

SOC-Medium:

Caseinpepton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
Glukose	20 mM

Mit NaOH auf pH 7,0 einstellen und aliquotieren (ca. 25 ml). Die Glukoselösung wurde getrennt autoklaviert.

Herstellung elektrokompenter Zellen:

500 ml Medium wurden mit 2,5 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden unter starkem Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,6 angezogen. Die Zellsuspension wurde anschließend rasch für 10-15 min auf Eis gekühlt. Nach Abzentrifugieren der Zellen (GSA-Rotor, 5.000 Upm, 20 min, 4°C) wurde das Pellet mit 500 ml sterilem MQ oder H_2O_{bidest} gewaschen. Darauf folgte eine erneute Zentrifugation unter den beschriebenen Bedingungen. Danach wurden die Zellen in 40ml 10 % (w/v) Glycerin aufgenommen und gut gemischt. Nach erneuter Zentrifugation unter den beschriebenen Bedingungen für 10 min wurde das Volumen des Pellets abgeschätzt und das gleiche Volumen 10 % Glycerin zugegeben. Die Zellen wurden gut resuspendiert, aliquotiert (60-100 μ l) und bei -70°C gelagert.

Transformation:

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit der DNA-Lösung gemischt (die DNA-Lösung sollte keine Salze enthalten, gegebenenfalls erfolgte eine Dialyse gegen H_2O_{bidest}). Es folgte eine Inkubation des Ansatzes für 20 min auf Eis. Die Zellen wurden dann in eine Elektroporationsküvette pipettiert und in einem Elektroporationsgerät (Gene-Pulser®II, Bio-Rad GmbH, München) unter folgenden Bedingungen elektroporiert:

Kapazität 25 μ F

Spannung 2500 V

Widerstand 200 Ω

Die Entladungszeit sollte zwischen 4,5 und 5 ms liegen. Im Anschluss wurden die Zellen sofort mit 1 ml SOC- oder LB-Medium gemischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Plattierung unterschiedlich großer Aliquots auf LB-Agar mit dem entsprechenden Selektionsdruck und anschließender Inkubation ü.N. bei 37°C.

2.3.6.2. Transformation nach Inoue et al. (1990)

Lösungen:

SOB-Medium (Hanahan, 1983):

Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
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	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
pH 6,7	

Herstellung kompetenter Zellen:

Die Hauptkultur (250 ml SOB-Medium, in 1 l-Schikanekolben) wurde mit 1 ml einer exponentiell wachsenden *E.coli*-LB-Vorkultur angeimpft und unter kräftiger Belüftung bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Nach rascher Abkühlung der Suspension in Eiswasser wurden die Zellen durch Zentrifugation (GSA-Rotor, 5.000 Upm, 10 min, 4°C) geerntet, in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, weitere 10 min auf Eis gestellt und nochmals abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml kaltem TB-Puffer aufgenommen, erneut 10 min auf Eis gestellt und als 100 µl- und 200 µl-Aliquots in vorgekühlte E-Cups portioniert. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen bei -70°C gelagert.

Transformation:

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit der DNA-Lösung (kompletter Ligationsansatz) vorsichtig gemischt und zur Adsorption der DNA an die Zellen für 30-60 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte für 90 s bei 42°C im

Heizblock. Nach Zugabe von 1ml kaltem LB-Medium wurde der Ansatz 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden Aliquots unterschiedlicher Größe auf Agarplatten unter Selektivbedingungen ausplattiert.

2.3.6.3. X-Gal-Test zur Detektion rekombinanter Klone

Dieser Test wurde neben den plasmidkodierten Antibiotikaresistenzen zur Selektion rekombinanter Klone verwendet. Er basiert auf der Grundlage, daß die β -Galaktosidase X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) enzymatisch spaltet. Das Reaktionsprodukt wird durch Luftoxidation zu einem blauen Indigofarbstoff (5-Brom-4-Chlor-indigo) umgewandelt. Plasmide der pBluescript-Reihe enthalten neben dem Promoter- und Operatorbereich des *lac*-Operons auch das 5'-Ende des *lacZ*-Gens, welches für das α -Peptid der β -Galaktosidase kodiert. Dieses wiederum kann die durch eine Deletion verkürzte, inaktive β -Galaktosidase verschiedener *E. coli*-Klonierungsstämme (DH5 α , XL1-Blue) komplementieren (α -Komplementation). IPTG wird dabei als künstlicher Induktor der β -Galaktosidase-Gene in den Zellen verwendet. Für den Test wurde ein Aliquot einer transformierten *E. coli*-Suspension auf selektiven Nährböden, die IPTG und X-Gal enthielten, ausplattiert.

Im *lacZ*-Gen liegt die multiple Klonierungsstelle des Vektors. Wenn das *lacZ*-Gen durch den Einbau von DNA-Fragmenten unterbrochen wird, kann im Wirtsorganismus keine aktive β -Galaktosidase gebildet werden.

Daher konnten die gewachsenen Kolonien anhand ihrer Färbung unterschieden werden. Blaue Kolonien enthielten nur 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 wurde (wenn die integrierte DNA einen Transkriptionsterminator trug) oder es zur Bildung eines Hybridproteins kam, welches keine funktionelle α -Komplementation im Wirtsorganismus ermöglichte.

2.3.7. Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Alle Sequenzierungen doppelsträngiger Plasmid-DNA wurden, nach Bereitstellung der entsprechenden hochreinen Plasmid-DNA (2.3.2.3), vom Laboratorium für

Genomanalyse (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Göttingen) mit dem firmeninternen Verfahren durchgeführt. Sie dienen dem Vergleich der amplifizierten und klonierten DNA zum Originalgenom.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Standardtechniken für das Arbeiten mit Proteinen

2.4.1.1. Quantitative Proteinbestimmung (Bradfordtest)

Für einen quantitativen Nachweis von Proteinen wurde der „Protein Assay Kit“ von Bio-Rad verwendet, der auf der kolorimetrischen Methode von Bradford (1976, mod.) basiert. Proteine und Peptide mit einer Molekularmasse > 3 kDa bilden mit dem in saurer Lösung anionisch vorliegenden Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 einen blauen Farbkomplex, der photometrisch gemessen werden kann. Die untere Nachweisgrenze dieses Tests liegt bei 1 µg. Maximal können Proteinmengen bis 10 µg bestimmt werden.

Durchführung:

Mit der nach Angaben des Herstellers (Bio-Rad, München; Konzentrat-Verdünnung 1:5 mit H₂O_{bidest}) angefertigten Färbelösung wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) im Bereich von 0-20 µg Protein/Ansatz erstellt. Die Proteinlösung wurde dazu mit 1 ml 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 Proteinkonzentration einer unbekannt Probe konnte nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Protein [mg/ml]} = \text{OD}_{595} \times m / V$$

m = Steigung der Eichgeraden
V = Probenvolumen [µl]

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

Mit Hilfe der SDS-PAGE (nach Laemmli, mod., 1970) lassen sich Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse auftrennen. SDS bindet und denaturiert Proteine, wodurch deren Tertiär- und Quartärstruktur zerstört wird. Proteine, die aus

Dimeren oder Multimeren bestehen, werden in ihre Untereinheiten zerlegt. Durch das Einlagern der zahlreichen negativen Dodecylsulfatreste wird die Eigenladung des Proteins überdeckt. Entsprechend der Peptidkettenlänge wird eine äquivalente negative Ladung angelagert, wodurch die Auftrennung nach der molekularen Masse ermöglicht wird. Für die Trennleistung in einem bestimmten Molekularmassenbereich ist der Vernetzungsgrad des SDS-Gels entscheidend. Zur Auftrennung von Proteinen mit Molekularmassen im Bereich von 10-180 kDa wurde ein 10 %-iges Gel verwendet.

Lösungen:

Acrylamid-Stammlösung (AA):

40 % (w/v) Fa. Feinchemikalien GmbH Biomol, Mannheim

Trenngel-Stammlösung:

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

mit HCl_{konz.} auf pH 8,8 einstellen

Sammelgel-Stammlösung:

Tris	6,1 g
SDS	0,4 g
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

mit HCl_{konz.} auf pH 6,8 einstellen

10x Elektrophoresepuffer:

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

mit Glycin auf pH 8,3 einstellen

4x Probenpuffer:

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

mit HCl_{konz.} auf pH 6,8 einstellen, aliquotieren und bei –20°C aufbewahren

Ammoniumpersulfat (APS):

10 % Ammoniumpersulfat (w/v) in H₂O_{bidest} aliquotieren und bei –20°C aufbewahren.

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED):

Fa. Feinchemikalien GmbH Biomol, Mannheim

Herstellung der Gele:

Für die Elektrophorese wurde eine Mini-Protean-II-Apparatur (Bio-Rad, München) verwendet. Nach Reinigung der Glasplatten und Spacer mit 70 %-igem (v/v) Ethanol wurden diese nach Angaben des Herstellers in den Gießstand eingesetzt. Das Trenngel wurde nach dem folgenden aufgeführten Schema zusammenpipettiert,

wobei APS und TEMED zuletzt zugegeben wurden. Nach gründlichem Mischen wurde der Ansatz bis 2 cm unter den oberen Rand der Glasplatten gegossen und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel ebenfalls nach dem unten aufgeführten Schema zusammenpipettiert und auf das Trenngel gegossen. Danach wurde der Kamm möglichst luftblasenfrei eingesetzt.

Pipettierschema für ein Gel:

	Trenngel (12 %)	Sammelgel (4 %)
Trenngel-Stammlösung	1 ml	---
Sammelgel-Stammlösung	---	0,48 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	1,8 ml	1,32 ml
Acrylamid-Stammlösung	1,2 ml	0,2 ml
APS (10% (w/v))	30 μl	15 μl
TEMED	3 μl	2 μl

Probenvorbereitung:

Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer gemischt (1:4) und anschließend 10 min bei 95°C denaturiert. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden die Ansätze kurz abzentrifugiert.

Elektrophorese:

Das SDS-Gel wurde in der Elektrophoreseapparatur fixiert und der Anoden- und Kathodenraum mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Geltaschen konnten mit bis zu 20 μl der vorbereiteten Proben gefüllt werden. Die Elektrophorese wurde dann bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA durchgeführt, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte (ca. 60 min).

2.4.1.3. Coomassie-Färbung von Proteinen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die SDS-Gele kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gespült und dann für 30 min in der Färbelösung auf einer Wippe gefärbt. Nach Spülen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurde das Gel in Entfärbelösung, welche mehrmals erneuert wurde, geschwenkt, bis der Hintergrund des Gels farblos war. Die fertigen Gele konnten dann luftblasenfrei zwischen 2 Lagen Cellophanfolie im Gel-Air-Dryer (Bio-Rad, München) für 2-3 h getrocknet werden.

Lösungen:

Färbelösung:

Coomassie Brilliant Blue R250	1,5 g
Methanol	455 ml
Eisessig	80 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml

filtrieren, kann mehrmals verwendet werden

Entfärbelösung:

Methanol	250 ml
Eisessig	350 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 5000 ml

2.4.1.4. Größenbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteingrößen nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel erfolgte anhand eines im Gel mit aufgetrennten internen Standards. Dazu wurde der „High Molecular Weight Standard“ verwendet, der aus folgenden 6 Proteinen besteht:

Markerproteine	Molekularmasse [Da]
Ferritin	450 000
Ketolase	240 000
Aldolase	158 000
Albumin, Rind	68 000
ChymotrypsinogenA	25 000

2.4.1.5. Konzentrierung und Dialyse von Proteinlösungen

Aufkonzentrierung in Mikrokonzentratoren:

Zur Aufkonzentrierung einer Proteinlösung wurden „Amicon Ultra“ (Millipore) mit einer Ausschlussgrenze von 30 kDa und einem maximalen Probenvolumen von 15 ml verwendet. Sie funktionieren nach dem Prinzip der zentrifugalbetriebenen Filtration und können nicht trocken laufen.

Umpufferung durch Dialyse:

Zur Entsalzung und Umpufferung von Proteinlösungen wurde eine Dialyse in Dialyseschläuchen (VISKING® Dialysis Tubing, Serva, Heidelberg) durchgeführt. Dazu wurde ein entsprechend großes Schlauchstück abgeschnitten, für 10-15 min in H₂O_{bidest} aufgekocht, mit der Proteinlösung gefüllt und an beiden Enden mit Dialyseklammern abgedichtet. Die Dialyse erfolgte, falls nicht anders angegeben, über Nacht unter leichtem Rühren gegen 2-5 l Puffer bei 4°C.

2.4.2. Gewinnung und Aufreinigung von Proteinen

Zur Gewinnung von cytosolischen Proteinen wurden Bakterienstämme je nach Verwendungszweck in Maßstäben von 5 ml bis 4,5 l unter den entsprechenden Bedingungen angezogen. Zum Testen von Enzymaktivitäten im Rohextrakt vor der Aufreinigung des Proteins wurden 30 ml-Kulturen angezogen. Für die 4,5 l-Hauptkultur wurden 3x1,5 l Erlenmeyerkolben mit Schikane verwendet.

2.4.2.1. Präparation des Zellextraktes

Je nach Volumen der Anzucht wurden die Zellextrakte unterschiedlich hergestellt. Kulturen mit einem Volumen von bis zu 30 ml wurden durch Ultraschall aufgeschlossen, während größere Volumina per French Pressure Cell aufgeschlossen wurden.

Entsprechend der weiteren Vorgehensweise wurden die Zellextrakte während der Präparation in unterschiedlichen Puffern aufgenommen. Sollten weitere Aufreinigungsschritte folgen, so wurde 20 mM Tris-HCl pH 8,0 verwendet.

Puffer:

20 mM Tris-HCl:

Tris 2,42 g

H₂O_{bidest} ad 1000 ml

2.4.2.2. Zellaufschluss durch Ultraschall

Dazu wurde die Kultur (bis 30 ml) durch Zentrifugation bei 10.000 Upm für 15 min geerntet. Nach Waschen der Zellen in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 wurden diese in 2 ml des Puffers pro Gramm Nassgewicht gründlich resuspendiert. Das Mindestvolumen für den anschließenden Zellaufschluss sollte jedoch 500 µl betragen. Unter Verwendung einer Ultraschallsonde (Ultraschallprozessor UP 200s, Dr. Hielscher GmbH) wurden die Zellen bei einer Amplitude von 35 und einem Cycle von 0,5 für 5 min auf Eis aufgeschlossen. Im Lichtmikroskop wurde die Vollständigkeit der Lyse kontrolliert und der Aufschluss im Ultraschallprozessor gegebenenfalls wiederholt. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 13.000 Upm und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand (=Rohextrakt) wurde in ein neues E-Cup überführt.

2.4.2.3. Zellaufschluss mit der French Pressure Cell

Dazu wurden die Zellen bei 7.000 Upm und 4°C für 20 min geerntet und in dem entsprechenden Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter denselben Bedingungen wurde das Pellet in 2 ml Puffer pro Gramm Nassgewicht gründlich resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in der French Pressure Cell (American Instrument Company, Silver Spring, USA) mit 1000 psi (=6,9 Mpa) in zwei Passagen aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und bei Bedarf wiederholt. Die Zelltrümmer wurden hochtourig abzentrifugiert (13.000 Upm, 4°C, 30 min) und der Rohextrakt abgehoben.

2.4.2.4. Abtrennung thermolabiler Proteine durch Hitzedenaturierung

Um ein thermostabiles heterologes Protein aus dem Zellextrakt eines mesophilen Wirtes anzureichern, eignet sich in vielen Fällen eine Hitzedenaturierung, bei dem ein Großteil der wirtseigenen Proteine präzipitieren. Dabei ist zu beachten, daß die gewählte Temperatur und Zeitdauer dieses Schrittes für jedes anzureichernde Protein neu bestimmt werden muss. Aufgrund der Aufheizzeiten verschieden großer

Volumina sind Ergebnisse aus Experimenten im E-Cup keinesfalls auf größere Volumina beziehbar. Zur Aufreinigung der putativen Glukosidasen aus *P. miotherma* wurde die Hitzedenaturierung bei 60°C für 20 min im Heizblock durchgeführt. Die denaturierten Proteine wurden im Anschluss bei 13.000 Upm und 4°C für 20 min abzentrifugiert und der Überstand mit dem angereicherten Protein abgenommen.

2.4.2.5. 6x His Tag-Aufreinigung

Die Zellen wurden bei 7000 Upm in GS3-Bechern geerntet, in LEW-Puffer des Protino[®] Ni 2000 Kit von Machery-Nagel aufgenommen und mittels einer French Pressure Cell aufgeschlossen. Den Rohextrakt reinigte man gemäß Protokoll der Firma Machery-Nagel weiter auf.

2.4.2.6. Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

2.4.2.7. Geräte und Säulen

Folgende FPLC-Anlagen und Säulen wurden verwendet:

Geräte: 1) BioCAD[®] SPRINT[™] Perfusion Chromatography[®] System
 2) ÄKTA FPLC UPC-900 Amersham Biosciences

Säulen: SOURCE 15Q (50 ml)
 Phenyl Sepharose HP XK 16/10
 Superose 6 10/300 GL

Die Puffer und Proben müssen vor dem Auftragen auf die Säule durch Filtration (0,2 µm bzw. 0,45 µm Porenweite) partikelfrei gemacht werden. Für die verschiedenen Säulen müssen jeweils die Parameter der Bindungskapazität, der optimalen Flussrate, des Rückdruckes sowie der chemischen und physikalischen Stabilität und Regenerierung beachtet werden. Die Säulen werden in 20 % (v/v) Ethanol gelagert und vor der Umpufferung zu einem salzhaltigen Eluenten mit H₂O_{bidest} gespült. Um das Eindringen von Luft in das System zu verhindern, sollten die Anschlüsse „drop to drop“ verbunden werden.

2.4.2.8. Trennprinzipien

Ionenaustausch-Chromatographie (IEC)

Prinzip:

Die Trennung beruht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und den funktionellen Gruppen des Gelmaterials. Dabei treten geladene Gruppen auf der Proteinoberfläche mit entgegengesetzt geladenen Gruppen auf der Austauschermatrix in Wechselwirkung 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, die zu einer Schwächung der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen Protein und Gelmaterial führt.

Bei dieser Chromatographie wurde der starke Anionenaustauscher SOURCE 15Q in einer selbstgepackten XK 26/60 Säule (50 ml Säulenvolumen) verwendet. Der Durchmesser des aus monodispersen Partikeln bestehenden Materials beträgt 15 µm. Dadurch wird eine hohe Stabilität und ein geringer Rückdruck gewährleistet. Die funktionelle Gruppe des SOURCE 15Q ist ein quartäres Amin, das über einen hydrophilen Spacer an die Säulenmatrix gebunden ist. Die Proteinbindungskapazität beträgt bis zu 25 mg pro ml Gelbett. Die empfohlene Flussrate wird mit 30-600 cm/h (0,5-10 ml/min) bei einem maximalen Rückdruck von 5 MPa angegeben.

Methodik:

Zunächst wurde die Säule mit 2 Säulenvolumina Elutionspuffer B gespült, um funktionelle Gruppen mit Gegenionen abzusättigen. Anschließend wurde das Medium mit 10 Säulenvolumen Auftragspuffer A auf die Startbedingungen äquilibriert. Die Probe, die sich am besten in Puffer A befinden sollte, wurde unter Niedrigsalzbedingungen auf die Säule aufgetragen und in einem ansteigenden Salzgradienten (8,5 Säulenvolumen) eluiert.

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

Puffer B: 20 mM Tris-HCl pH 8,0 + 1M NaCl

Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC):

Prinzip:

Bei dieser Methode werden Unterschiede in der Oberflächenhydrophobizität der einzelnen Proteine als Trennprinzip genutzt. Durch Auftragung der Proteine in einem Puffer mit hoher Ionenstärke entstehen starke Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Oberflächenbereichen der Polypeptide und den hydrophoben Liganden der Säulenmatrix. Treibende Kraft für diese Wechselwirkung ist die Entropie, die durch die Aggregation unpolarer Gruppen in polarer Umgebung zunimmt. Die Elution erfolgt durch eine Verringerung der Polarität des Puffers. Dies kann durch Reduzierung der Ionenstärke, den Austausch des Salzes gegen eines mit geringerem Aussalzeffekt (Hofmeister-Serie) oder durch Zugabe von unpolaren Agenzien (Ethylenglykol, Harnstoff, Detergenzien, organische Lösungsmittel) erfolgen.

Für diese Methode wurde eine Phenyl Sepharose HP XK 16/10 Fertigsäule mit 20 ml Säulenvolumen verwendet. Die Gelmatrix besteht aus stark quervernetzten Agarosepartikeln (24-44 µm Durchmesser), die über ungeladene, chemisch stabile Etherbindungen mit Phenylresten derivatisiert sind. Die empfohlene Flussrate liegt bei 50-150 cm/h bei maximal 0,3 MPa Rückdruck.

Methodik:

Vor dem Auftragen der Probe wurde mit 2 Säulenvolumen Puffer B auf Hochsalzbedingungen äquilibriert. Die Probe muss sich ebenfalls in einem Milieu hoher Ionenstärke befinden. Dazu wurde sie in mehreren Schritten vorsichtig auf 5 M NaCl hochgesalzt. Die Elution erfolgte im absteigenden Salzgradienten, wobei evtl. mit H₂O_{bidest} nacheluiert werden muss, um stark hydrophobe Proteine wieder von der Säule zu lösen.

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

Puffer B: 20 mM Tris-HCl pH 8,0 + 5 M NaCl

Gelfiltration:

Prinzip:

Die Gelfiltration ist im Gegensatz zur Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophoben Interaktions-Chromatographie eine nicht-adsorptive Methode, bei der die Trennung der Proteine aufgrund ihrer Größe erfolgt. Gelfiltrations-Medien sind inerte, poröse Matrices, die den Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Größe ein mehr oder weniger großes Verteilungsvolumen bieten. Dadurch eluieren größere Moleküle früher als kleinere.

Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,0

Molekularmassenbestimmung eines Proteins:

Aufgrund der Korrelation des Elutionsvolumens mit der Größe eines Proteins kann die Gelfiltration zur Bestimmung der Nativ-Molekularmasse von Proteinen eingesetzt werden. Dazu wurden die Superdex 200 prep grade XK 16/60 und die Superose 6 10/300 GL verwendet.

Folgende Säulenparameter müssen bekannt sein:

- das gesamte Säulenvolumen V_t
- das Ausschlussvolumen der Säule V_0
- das Elutionsvolumen des Proteins V_e

Anhand dieser Größen konnte man den Verteilungskoeffizienten K_{av} eines Proteins ermitteln, der folgendermaßen definiert ist:

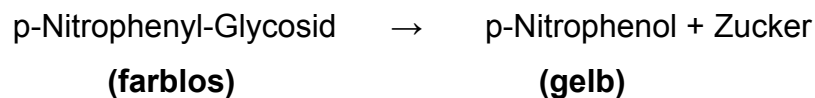
$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Durch Kalibrierung der Gelfiltrationssäule mit Eichproteinen kann man anhand der oben aufgeführten Formel den jeweiligen Verteilungskoeffizienten für die einzelnen Proteine bestimmen. Mit Hilfe einer Auftragung des dekadischen Logarithmus der Molekularmasse gegen den K_{av} -Wert erhält man eine Eichgerade, aus der man die Molekularmasse eines beliebigen Proteins anhand seines Verteilungskoeffizienten berechnen kann.

Als Säulenpuffer wurde 50 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA (pH 7,5 (Superose 6 Säule)) verwendet.

2.4.2.9. Hydrolyse von para-Nitrophenyl-Substraten

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



Testansatz für das zu dem ORF PM0720 korrespondierende Protein:

Probe		x μ l
Tris-Cl pH 7 ^(60°C) :	0,5 M	30 μ l
MnCl ₂ :	6 mM	30 μ l
NAD ⁺ :	2,7 mM	30 μ l
Dithiothreitol (DTT):	0,5 M	15 μ l
H ₂ O _{bidest.} :		185 – x μ l

Testansatz für das zu dem ORF PM1263 korrespondierende Protein:

Probe		x μ l
Tris-Cl pH 7 ^(60°C) :	0,5 M	30 μ l
MnCl ₂ :	6 mM	30 μ l
NAD ⁺ :	9 mM	30 μ l
Dithiothreitol (DTT):	0,5 M	15 μ l
H ₂ O _{bidest.} :		185 – x μ l

Durchführung:

- 5 min Präinkubation des Testansatzes bei 60°C.
- Start durch Zugabe von 10 µl p-Nitrophenyl- α -D-glukopyranosid (0,1 M in DMSO, Lagerung bei -20°C) und Inkubation bei 60°C für eine definierte Zeit (Gelbfärbung).
- Abstoppen auf Eis durch Zugabe von 250 µl EDTA (0,5 M; pH 8,0) 250 µl Na₂CO₃ (2,4 M).
- Bestimmung der Extinktion bei 420 nm gegen eine Negativkontrolle ohne Enzym.

Testansatz für MelA aus *E. coli*:

Probe		x µl
HEPES pH 7 ^(37°C) :	0,5 M	30 µl
MnCl ₂ :	1,5 mM	30 µl
NAD ⁺ :	5 mM	30 µl
Dithiothreitol (DTT):	0,5 M	15 µl
H ₂ O bidest.:		185 – x µl

Durchführung:

- 5 min Präinkubation des Testansatzes bei 37°C.
- Start durch Zugabe von 10 µl p-Nitrophenyl- α -D-galaktopyranosid (0,1 M in H₂O, Lagerung bei -20°C) und Inkubation bei 37°C für eine definierte Zeit (Gelbfärbung).
- Abstoppen auf Eis durch Zugabe von 250 µl EDTA (0,5 M; pH 8,0) 250 µl Na₂CO₃ (2,4 M).
- Bestimmung der Extinktion bei 420 nm gegen eine Negativkontrolle ohne Enzym.

2.4.2.10. Abhängigkeit der Enzymaktivität von Cofaktoren

Der Einfluß von Cofaktoren auf die Aktivität der α -Glukosidasen wurde mit dem in 2.4.2.9 beschriebenen Standard-Test mit den dort beschriebenen Konzentrationen

der Cofaktoren durchgeführt. Zur Ermittlung des Effektes (der Konzentration) eines Cofaktors auf die enzymatische Aktivität der α -Glukosidase wurden die beiden anderen Cofaktoren jeweils in ihren optimalen Konzentrationsverhältnissen zugesetzt.

2.4.2.11. Reduzierende Agenzien

Der stimulierende Effekt von DTT legte nahe, daß ein reduzierendes Agenz für die α -Glukosidase/Galaktosidase-Aktivität benötigt wurde. Aus diesem Grunde wurde das DTT aus dem Standard-Test entfernt und durch variable Konzentrationen von 2-Mercaptoethanol oder L-Cystein ersetzt. Da L-Cystein leicht eine Änderung des pH-Wertes im Testansatz bewirken kann, wurde es in einem geeigneten Puffer gelöst und der pH- Wert der Testansätze bei den verschiedenen L-Cystein-Konzentrationen auf seine Konstanz hin überprüft.

2.4.2.12. Produktanalyse durch Dünnschichtchromatographie (TLC)

Die Dünnschichtchromatographie ist eine Form der Verteilungschromatographie zwischen einer hydrophilen (stationären) und einer hydrophoben (mobilen) Phase. Verschiedene Stoffgemische organischer Verbindungen wie Zucker, Aminosäuren und Nukleotide können dabei analysiert bzw. aufgetrennt werden. Auf eine mit Kieselgel beschichtete Aluminium-Folie (Kieselgel 60, F₂₅₄, Merck) wurde das zu analysierende Stoffgemisch aufgetragen. In einer geschlossenen Kammer bewirken Kapillarkräfte das Aufsteigen eines Lösungsmittelgemisches aus einer wässrigen und einer organischen Komponente. Während die wässrige Komponente mit dem Sorptionsmittel eine stationäre Phase bildet, bewirkt die organische Komponente als mobile Phase eine Auftrennung des Stoffgemisches entsprechend der Polarität. Unpolare Moleküle laufen dabei schneller als polare. Nach dem Lauf wurde die Folie getrocknet und mit einer bestimmten Reagenzlösung eingesprüht. Bei 140°C und einer Inkubationszeit von 15 min bildeten die Moleküle mit der Sprühlösung gefärbte Produkte, die anhand eines Maltooligosaccharid-Standards (G1-G7) identifiziert werden konnten.

Lösungen:

Laufmittel 1:

1-Propanol	50 %
Nitromethan	30 %
H ₂ O _{bidest}	20 %

Entwicklung: 1x bei RT

Laufmittel 2:

1-Propanol	60 %
Ethylacetat	10 %
H ₂ O _{bidest}	30 %

Entwicklung: 2x bei RT

Sprühreagenz 1:

Anilin	1 ml
Diphenylamin	1 g
Aceton	100 ml

Sprühreagenz 2:

Diphenylhydrazin	0,1 g
H ₂ SO _{4(konz)}	5 ml
Ethanol _{abs}	ad 100 ml

Lagerung lichtgeschützt bei 4°C

Vor dem Besprühen der Folie wurde ein entsprechendes Volumen des Sprühreagenz 2 entnommen (ca. 5 ml pro Folie) und in Falle von Sprühreagenz 1 mit ortho-Phosphorsäure (85 % (v/v)) versetzt, bis die Lösung wieder aufklarte (ca. 10 % (v/v)).

2.4.2.13. Präparative Dickschichtchromatographie (PDC)

Eine Aufschlämmung von je 55 g Kieselgel P/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel & Co) in 120 ml Wasser schichtet man auf waagrecht liegende Glasplatten (20 × 40 cm oder 20 × 20 cm), läßt an der Luft trocknen und aktivierte 3 h bei 130 °C.

Die Proben trägt man mit einer Pasteurpipette auf und läßt es gut trocknen. Anschließend entwickelt man die PDC wie eine DC (2.4.2.12) mit dem gleichen Laufmittel. Im Gegensatz zur DC wird das Sprühreagenz nach dem Trocknen nicht auf die gesamte Oberfläche aufgetragen, sondern nur ein schmaler Rand besprüht. Diesen entwickelt man mit einem Heißluftfön und sorgt dafür, daß der Rest der Platte nicht mit erwärmt wird. Aus den gefärbten Banden extrapoliert man über die nicht besprühten Bereiche der Platte und kratzt die einzelnen Banden mit einem Skalpell von der Glasplatte. Das heruntergekratzte Material wird mit Methanol überschichtet und gut vermischt. Das Kieselgel wird über einen Filter vom Methanol getrennt und danach im Vakuum entfernt am Rotationsverdampfer das Methanol entfernt.

2.4.3. Charakterisierung der Enzymaktivität

2.4.3.1. pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität

Hierfür wurde die Aktivität der α -Galaktosidase mit pNP-Galaktose in einem pH-Bereich zwischen 5,5 und 10 bestimmt. Es wurden folgende Puffer für die verschiedenen pH-Bereiche verwendet: Natriumsuccinat (pH 5.5-7.0), HEPES (pH 7.0-8.5), 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonsäure (CAPS; pH 9.0-10). Die pH-Werte wurden im Falle der Enzyme aus *P. miotherma* bei 60°C und bei MeIA aus *E. coli* bei 37°C eingestellt.

Ansatz: Siehe 2.4.2.9. Es wurden lediglich die o. g. Puffer stattdessen eingesetzt.

Vor Zugabe des Enzyms erfolgte eine Vortemperierung des Ansatzes für 5 min bei der entsprechenden Temperatur. Nach Zugabe des Enzyms wurde für weitere 3min inkubiert. Angegeben wird die relative Aktivität (in %) bezogen auf die höchste gemessene Aktivität in der Messreihe.

2.4.3.2. Temperaturabhängigkeit der Aktivität

Ansatz: Siehe 2.4.2.9.

Nach Präinkubation des Ansatzes für 5 min bei der jeweiligen Temperatur erfolgte die Zugabe des Proteins und eine weitere Inkubation für 3 min.

2.4.3.3. Thermische Inaktivierung

Um die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Inkubationstemperatur und Inkubationszeit zu verfolgen, wurde für jede Temperatur ein Pool gebildet, der Enzym, Puffer bei der jeweiligen Temperatur und $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ enthielt. Die E-Cups wurden im Heizblock oder Heihschrank bei den entsprechenden Temperaturen präinkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und auf die verbliebene Restaktivität im pNP-Test untersucht.

Ansatz (Enzym-Pool): Siehe 2.4.2.9.

Vor Zugabe des Enzyms aus dem jeweiligen Pool und der anschließenden Inkubation für 3 min bei der entsprechenden Temperatur erfolgte keine Vortemperierung. Angegeben wird die verbliebene Restaktivität (in %) bezogen auf die Aktivität eines Aliquots aus dem jeweiligen Pool ohne Präinkubation.

2.4.3.4. Bestimmung des Substratspektrums

Zur Bestimmung des Umsatzes polymerer Substrate wurden die Enzyme mit der entsprechenden Substanz unter den in 2.4.2.9. aufgeführten Bedingungen inkubiert. Lediglich das pNP-Substrat wurde durch das zu testende Substrat ersetzt. Das entstandene Substratspektrum wurde durch Dünnschichtchromatographie analysiert.

2.4.4. Kristallisation

2.4.4.1. Sitting-Drop

Es existieren zwei gängige Methoden zur Kristallisation mittels Dampfdiffusion, die "Sitting-Drop"- und die "Hanging-Drop"-Methode. Erstere wurde hier angewandt. Die Sitting-Drop-Methode kam hauptsächlich bei den Fertigscreens zum Einsatz. Die 24'er-Platten wurden mit je 1 ml Reservoir gefüllt, und die Tröpfchen bestanden aus

je 1 μ l Proteinlösung und 1 μ l Mutterlösung. Die mit Crystal-Clear versiegelten Platten kamen zur Lagerung in einen 18°C-Kristallisationsschrank.

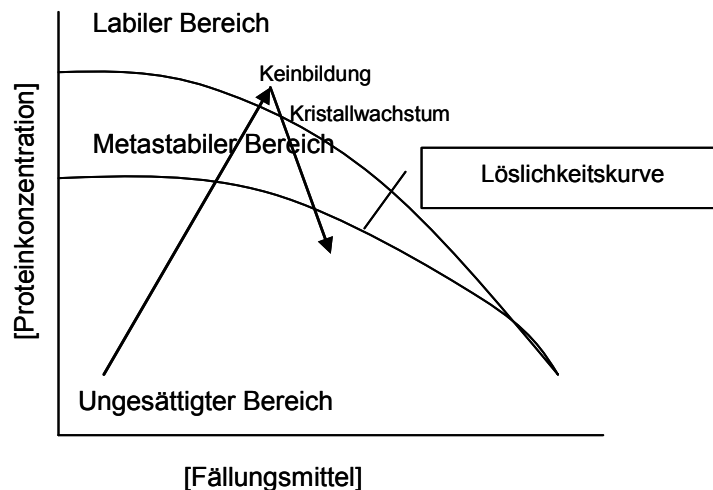


Abbildung 3: Phasendiagramm. Die Pfeile repräsentieren den Konzentrations-Zeit-Verlauf während des Kristallisationsprozesses.

Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Kristallisation von biologischen Makromolekülen ist zunächst einmal eine sehr reine Proteinlösung. Das Problem, das sich gleich unmittelbar anschließt, ist die Überwindung der sogenannten Keimbildungsbarriere. Allgemein können sich Kristallisationskeime nur in übersättigten Lösungen bilden (siehe Abbildung 3). Dieser Bereich ist jedoch für das Wachstum des Kristalls sehr ungünstig, da hier bevorzugt viele kleine Kristalle entstehen. Für die Züchtung von „großen“ Kristallen sollte die Lösung daher im metastabilen Bereich gehalten werden. Nur werden dort eben keine Kristallisationskeime gebildet. Um dieses Problem zu lösen, wurde die sogenannte Dampfdiffusionsmethode entwickelt. Hierbei wird die Proteinlösung mit einer Mutterlösung, bestehend aus einem Fällungsmittel und diversen anderen Zusätzen, gemischt und in einem versiegelten Raum einem sehr viel größeren Reservoir derselben Mutterlösung gegenübergestellt. Aufgrund der geringeren Fällungsmittelkonzentration im Proteintropfen tritt ein Transport von Wassermolekülen in Richtung Reservoir ein. Die Fällungsmittelkonzentration im Tropfen nimmt zu und irgendwann wird die Keimbildungsbarriere überschritten. Es kommt nun zur Bildung von Kristallisationskeimen. Als Konsequenz daraus verringert

sich die Proteinkonzentration im Tropfen und im Idealfall nähert sie sich dem metastabilen Bereich (Pfeile in Abbildung 3). In diesem Bereich entstehen keine neuen Kristalle mehr und die vorhandenen Kristallisationskeime können langsam weiterwachsen. Es entstehen wenige große Kristalle.

Im folgenden sind die einzelnen Verfeinerungen der verschiedenen Screenings aufgeführt.

Material: Cryschem Plate™ 24 Well, Hampton Research (Aliso Viejo, USA)
Crystal Clear Sealing Tape, Hampton Research (Aliso Viejo, USA)
Fertig-Screenings, Hampton Research (Aliso Viejo, USA)

Crystal Screen

Reagent Formulation Organized By Buffer

Tube Number	Salt	Tube Number	Buffer †	Tube Number	Precipitant
2.	None	2.	None	2.	0.4 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
3.	None	3.	None	3.	0.4 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
30.	0.2 M Ammonium Sulfate	30.	None	30.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
31.	0.2 M Ammonium Sulfate	31.	None	31.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
32.	None	32.	None	32.	2.0 M Ammonium Sulfate
33.	None	33.	None	33.	4.0 M Sodium Formate
42.	0.05 M mono-Potassium dihydrogen Phosphate	42.	None	42.	20% w/v Polyethylene Glycol 8000
43.	None	43.	None	43.	30% w/v Polyethylene Glycol 1500
44.	None	44.	None	44.	0.2 M Magnesium Formate
49.	1.0 M Lithium Sulfate monohydrate	49.	None	49.	2% w/v Polyethylene Glycol 8000
50.	0.5 M Lithium Sulfate monohydrate	50.	None	50.	15% w/v Polyethylene Glycol 8000
1.	0.02 M Calcium Chloride dihydrate	1.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	1.	30% w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
10.	0.1 M Ammonium Acetate	10.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	10.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
20.	0.2 M Ammonium Sulfate	20.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	20.	25% w/v Polyethylene Glycol 4000
24.	0.2 M Calcium Chloride dihydrate	24.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	24.	20% w/v iso-Propanol
34.	None	34.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	34.	2.0 M Sodium Formate
37.	None	37.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	37.	8% w/v Polyethylene Glycol 4000
47.	None	47.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	47.	2.0 M Ammonium Sulfate
9.	0.2 M Ammonium Acetate	9.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	9.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
11.	None	11.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	11.	1.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
26.	0.2 M Ammonium Acetate	26.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	26.	30% w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
40.	None	40.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	40.	20% w/v iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
25.	None	25.	0.1 M Imidazole pH 6.5	25.	1.0 M Sodium Acetate trihydrate
7.	None	7.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	7.	1.4 M Sodium Acetate trihydrate
8.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	8.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	8.	30% w/v iso-Propanol
15.	0.2 M Ammonium Sulfate	15.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	15.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
18.	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	18.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	18.	20% Polyethylene Glycol 8000
21.	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	21.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	21.	30% w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
28.	0.2 M Sodium Acetate trihydrate	28.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	28.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
45.	0.2 M Zinc Acetate dihydrate	45.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	45.	18% w/v Polyethylene Glycol 8000
46.	0.2 M Calcium Acetate hydrate	46.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	46.	18% w/v Polyethylene Glycol 8000
5.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	5.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	5.	30% w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
12.	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	12.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	12.	30% w/v iso-Propanol
14.	0.2 M Calcium Chloride dihydrate	14.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	14.	28% w/v Polyethylene Glycol 400
16.	None	16.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	16.	1.5 M Lithium Sulfate monohydrate
23.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	23.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	23.	30% w/v Polyethylene Glycol 400
27.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	27.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	27.	20% w/v iso-Propanol
29.	None	29.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	29.	0.8 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
35.	None	35.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	35.	0.8 M mono-Sodium dihydrogen phosphate 0.8 M mono-Potassium dihydrogen phosphate
38.	None	38.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	38.	1.4 M tri-Sodium Citrate dihydrate
39.	None	39.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	39.	2% w/v Polyethylene Glycol 400, 2.0 M Ammonium Sulfate
41.	None	41.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	41.	10% w/v iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
4.	None	4.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	4.	2.0 M Ammonium Sulfate
6.	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	6.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	6.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
13.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	13.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	13.	30% w/v Polyethylene Glycol 400
17.	0.2 M Lithium Sulfate monohydrate	17.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	17.	30% Polyethylene Glycol 4000
19.	0.2 M Ammonium Acetate	19.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	19.	30% w/v iso-Propanol
22.	0.2 M Sodium Acetate trihydrate	22.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	22.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
36.	None	36.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	36.	8% w/v Polyethylene Glycol 8000
48.	None	48.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	48.	2.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate

† Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components. pH with HCl or NaOH.

Crystal Screen contains fifty unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.



Solutions for Crystal Growth

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
e-mail: tech@hmail.com
Website: www.hamptonresearch.com

© 2000-2005 Hampton Research Corp. all rights reserved
Printed in the United States of America. This guide or parts thereof may not be reproduced in any form without the written permission of the publishers.

Abbildung 4: Original User-Guide der Firma Hampton Research Corp.

2.4.5. Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenz nennt man die Emission von elektromagnetischer Strahlung bei Belichtung einer Probe. Charakteristisch für die Fluoreszenz ist, daß sie sofort erlischt, wenn die Lichtquelle entfernt wird, daß sie größere Wellenlängen als die einfallende Strahlung besitzt und daß die Schwingungsstruktur des

Fluoreszenzspektrums für den elektronischen Grundzustand der Probe charakteristisch ist. Der Mechanismus der Fluoreszenz besteht in der Anregung in einen höheren elektronischen Zustand des Moleküls, auf den ein strahlungsloser Übergang in den Schwingungsgrundzustand dieses Zustandes folgt, wobei Energie in Form von thermischer Bewegung an die Umgebung abgegeben wird. Sobald das Molekül den Schwingungsgrundzustand erreicht hat, emittiert es seine überschüssige Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung und fällt dabei auf den elektronischen Grundzustand zurück (Abbildung 5).

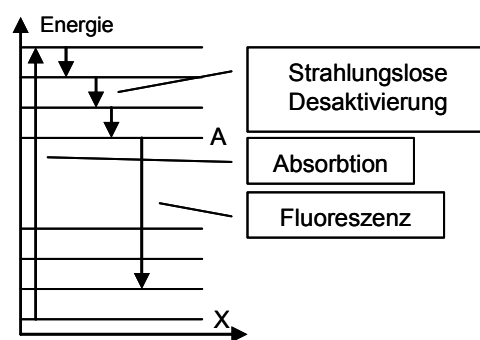


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Mechanismus der Fluoreszenz.

Die Messungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Markus Rudolph auf einem SPEX Fluoromax-3 der Firma Jobin Yvon Horiba durchgeführt.

2.4.6. NMR, Physikalische Grundlagen

Manche Atomkerne haben einen Eigendrehimpuls, den man Spin nennt. Durch diese Eigenschaft baut der Kern ein Magnetfeld auf. Der Betrag des Spin ist $|I| = \hbar\sqrt{I(I+1)}$. Wird die Probe in ein Magnetfeld eingebracht, orientiert sich das magnetische Kernspinmoment relativ zu dem Magnetfeld, dabei präzediert es um die

Richtung von B_0 mit der Larmorfrequenz $\nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0$.

Für die Komponente in Richtung des Magnetfeldes $|\vec{\mu}_I|_z = g_I \mu_K m_I = m_I \gamma \hbar$ gibt es $(2I+1)$ Einstellungsmöglichkeiten relativ zum Magnetfeld; für deren Energiedifferenz mit $\Delta m_I = 1$ gilt: $\Delta E = \gamma \hbar B_0$.

Die Besetzung der einzelnen Energieniveaus folgt aus der Boltzmann-Verteilung und ist abhängig von der Größe der Aufspaltung:

$$\frac{N_{m_i+1}}{N_{m_i}} = \exp(-\Delta E / k_B T) \approx 1 - \frac{\Delta E}{k_B T} = 1 - \frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T} .$$

Um eine Absorption durch Anregung in ein höheres Energieniveau zu beobachten, muß die Besetzung hinreichend unterschiedlich sein, weiterhin muß die Energie des Zusatzfeldes B_1 mit der Energiedifferenz der Niveaus übereinstimmen: $\Delta E = h \nu_1$ bzw.

$$\gamma \hbar B_0 = h \nu_1, \text{ daraus folgt die Resonanzbedingung: } \nu_1 = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 = \nu_L .$$

Durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Molekülgruppen der Probesubstanz ist das Magnetfeld, das auf einen bestimmten Kern wirkt, ungleich dem äußeren Magnetfeld B_0 .

$$\text{Es folgt daraus: } \nu_1 = \frac{\gamma}{2\pi} B_{\text{eff}} = \frac{\gamma}{2\pi} (1 - \sigma) B_0 \text{ mit der Abschirmkonstante } \sigma .$$

Daraus resultiert eine charakteristische Frequenz für bestimmte Kerne, die von der chemischen Umgebung des Kerns abhängig ist. Auch Nachbarkerne beeinflussen die Spinresonanz: Diese Kopplung wird über Bindungselektronen vermittelt und führt bei n chemisch äquivalenten Nachbarkernen mit der Spinquantenzahl I zu $2nI+1$ Signalen.

2.4.7. Messverfahren

2.4.7.1. PFT-Verfahren

Bei dem Pulse-Fourier-Transform-Verfahren werden durch einen Hochfrequenzimpuls gleichzeitig alle Kerne einer Sorte (z.B. alle ^1H -Kerne) angeregt. Der Impuls enthält ein kontinuierliches Frequenzband; die Impulslänge τ_P liegt in der Größenordnung von einigen μs .

Man läßt den Impuls in x -Richtung auf die Substanz einwirken, dadurch präzidieren die magn. Kernspinmomente nicht mehr in statistischer Verteilung um die z -Achse, sondern werden „gebündelt“ (Phasenkohärenz) und die Energieniveaus sind gleich besetzt. Daraus resultiert ein Magnetisierungsvektor \vec{M} , dessen Komponente in z -Richtung 0 ist, der aber eine y -Komponente $M_y \neq 0$ hat. Diesen Effekt nennt man Quermagnetisierung. Durch Relaxation kehrt das Spinsystem in seinen Gleichgewichtszustand zurück.

Gemessen wird die zeitliche Abnahme der Quermagnetisierung (freier Induktionsabfall).

Durch Fourier-Transformation werden daraus die Resonanzfrequenzen und Intensitäten berechnet.

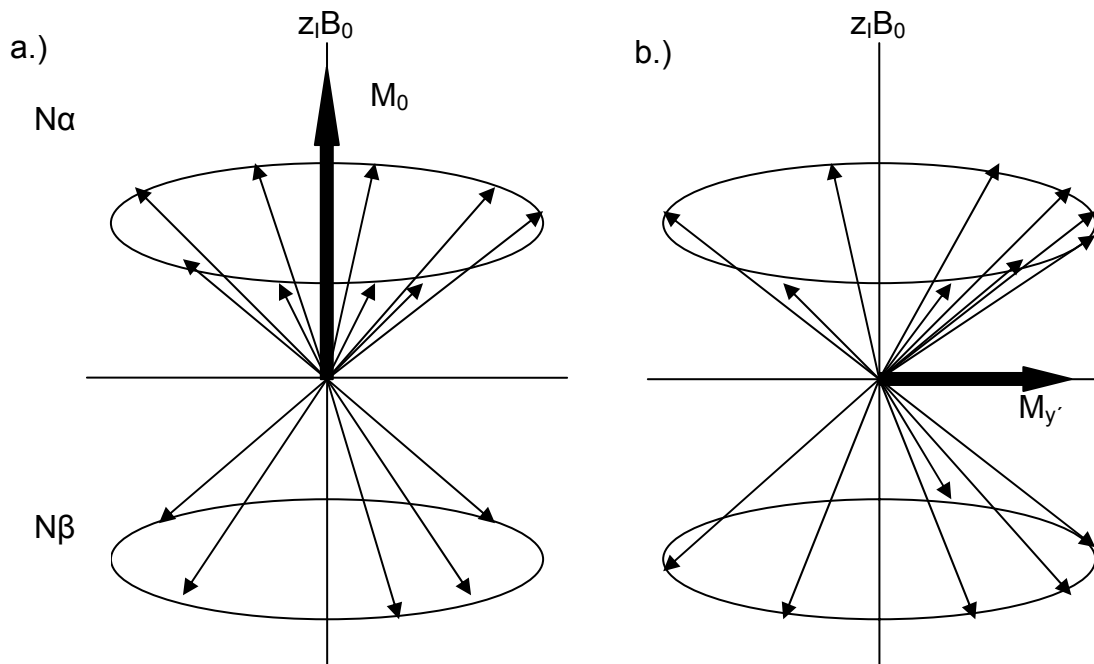


Abbildung 6: a.) Verteilung von N ($= N_\alpha + N_\beta$) Kernen auf den Doppelpräzessionskegel. Da $N_\alpha > N_\beta$, resultiert eine makroskopische Magnetisierung M_0 . b.) Anschauliches Bild der Phasenkohärenz: Nach einem 90°_x -Impuls präzidieren einige, aber nicht alle, Kerne gebündelt, in Phase, um die Feldrichtung z .

2.4.7.2. Relaxation

Die Relaxation erfolgt durch zwei Prozesse, die nach 1. Ordnung ablaufen, und kann durch zwei Relaxationszeiten T_1 und T_2 beschrieben werden. Betrachtet man die Vektoren in einem Koordinatensystem x', y' , das mit der Larmorfrequenz um die z -Achse rotiert, so erhält man die Geschwindigkeitsgesetze:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1},$$

$$\frac{dM_{x'}}{dt} = -\frac{M_{x'}}{T_2} \text{ und } \frac{dM_{y'}}{dt} = -\frac{M_{y'}}{T_2}$$

T_1 ist hierbei die Spin-Gitter- bzw. longitudinale Relaxationszeit, T_2 die Spin-Spin- oder transversale Relaxationszeit.

Die longitudinale Relaxation kommt dadurch zustande, daß das Spinsystem wieder seine Gleichgewichtsbesetzung der Energieniveaus einnimmt, d.h. das tieferliegende Energieniveau ist stärker besetzt → Es resultiert ein magn. Moment in z-Richtung.

Bei transversaler Relaxation wird die Phasenkohärenz der einzelnen Kernspinmomente wieder aufgehoben, das magn. Moment in y-Richtung $M_{y'}$ wird wieder 0, d.h. die Kernspinmomente präzidieren wieder in statistischer Verteilung um die z-Achse. Dieser Prozeß wird durch die Inhomogenität des Magnetfeldes induziert.

2.4.7.3. Spektren

Im Spektrum wird die Verschiebung δ gegen die Signalintensität aufgetragen. Die chemische Verschiebung berechnet man nach:

$$\delta = \frac{V_{\text{Substanz}} - V_{\text{Referenz}}}{V_{\text{Referenz}}} * 10^6 \quad \text{mit TMS als Referenzsubstanz}$$

Die Feinstruktur der Spektren entsteht durch die Kopplung der Kerne untereinander; jeder Kern mit einem Kernspin $\vec{I} \neq 0$ erzeugt ein eigenes Magnetfeld, daß das effektive Magnetfeld am Ort eines benachbarten Kerns beeinflusst. Dadurch ändert sich die Resonanzbedingung, das Signal spaltet auf, da die Kopplung das Magnetfeld verstärken oder schwächen kann.

2.4.8. Meßverfahren

2.4.8.1. CW-Spektrometer

Bei dem Continuous-Wave-Spektrometer gibt es zwei Arten der Messung:

Bei der ersten wird das Magnetfeld B_0 konstant gehalten und die eingestrahlte Frequenz ν_1 kontinuierlich verändert, bei der zweiten wird ν_1 konstant gehalten und B_0 variiert.

Magnetische Flußdichten bis zu 2,1 T werden durch Dauer- oder Elektromagneten erzeugt, höhere Flußdichten durch Kryomagnete.

2.4.8.2. PFT-Verfahren

Bei dem Pulse-Fourier-Transform-Verfahren werden durch einen Hochfrequenzimpuls gleichzeitig alle Kerne einer Sorte (z.B. alle ^1H -Kerne) angeregt. Der Impuls enthält ein kontinuierliches Frequenzband; die Impulslänge τ_P liegt in der Größenordnung von einigen μs .

Man läßt den Impuls in x-Richtung auf die Substanz einwirken, dadurch präzidieren die magn. Kernspinnomente nicht mehr in statistischer Verteilung um die z-Achse, sondern werden „gebündelt“ (Phasenkohärenz) und die Energieniveaus sind gleich besetzt. Daraus resultiert ein Magnetisierungsvektor \vec{M} , dessen Komponente in z-Richtung 0 ist, der aber eine y-Komponente $M_y \neq 0$ hat. Diesen Effekt nennt man Quermagnetisierung. Durch Relaxation kehrt das Spinsystem in seinen Gleichgewichtszustand zurück.

Gemessen wird die zeitliche Abnahme der Quermagnetisierung (freier Induktionsabfall).

Durch Fourier-Transformation werden daraus die Resonanzfrequenzen und Intensitäten berechnet.

^1H -NMR-Spektren: Varian XL 200 (200 MHz), Varian VXR 200 (200 MHz), Varian Unity 300 (300.1 MHz), Bruker AMX 300 (300.1 MHz), Varian INOVA 500 (499.8 MHz). Chemische Verschiebung δ in ppm relativ zu Tetramethylsilan als internem Standard. Kopplungskonstanten (J) in Hz. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, br = breit.

^{13}C -NMR-Spektren: Varian XL-200 (50.3 MHz), Varian VXR-200 (50.3 MHz), Varian Unity 300 (300.1 MHz) Bruker WM 300 (75.5 MHz), Varian INOVA 500 (125.7 MHz). Chemische Verschiebung δ in ppm relativ zu Tetramethylsilan als internem Standard.

Abkürzungen: APT (Attached Proton Test): CH/CH₃-Signale zeigen nach oben, C/CH₂-Signale zeigen nach unten.

Massenspektren: EI-MS mit Varian MAT 731 (70 eV), Varian 311A (70 eV), AMD-402 (70 eV); Hochauflösungen wurden mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz durchgeführt; DCI-MS mit Finnigan MAT 95 A, Reaktandgas: NH₃; ESI-MS mit Quattro Triple Quadrupole Mass Spectrometer, Finnigan TSQ 7000 mit nano-ESI-API-Ionenquelle.

2.4.9.ESR

2.4.9.1. Grundprinzip der ESR

Bei spektroskopischen Messungen werden Energiedifferenzen zwischen Atom- oder Molekülzuständen gemessen, um Stoffe zu identifizieren, zu quantifizieren oder Einsicht in deren Struktur zu bekommen. Die in der ESR untersuchten Energiedifferenzen stammen hauptsächlich von der Wechselwirkung ungepaarter Elektronen mit einem statischen Magnetfeld B_0 , welches von einem starken Elektromagneten oder einem supraleitenden Magneten erzeugt wird (typische Werte liegen zwischen $B_0=0.1$ T und $B_0=5$ T). Dieser Effekt wird Elektron-Zeeman Wechselwirkung genannt. Da ein Elektron ein magnetisches Moment μ besitzt, verhält es sich wie eine Kompassnadel in einem Magnetfeld. Dieses magnetische Moment ist quantisiert und kann somit nur diskrete Werte annehmen. Die Energiedifferenz zwischen den Levels ist proportional zu B_0 . Diese Energiedifferenz ist beim freien Elektron, welches wie der größte Teil der untersuchten Proben einen Spin $S = 1/2$ besitzt und somit zwei verschiedene Zustände annehmen kann, gegeben durch

$$\Delta E = h\nu = g_e\beta_e B_0$$

wobei $\beta_e = 9.27402e^{-24}$ JT⁻¹ und $g_e = 2.00232$ sind. Für reale Proben ist g ein Proportionalitätsfaktor, der häufig orientierungsabhängig (anisotrop) ist. Sein Wert hängt von der Elektronenkonfiguration des untersuchten Radikals oder Metallions ab. Eine der Hauptinformationsquellen in der ESR-Spektroskopie ist g . Die Wechselwirkung zwischen den ungepaarten Elektronen und den Kernspins wird als

Hyperfeinaufspaltung bezeichnet. Diese besteht aus einem isotropen Anteil, der Kontaktwechselwirkung, welche die Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines ungepaarten Elektrons am Kernort wiedergibt, sowie einem geringem anisotropen Anteil aufgrund der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen den magnetischen Momenten des Elektron- und des Kernspins. Die Hyperfeinaufspaltung ist die zweite wichtige Informationsquelle in ESR-Experimenten. Man erhält daraus Informationen über die Elektronendichte beim Kern, den Abstand und die Orientierung zwischen dem Kern und dem Ion mit dem ungepaarten Elektron, oder der Anzahl äquivalenter Kerne, welche mit dem Elektron gekoppelt sind. Weitere Wechselwirkungen, welche das ESR-Spektrum beeinflussen, sind die Nullfeldaufspaltung oder Feinstruktur-Wechselwirkung bei Proben mit $S > 1/2$, die Kern-Quadrupol-Wechselwirkung aufgrund des elektrischen Quadrupolmoments von Kernen mit $I > 1/2$, und die Kern-Zeeman Wechselwirkung.

2.4.9.2. Experimentelles Vorgehen

In einem typischen *continuous wave* (cw) ESR-Experiment wird die Probe mit einem Mikrowellenfeld mit konstanter Frequenz ν und Amplitude bestrahlt, und B_0 wird über die Resonanzlinie abgestimmt. Dies ist instrumentell einfacher zu realisieren als ν abzustimmen bei konstantem B_0 , da es für eine empfindliche Messung wichtig ist, einen Resonator mit hoher Güte Q (gewöhnlich bis $Q=10000$ in cw Experimenten) verwenden zu können. Da die Aufspaltung der Energieniveaus abhängig von B_0 ist, kann es bei gewissen Proben sinnvoll sein, Messungen bei verschiedenen Frequenzen aufzunehmen. Die verschiedenen Mikrowellenbereiche werden in sogenannte "Bänder" aufgeteilt. Die in der ESR-Spektroskopie wichtigsten Bänder sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Übersicht über die verschiedenen ESR-Bänder

Mikrowellenband	Frequenz (GHz)	B_0 (T)
L	1	0,036
S	3	0,11
X	9,5	0,36
Q	35	1,25
W	95	3,4

Um die Empfindlichkeit zu erhöhen, wird B_0 sinusoid moduliert mit einer Frequenz von typischerweise 100 kHz und einer Amplitude, welche deutlich unter der Breite der Resonanzlinie liegt. Nach der Demodulation erhält man aus diesem Grund nicht direkt das Absorptionssignal, sondern dessen erste Ableitung.

Die Spektren wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. A.C. Stückl und Herrn Prof. F. Meyer (Institut für anorganische Chemie, Göttingen) auf einem Elexsys X-Band ESR von Bruker aufgenommen.

3. Experimente und Ergebnisse

3.1. Untersuchung der α -Galaktosidase MelA aus *E. coli* K12

Das Gen für die α -Glukosidase MelA aus *E. coli* K12 wurde bereits früher (Nagao et al., 1988) kloniert und sequenziert. Dieses Enzym begründete eine neue Glycosidhydrolase-Familie, die GHF4. *E. coli* benötigt zusätzlich für den Melibioseumsatz einen Transporter MelB, der sehr stark temperatursensitiv ist (Tamai et al., 1988). Alle Mitglieder der GHF4 sind NAD^+ -abhängig und besitzen N-terminal gelegen eine hochkonservierte Sequenz Gly-Xxx-Gly-Ser (GXGS). Dieses Motiv hat gewisse Ähnlichkeit mit einem konservierten Sequenzmotiv des Rossmann-Fold, bestehend aus einer alternierenden Abfolge von β -Strängen und α -Helices ($\beta\alpha\beta\alpha$), die eine konservierte strukturelle Region für die Bindung eines Cofaktors in Proteinen darstellt. Im klassischen Rossmann-Fold Motiv ist eine glycinreiche Sequenz innerhalb des ersten β -Strangs wichtig (GXGXXG), die über eine Schleife den ersten β -Strang mit der folgenden α -Helix verbindet. Diese ist maßgeblich an der NAD^+ -Bindung beteiligt. MelA weist ohne NAD^+ nur eine sehr geringe Aktivität auf. Neben der Abhängigkeit von NAD^+ benötigt das Enzym für seine Funktion Mn^{2+} -Ionen und stark reduzierende Bedingungen durch Anwesenheit von DTT (Raasch et al., 2000). Die Funktionalität des oben genannten Motivs für die Bindung in einem GHF4-Enzym wurde über ortsspezifische Mutagenese nachgewiesen (Raasch et al., 2002).

Aufgrund seiner hohen Instabilität konnte MelA nicht charakterisiert werden. Im Rohextrakt konnte letztlich eine Teilcharakterisierung vorgenommen werden, bei der die ungewöhnliche Kombination der Cofaktoren Mn^{2+} , NAD^+ und Mercaptoethanol auffiel (Nagao et al., 1988). Damit begründete dieses Enzym eine neue Familie, die sich durch eine hohe Abhängigkeit von zweiwertigen Metallionen, meist Mn^{2+} , NAD^+ und einer Thiolkomponente auszeichnen. In einer vorangegangenen Arbeit (Raasch et al., 2001) wurde das Gen für die α -Glukosidase AgIA aus *T. maritima* kloniert und

charakterisiert. Auch AgIA zeigte eine hohe Instabilität, die sich aber auf einer Restaktivität stabilisierte. Bei der Kristallisation von AgIA fiel das Cys174 auf, welches eine hochkonservierte Aminosäure in dieser Enzymfamilie darstellt. Es liegt direkt im aktiven Zentrum und ist in AgIA doppelt oxidiert (Lodge et al., 2003).

3.1.1. Klonierung des MelA-Gens aus *E. coli* K12

Die Isolierung von MelA erfolgte aus der genomischen DNA von *E. coli* K12 mit Hilfe von Amplifikation durch PCR. Die verwendeten Primer waren 27 bzw. 33 bp lang und enthielten für die Klonierung geeignete Restriktionsschnittstelle

Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 6')	Schnittstelle
MelA_forward	GGG <u>GGA TCC</u> ATG ATG TCT GCA CCC AAA ATT ACA	<i>Bam</i> HI
MelA_reverse	GGG <u>AAG CTT</u> TTA ACG GTG CAA CCA GCC	<i>Hind</i> III

Substanz	Volumen [µl]
<i>Pfu</i> -Polymerase-Puffer (10-fach)	5,0
dNTP-Mix (10 mM)	2,0
Template-DNA	2,0
Primer „MelA forward“ *	0,5
Primer „MelA reverse“ *	0,5
<i>Pfu</i> -Polymerase	1,0
DMSO	5,0
H ₂ O _{bide} st	34,0
Gesamtvolumen	50,0

Tabelle 12: PCR-Bedingungen

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Reaktion	
1	95,0	10:00	Denaturierung	} 34x
2	95,0	1:00	Denaturierung	
3	40,0-50,0 Gradient	0:45	Primer-Annealing	
4	72,0	2:00	Primer-Verlängerung	
5	72,0	10:00	End-Verlängerung	
6	8,0	∞	Kühlen	

Der PCR-Ansatz wurde bei den angegebenen Bedingungen inkubiert und anschließend wurde das 1,4 kb PCR-Produkt nach der elektrophoretischen Auftrennung aus dem Agarose-Gel extrahiert. Der pDrive Cloning Vektor ist Teil eines Qiagen PCR Cloning Kits, welches einen linearisierten Klonierungsvektor enthält, der an seinen Enden einen einzelsträngigen U-Überhang trägt. Durch diese „sticky ends“ wird eine hochspezifische Hybridisierung mit A-Überhang tragenden PCR-Fragmenten gewährleistet. A-Überhänge werden durch Amplifikation mit *Taq*-Polymerase und anderen DNA-Polymerasen ohne Korrekturleseaktivität erhalten, nicht jedoch durch Amplifikation mit der hier verwendeten *Pfu*-Polymerase, die Korrekturleseaktivität aufweist. Aus diesem Grund wurde an das unter amplifizierte 1,4 kb große *MelA*-DNA Fragment ein A-Überhang angefügt, der die Ligation mit dem pDrive Cloning Vektor ermöglichte.

Dieses wurde nun mit dem pDrive-Vektor ligiert und in *E. coli* XL1blue transformiert. Nach Kolonie-PCR mit den in Tabelle 13 aufgeführten Primern (Bedingungen siehe Tabelle 12) wurde ein Klon mit korrekt inseriertem PCR-Fragment ausgewählt und unter Verwendung der neu eingefügten Schnittstellen *Bam*HI/ *Hind*III in den Vektor pQE30 kloniert (Abbildung 7). Dieses neue Konstrukt wurde nun zur heterologen Expression in den Stamm *E. coli* M15 elektroporiert.

Tabelle 13: Primer für die Kolonie-PCR

Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 6')
M13forward	GTAAAACGACGGCCAGT
M13reverse	GTTTTCCCAGTCACGAC

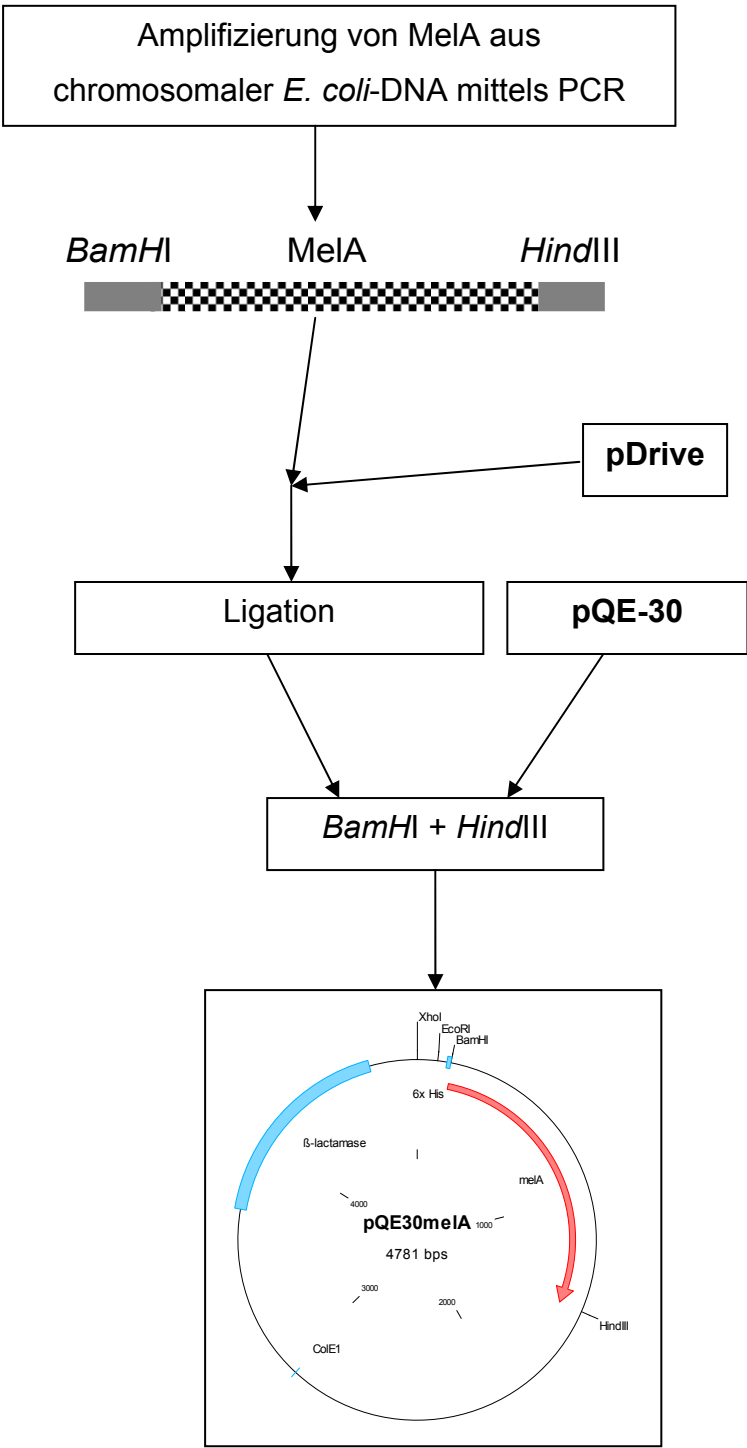


Abbildung 7: Klonierungsstrategie

3.2. Anzucht und Aufreinigung

Für eine Charakterisierung wurde MelA im präparativen Maßstab gewonnen. Hierfür wurden 1,5 l LB_{Amp} mit 30 ml Inokulum angeimpft und bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 mit 0,5 mM (Endkonzentration) IPTG induziert. Danach wurde über Nacht unter kräftiger Belüftung bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 7000 Upm in GS3-Bechern geerntet, in LEW-Puffer des Protino[®] Ni 2000 Kit von Machery-Nagel aufgenommen und mittels einer French Pressure Cell aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde zur Reinigung der mit einem His₆-tag versehenen MelA-Proteins gemäß Protokoll der Firma Machery-Nagel weiter aufgearbeitet.

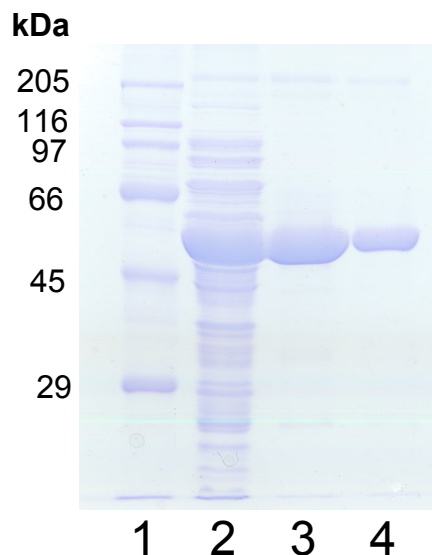


Abbildung 8: SDS-PAGE-Analyse der Reinigungsschritte von MelA (Spur 1: Marker, Spur 2: Rohextrakt, Spur 3: Waschfraktion, Spur 4: MelA)

Das Enzym zeigte in reiner Form eine stark schwankende Anfangsaktivität. Trotz identischer Aufreinigungsbedingungen ließ sich keine reproduzierbare Aktivitätsbestimmung durchführen. Weitere Versuche, die Bedingungen zu optimieren scheiterten zunächst. Bei all diesen Versuchen war die Stammlösung des Substrats (para-Nitrophenyl- α -D-galaktopyranosid) standardmäßig in DMSO gelöst. Nachdem dieses Lösungsmittel durch Wasser ersetzt wurde, ließen sich stabile Anfangsaktivitäten ermitteln. Trotzdem verlor das Enzym innerhalb weniger Stunden seine Aktivität. Eine Charakterisierung war unter diesen Bedingungen noch nicht

möglich. Thompson et al., beschrieb 1999, daß sich der Aktivitätsverlust eines anderen GHF4-Enzyms, GlvA von *B. subtilis*, durch Zugabe der entsprechenden Cofaktoren deutlich herauszögern ließ. Daraufhin wurden verschiedene Kombinationen der Cofaktoren in 1 mM Endkonzentration zugegeben und der Aktivitätsverlust über eine längere Zeit verfolgt (Abbildung 9). Bei Zugabe von NAD^+ und Mn^{2+} konnte die Aktivität über zwei Wochen fast zu 80% konserviert werden.

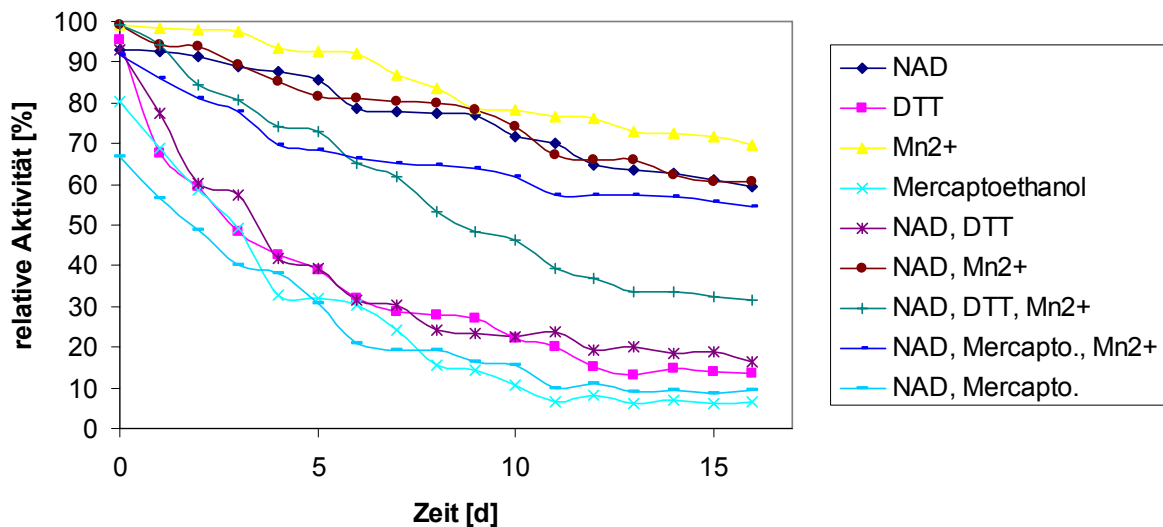


Abbildung 9: Lagerungsbedingungen

Schon die alleinige Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen reicht aus, um die Aktivität über fast eine Woche praktisch unverändert zu erhalten (Abbildung 9). Damit war eine genaue Charakterisierung möglich.

3.3. Charakterisierung der rekombinanten α -Galaktosidase MeIA

3.3.1. Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad der α -Galaktosidase MeIA aus *E. coli*

Der Oligomerisierungsgrad wurde über Gelfiltration ermittelt. Hierfür diente eine Superose-6-Gelfiltrationssäule der Firma Pharmacia.

Parameter des Superose 6 Säulenlaufs

Medium:	Superose 6
Säule:	10/300 GL
Säulenvolumen:	23,56 ml
Probe:	1000 μ g
Puffer A:	50 mM HEPES, pH= 7
Flussrate:	0,5 ml/min
Equilibrierung:	2 SV Puffer A
Lauf:	100 % Puffer A (1,5 SV)

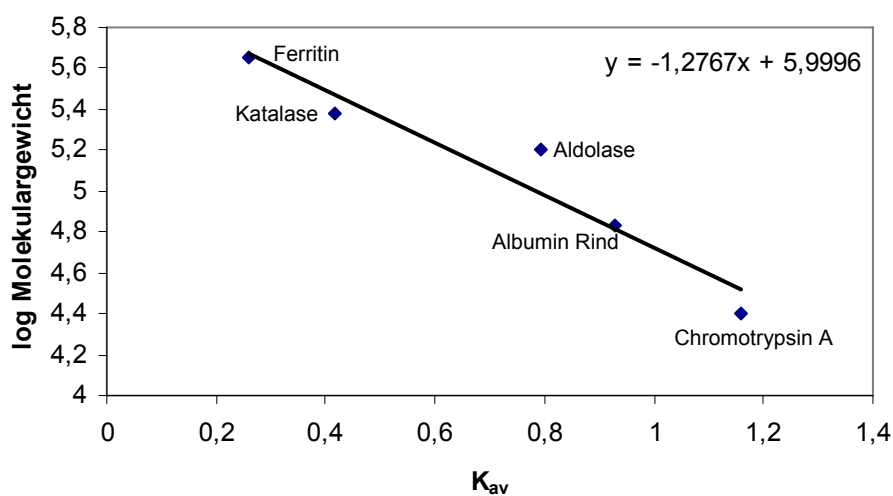


Abbildung 10: Eichgerade zur Superose 6 17/300 GL Säule

$$\text{Es gilt: } K_{av} = \frac{(v_e - v_0)}{(v_t - v_0)} \text{ mit } v_0 = 7,77 \text{ ml und } v_t = 23,56 \text{ ml}$$

Für MeIA wurde ein Elutionsvolumen von 13,61 ml ermittelt. Mit der aus der Regressionsgeraden abgeleiteten Formel

$$\log MW [\text{kDa}] = -1,2767 \cdot K_{av} + 5,9996$$

errechnete sich für das native Enzym eine Molekularmasse von 336 kDa. Das entspricht etwa der sechsfachen Masse der aus dem SDS-Gel abgeleiteten Größe von 50 kDa. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die α -Galaktosidase als Hexamer vorliegt. Aus Vorversuchen war bekannt, daß das Enzym seine Aktivität schnell verlor. Forcierte man diesen Aktivitätsverlust durch eine erhöhte Lagerungstemperatur ohne Cofaktoren, ergab sich ein neues Bild bei der Gelfiltration. Der Hauptpeak bei 13,61 ml wurde etwas kleiner, und ein neuer Peak bei 22,95 ml tauchte zusätzlich auf. Dieser entspricht einer Molekularmasse von ca. 59 kDa. Da dieser Lauf aus derselben Fraktion stammte, wie der erste, kann man davon ausgehen, daß durch die Alterung und bereits deutlich messbare Inaktivierung, sich der Oligomerisierungsgrad des Enzyms geändert hat. Es scheint sich im inaktiven Zustand als Monomer darzustellen.

3.3.2.Substratspektrum

Ein sehr breit angelegtes Screening mit verschiedenen α -, β -Substraten und zudem mit unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad zeigte, daß MelA im Gegensatz zu AgIA aus *T. maritima* (Raasch et al. 2001), nur α -galaktosidische Bindungen spalten kann (2.4.3.4).

Substrate	MelA
Polymere	
β -Dextran, Glycogen, Dextran, Amylopectin Stärke	-
Maltooligosaccharide	
Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose, Maltoheptaose	-
Cyclodextrine	
γ -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin, α -Cyclodextrin	-
Disaccharide	
Maltose	-
Raffinose	-
Saccharose	-
Cellulose	-
Melibiose	+
Lactose	-
Synthetische Substrate	
pNP- α -D-Glukose	-
pNP- β -D-Glukose	-
pNP- α -D-Galaktose	+
pNP- β -D-Galaktose	-

3.3.3. Enzymkinetik

Für die Ermittlung der kinetischen Daten der α -Galaktosidase MeIA wurde die Aktivität des Enzyms mit steigender Konzentration an para-Nitrophenyl- α -D-galaktopyranosid (pNP- α -Gal) bestimmt (2.4.2.9) (Abbildung 11). In den folgenden Abbildungen finden sich die entsprechenden Michaelis-Menten-, Lineweaver-Burke- und Eadie-Hofstee-Auftragungen zur Berechnung von K_m und v_{max} .

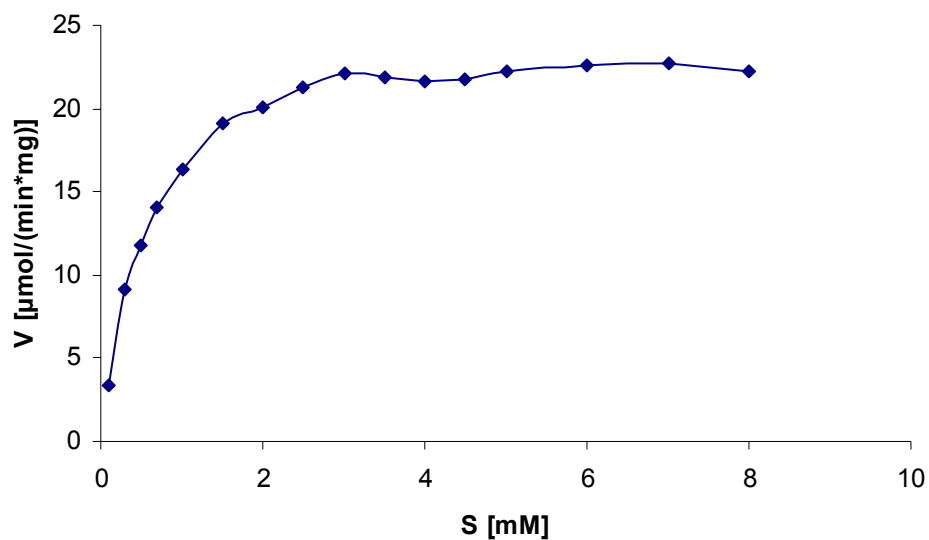


Abbildung 11: Abhängigkeit der Aktivität von MeIA von der pNP- α -Gal-Konzentration (Michaelis-Menten-Diagramm).

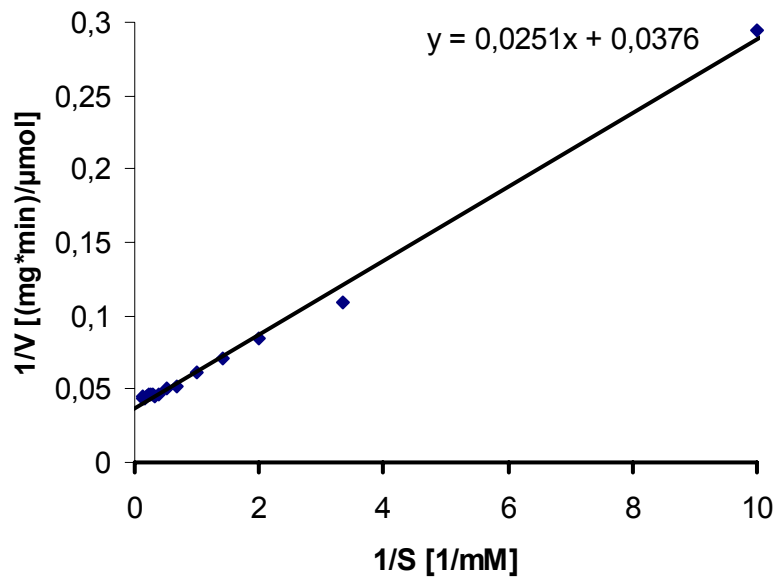


Abbildung 12: Darstellung der Daten aus Abbildung 11 als Lineweaver-Burke-Diagramm

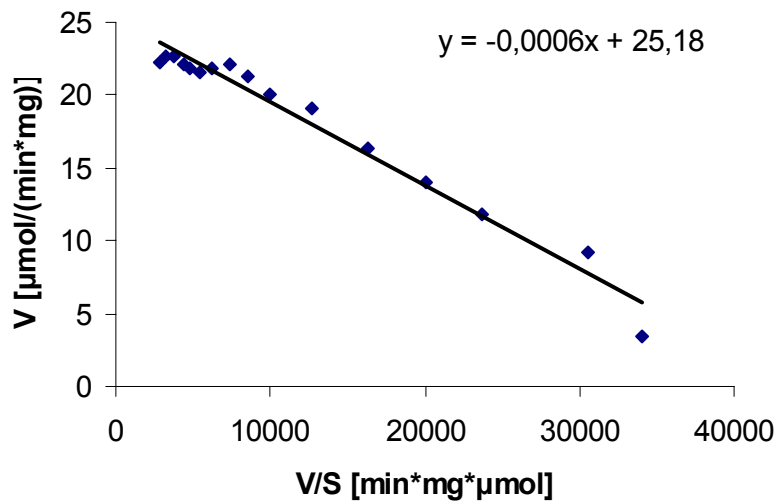


Abbildung 13: Darstellung der Daten aus Abbildung 11 als Eadie-Hofstee-Diagramm

Für die Aktivität an pNP- α -Gal ergeben sich aus dem Lineweaver-Burke- und Eadie-Hofstee-Diagramm ergeben sich die in Tabelle 14 dargestellten Werte für K_m und V_{max} :

Tabelle 14: Kinetische Parameter der pNP- α -Gal-Hydrolyse durch MeIA.

	Lineweaver-Burke	Eadie-Hofstee
K_m	0,04 mM	0,02 mM
V_{max}	25,1 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$	25,2 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$

3.3.4. Bestimmung des pH-Optimums

Hierfür wurde die Aktivität der α -Galaktosidase mit pNP- α -Gal bei 37°C in einem pH-Bereich zwischen 5,5 und 10 bestimmt. Es wurden folgende Puffer für die verschiedenen pH-Bereiche verwendet: Natriumsuccinat (pH 5.5-7.0), HEPES (pH 7.0-8.5), 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonsäure (CAPS; pH 9.0-10).

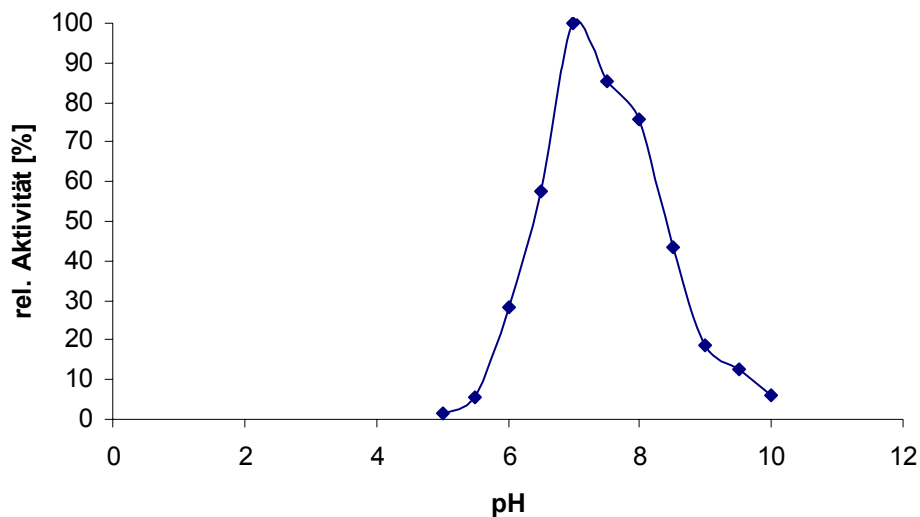


Abbildung 14: Bestimmung des pH-Optimums der α -Galaktosidase

Es zeigte sich ein Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von 7, wobei alle Meßpunkte prozentual in Relation zur höchsten Aktivität gesetzt wurden.

3.3.5. Bestimmung des „Temperaturoptimums“

Analog zur Messung der optimalen Aktivität, in Abhängigkeit von der H^+ -Ionenkonzentration, wurde in diesem Fall der Temperaturbereich gesucht, in dem das Enzym seine größte Aktivität an pNP- α -Gal entfaltet (2.4.3.2).

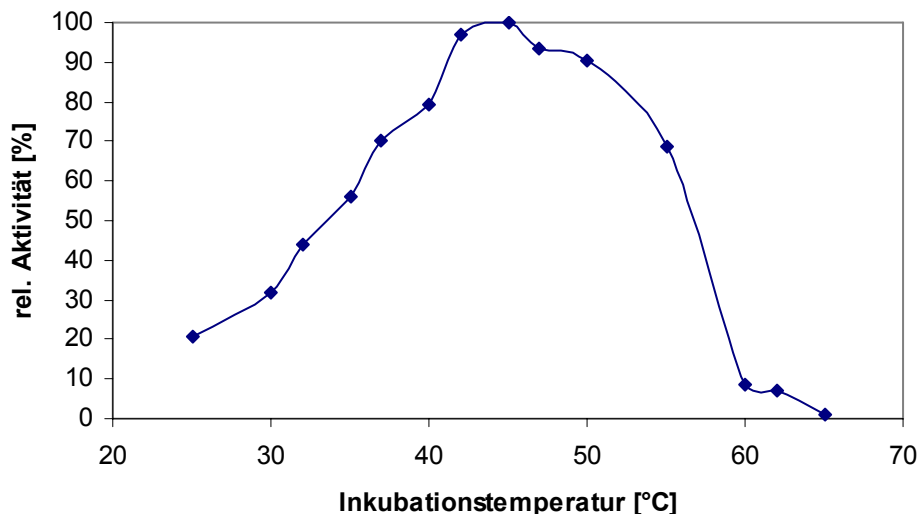


Abbildung 15: Bestimmung des „Temperaturoptimums“ der α -Galaktosidase MeIA in 100 mM HEPES pH 7.

Die höchste Aktivität der α -Galaktosidase wurden bei 42°C und pH 7 ermittelt. Alle nachfolgenden Tests wurden dann bei 37°C und pH 7 durchgeführt. Eine Inkubationstemperatur von 5°C unter dem Temperaturoptimum sollte verhindern, daß das Enzym während der Aktivitätsbestimmung zu stark inaktiviert wurde und somit die Messungen verfälschte.

3.3.6. Bestimmung der Thermostabilität

Es wurde wie unter 2.4.2.9 beschrieben vorgegangen. Die Ansätze wurden bei den entsprechenden Temperaturen vorinkubiert. Dabei wurden jeweils 10 µg Enzym pro Messung eingesetzt. Die Vorinkubation erfolgte bei 37, 42, 45, 50 und 60°C. Das Ergebnis der thermischen Inaktivierung ist in Abbildung 16 dargestellt.

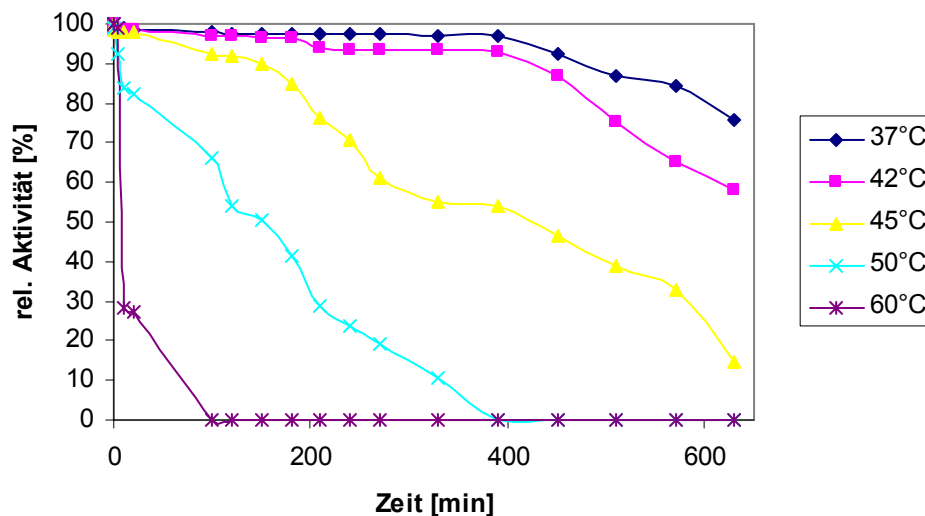


Abbildung 16: Temperaturinaktivierung

Wie aus Abbildung 16 hervorgeht, wurde die Aktivität nach über acht Stunden bei 37°C nicht beeinträchtigt. Bei Temperaturen über 45°C tritt jedoch nach drei Stunden ein zügiger Aktivitätsverlust ein.

3.3.7. Abhängigkeit der α -Galaktosidase von Cofaktoren

Wie schon aus der GHF4 bekannt ist, benötigt MelA für seine Aktivität verschiedene Cofaktoren. Nagao et al. (1988) haben bereits eine erste Charakterisierung von MelA im Rohextrakt vorgenommen. Für das gereinigte MelA wurden nun folgende optimale Endkonzentrationen der Cofaktoren ermittelt:

NAD ⁺	0,6 mM
DTT	0,25 M
Mn ²⁺	0,15 mM
HEPES pH 7 ^{37°C}	0,1 M

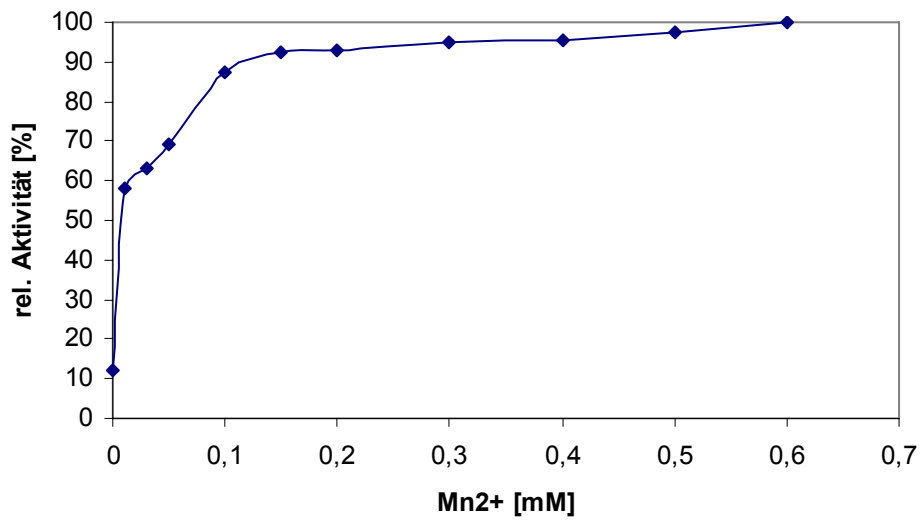
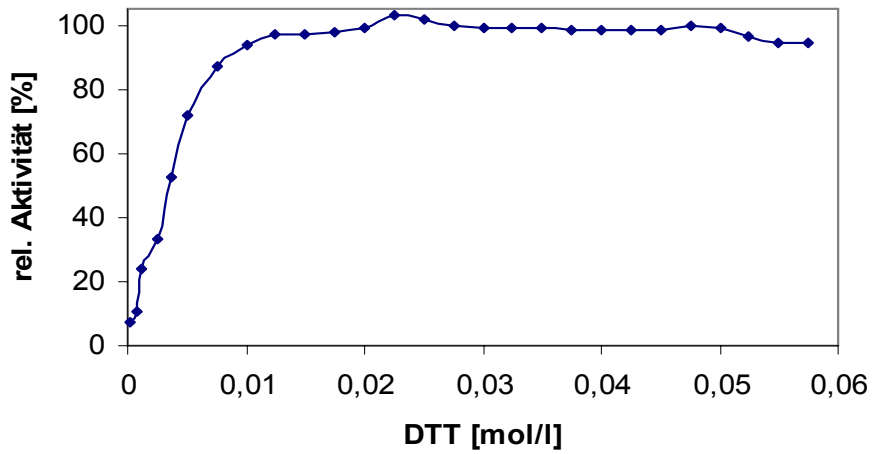
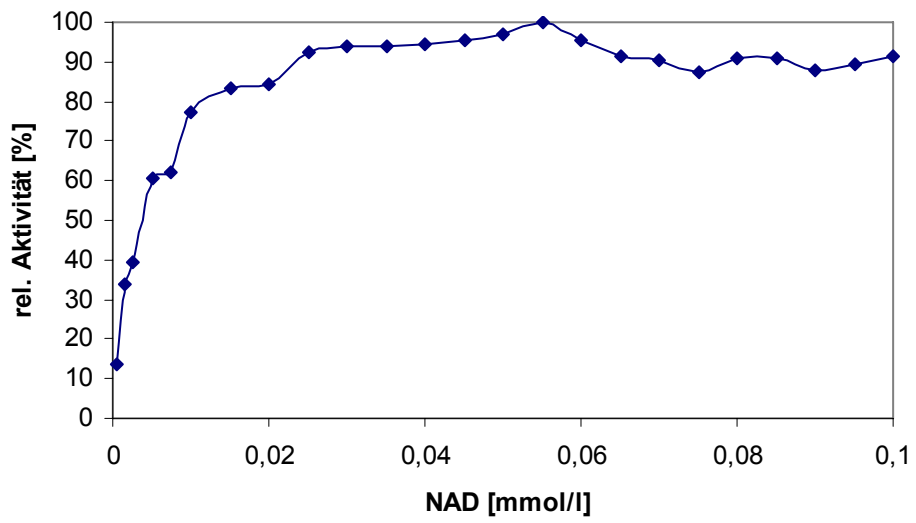


Abbildung 17: Zusammenfassung der Cofaktoren

Erstaunlicherweise ist MeIA nur durch Mn^{2+} -Ionen zu aktivieren. Alle getesteten zweiwertigen Ionen (Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} und Fe^{2+}) konnten das Enzym nicht aktivieren.

DTT brachte eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber Mercaptoethanol. Im folgenden Diagramm (Abbildung 18) sind beide Reduktionsmittel im Vergleich zusammengestellt.

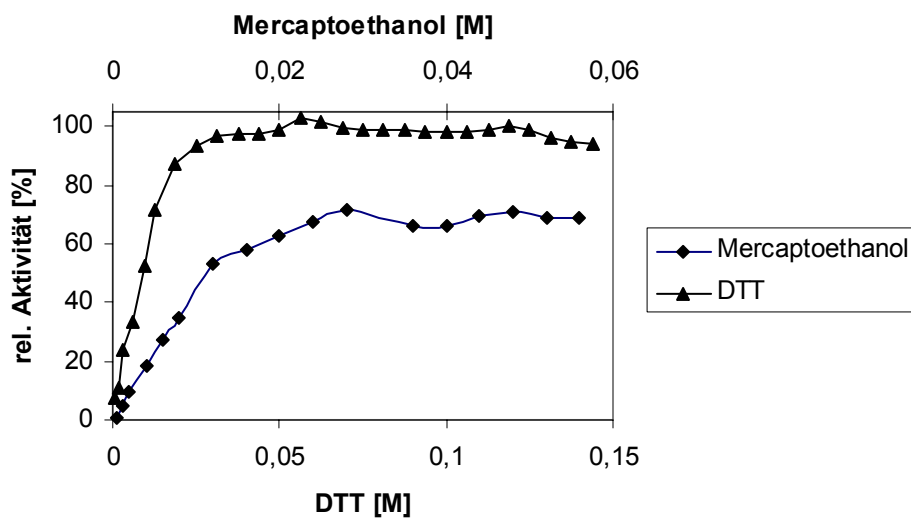


Abbildung 18: Gegenüberstellung von DTT und Mercaptoethanol

3.3.8. Untersuchung zum zeitlichen Verlauf der Substrathydrolyse

Im Gegensatz zu AgIA aus *T. maritima* vermag MelA seine Substrate (0,04 %) praktisch vollständig abzubauen. Stellvertretend für die Substrate ist in der folgenden DC der Abbau von Melibiose dargestellt. Es wurden im Abstand von 5 min Proben entnommen und sofort bei -20°C gelagert, um einen weiteren Umsatz durch das Enzym zu stoppen.

Der Inkubationsansatz enthielt folgende Komponenten:

Mn^{2+} (6 mM)	50 μl
NAD^{+} (1,5 mM)	50 μl
DTT (0,25 M)	50 μl
HEPES (0,1 M)	100 μl
Melibiose 2%	10 μl
Enzym (5 mg/ml)	10 μl
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	220 μl

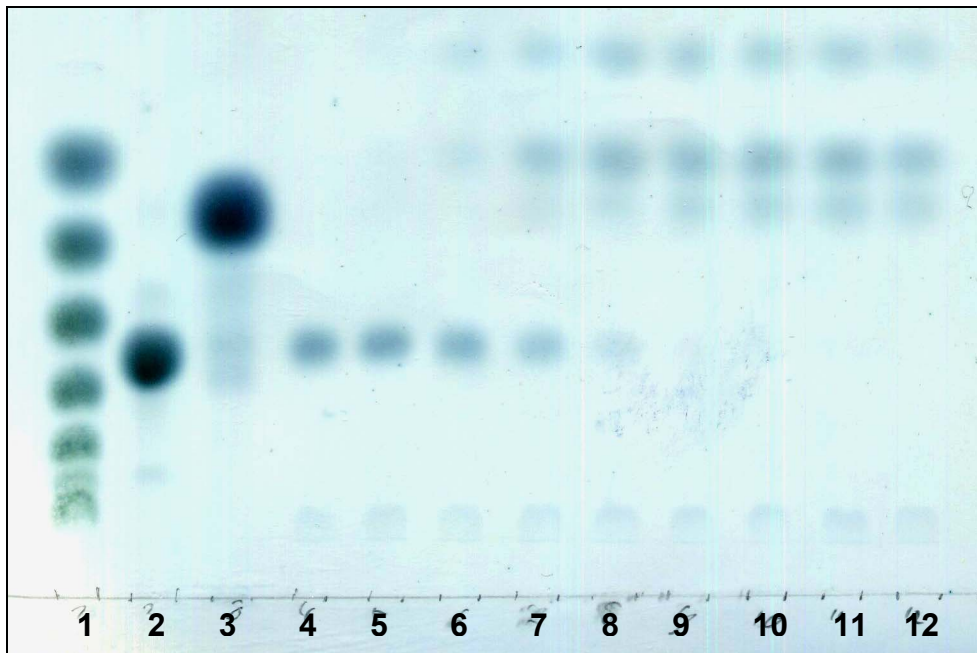


Abbildung 19: Dünnschichtchromatographie über den Abbau von Melibiose. Spur 1: Marker G1-G7; Spur 2: Melibiose; Spur 3: Galaktose; Spuren 4-12: 5-min-Aliquots

Die Enzymmenge betrug 5 µg pro 500 µl. Als Laufmittel diente 1-Propanol, Essigester und H₂O_{bidest} im Verhältnis 70:10:20. Es wurden je Ansatz 2 µl aufgetragen und mit folgendem Sprühreagenz entwickelt (10 min, 140°C):

Sprühreagenz:

Anilin	1 ml
Diphenylamin	1 g
Aceton	100 ml
Lagerung lichtgeschützt bei 4°C	

Kurz vor dem Auftragen auf die DC wurden 1/10 Vol. Phosphorsäure zugegeben.

3.3.9. Spektroskopische Untersuchungen mittels NMR

Da nicht geklärt war, ob die Enzyme der GHF4 die Spaltung der Kohlenhydrate unter Inversion oder Retention am anomeren Zentrum durchführten, wurde versucht, durch ¹H-NMR den Verlauf der Reaktion bei MeIA zu dokumentieren. Die Messungen wurden auf einem Varian Unity 300 (300.1 MHz) durchgeführt. Als Substrat für die Reaktion diente pNP-α-Gal. Alle Cofaktoren wurden in D₂O gelöst und in optimalen Konzentrationen für den Umsatz eingesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 600 µl. Lediglich die Endkonzentration von Mn²⁺-Ionen wurde auf 1/10 der optimalen Konzentration reduziert, um eine zu starke Signalverbreiterung zu verhindern, aber trotzdem noch eine meßbare Aktivität zu erhalten.

Ansatz:	Enzym	10 mg/ml	10 µl
	NAD ⁺	5 mM	60 µl
	MnCl ₂	0,015 mM	60 µl
	DTT	0,25 M	60 µl
	HEPES	0,1 M	60 µl
	pNP-α-Gal	0,1 M	10 µl
	D ₂ O		360 µl

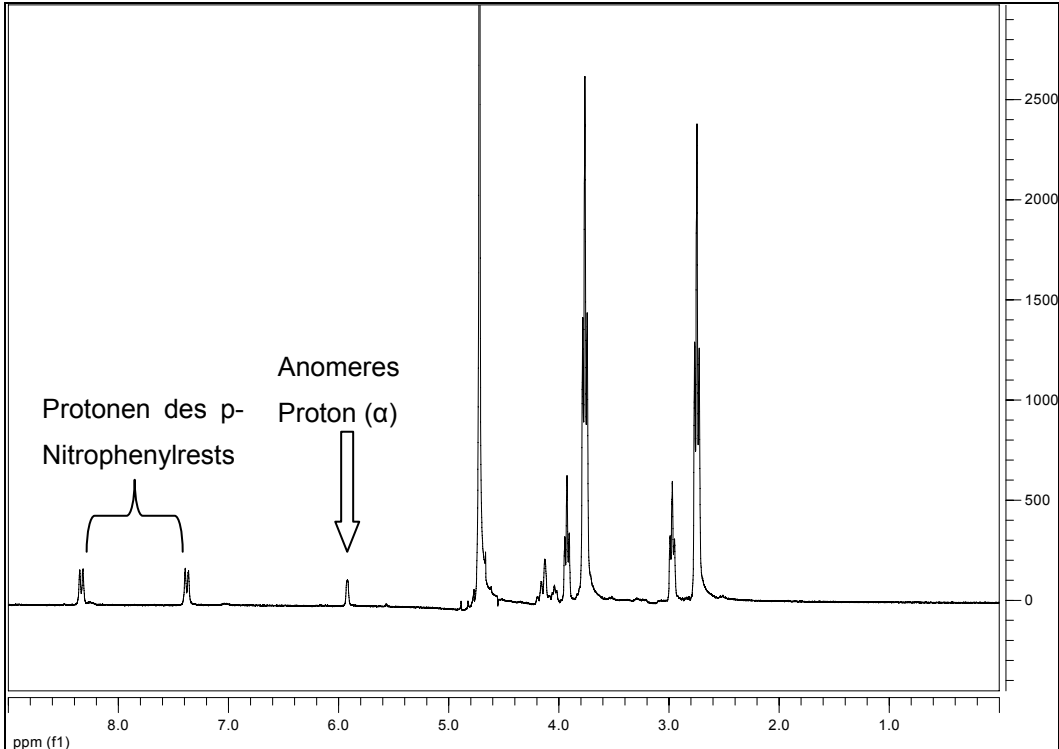


Abbildung 20: ¹H-NMR (D₂O, 300 MHz) von pNP-α-Gal

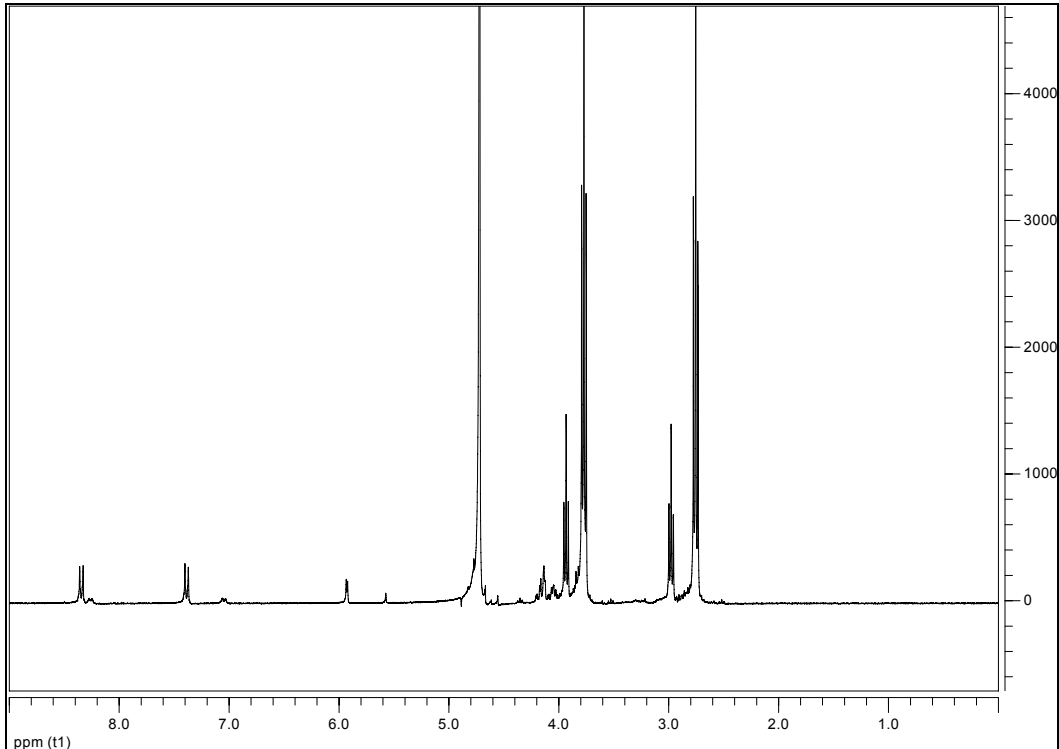


Abbildung 21: ¹H-NMR (D₂O, 300 MHz) von pNP-α-Gal und Enzym vor Inkubation

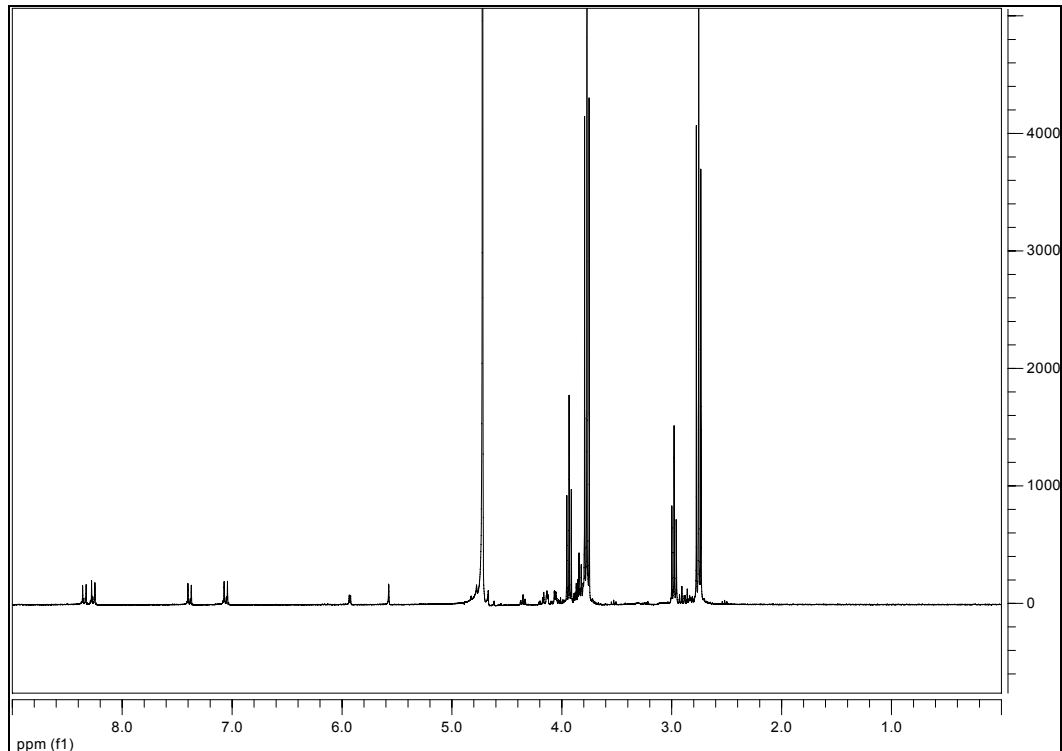


Abbildung 22: $^1\text{H-NMR}$ (D_2O , 300 MHz) von pNP- α -Gal und Enzym nach 15 min Inkubation bei 37°C

Es ist zu sehen, daß sich im Tieffeld zusätzliche Signale bilden. Die Signale bei 7,1 ppm und 8,3 ppm gehören zu den Protonen des gebildeten p-Nitrophenols. Zusätzlich taucht ein Signal bei 5,6 ppm auf, welches sich der gebildeten α -Glukose zuordnen läßt. Das Signal der β -Glukose ist leider nicht eindeutig auszuschließen, da es unter dem Wassersignal bei 4,8 ppm liegen könnte und damit verdeckt würde. Das Enzym wurde noch längere Zeit weiter inkubiert, um einen vollständigen Umsatz zu verfolgen. Durch die Versuchsbedingungen schien das Enzym nach 15 min inaktiviert worden zu sein, da kein weiterer Umsatz mehr zu verzeichnen war, was daran zu erkennen ist, daß das Signal bei 5,9 ppm, das zum Substrat gehört (Abbildung 20), nicht vollständig verschwindet. Da aber nur suboptimale Mengen an Mn^{2+} -Ionen zugesetzt werden konnten, war ein vollständiger Umsatz trotz mehrerer Versuche nicht möglich. Höhere Mn^{2+} -Ionenkonzentrationen führten zu starker Signalverbreiterung, so daß beide anomere H-Atome unter dem Wassersignal verschwinden würden.

Mit diesen Versuchen konnte leider nicht endgültig geklärt werden, ob nicht auch das β -Anomer bei dem enzymatischen Umsatz gebildet wurde, da es aufgrund seiner chemischen Verschiebung unter dem H_2O -Signal liegen kann. Da aber die Signale

der gebildeten α -Galaktose proportional zur Abschwächung des α -pNP-Galaktosesubstrats angewachsen sind, steht zu vermuten, daß die β -Galaktose nicht gebildet wurde.

3.4. Kristallisation von MelA

Da bei der Kristallisation von AgIA aus *T. maritima* ein doppelt oxidiertes Cys174 im aktiven Zentrum gefunden wurde (Lodge et al., 2003), sollte die Oxidationsstufe des Cys172 im aktiven Zentrum von MelA auf demselben Weg geklärt werden. Hierbei wurde mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dr. M. Rudolph versucht, das Enzym zu kristallisieren. Hierbei wurde die „sitting drop“-Methode angewandt.

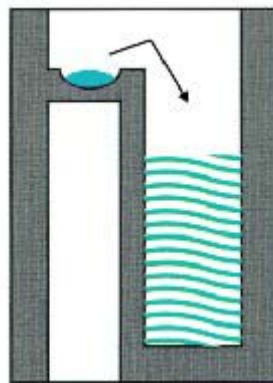


Abbildung 23: „Vapor Diffusion“-Kristallisation, Sitting-Drop-Verfahren (Abbildung aus McPherson 1999)

Folgende Screenings der Firma Hampton Research Corp. wurden hierfür durchgeführt:

Crystal Screen I, II
Magic Screen I-IV
Footprint I, II, III
Crystal Structure

Hierbei handelt es sich um ein Standardscreening, in dem die ungefähren Kristallisationsbedingungen auf ein engeres Spektrum eingrenzen lassen. Für die Kristallisation wurden 1 ml des jeweiligen Kristallisationsansatzes im Reservoir vorgelegt und dann mit 1 μ l Enzym (8 mg/ml) und 1 μ l der Reservoirlösung vermischt. Anschließend wurden die mit Crystal-Clear versiegelten Platten zur Lagerung in einen 18°C-Kristallisationsschrank gegeben.

Beispielhaft für die verschiedenen Screenings ist hier nur der Crystal Screen dargestellt.

Unter folgenden Bedingungen wurden Vorstufen von Kristallen gefunden:

Magic Screen Tube 3 (5% i-Propanol, 0,1 M Na-Cacodylat pH 6,5, 0,2 M Zn-Acetat)

Crystal Screen Tube 2 (0,4 M Na,K-Tartrat), Tube 21 (18% PEG 8000, 0,1 M Na-Cacodylat pH 6,5, 0,2 M Ca-Acetat)

Structure Screen Tube 34 (15% PEG 4000, 1% MPD, pH 7,5), Tube 66 (15% PEG 8000, 0,40% i-Propanol, pH 6,5)

Footprint Tube 2 (18% PEG 600, 0,1 M HEPES pH 7,5), Tube 8 (27% PEG 600 0,1 M HEPES pH 7,5), Tube 14 (36% PEG 600, 0,1 M HEPES pH 7,5)

Die Nummern stehen jeweils für die Nummer des Kristallisationsansatzes des jeweiligen Screening Kits.

Die jeweiligen Bedingungen wurden nun weiter verfeinert. Die einzelnen Ansätze können dem Anhang entnommen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten jedoch keine meßbaren Kristalle erhalten werden. Versuche zur Kristallisation unter den Bedingungen unter denen AgIA aus *T. maritima* Kristalle bildete, stehen noch aus.

3.5. Untersuchung von *T. Maritima* AgIA

3.5.1. Identifizierung von „Spot X“

Die α -Glukosidase AgIA aus *T. maritima* wurde im Rahmen der Dissertation von C. Raasch (2001) charakterisiert. Bei der Aufreinigung von Reaktionsprodukten DC war ein ungewöhnlicher Zusatzspot aufgefallen, der kurz über dem Glukosespot lief. Es stand zu vermuten, daß es sich hierbei um ein Zwischenprodukt des bis dato unbekanntes Reaktionsmechanismus handelt. Zunächst wurde versucht, diesen Spot im größeren Maßstab darzustellen, um ihn anschließend aufzureinigen und seine chemische Natur aufzuklären.

Parallel dazu wurden Nebenanfärbungen durch Cofaktoren ausgeschlossen und weiter untersucht, ob dieser Spot auch mit anderen Kohlenhydraten auftrat.

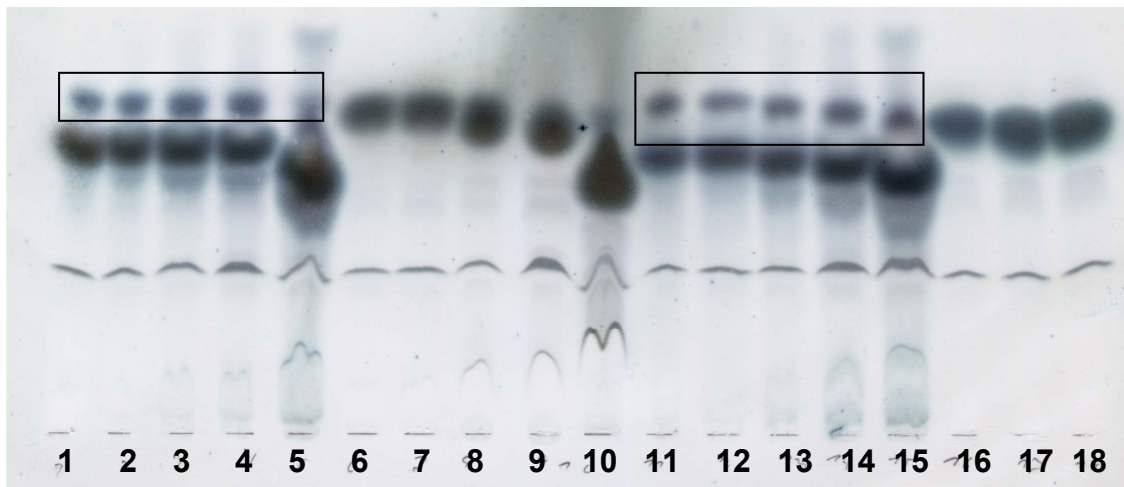


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der Spotbildung (Spot im Kasten) bei verschiedenen Substraten. Spur 1-5: Substrat Glukose, Proben im einstündigen Abstand, Spur 6-10: Substrat Xylose, Proben im einstündigen Abstand; Spur 11-15: Substrat Galaktose, Proben im einstündigen Abstand, Spur 16-18: Substrat Sorbose

Bei den Untersuchungen ließ sich der Spot nur mit den Substraten bzw. Glykon-Produkten von AgIA beobachten.

Um Nebenanfärbungen auszuschließen, wurden die Komponenten des Reaktionsansatzes einzeln und in Kombination aufgetragen. Für den Vollansatz wurde folgender Ansatz verwendet:

Enzym	(7 mg/ml)	10 μ l
H ₂ O		6 μ l
Tris-HCl	(0,5 M pH 7 ^{60°C})	4 μ l
MnCl ₂	(10 mM)	4 μ l
NAD ⁺	(9 mM)	4 μ l
DTT	(1 M)	2 μ l
Glukose	2%	10 μ l

Dieser Ansatz wurde bei 60°C für 4 h inkubiert und anschließend auf die DC aufgetragen.

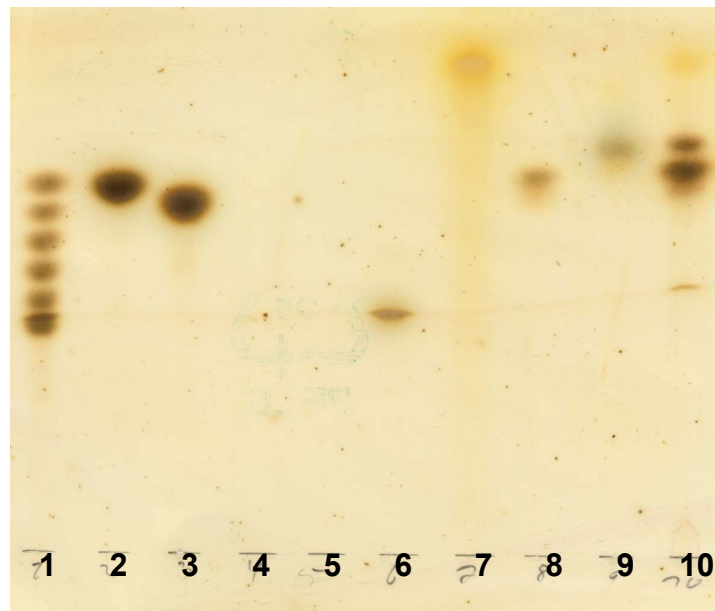


Abbildung 25: Nebenanfärbungen, Sprühreagenz: Dinitrophenylhydrazin / konz. H₂SO₄ / EtOH, Spur 1: Marker G1-G7, Spur 2: Glukose, Spur 3: Galaktose, Spur 4: Tris, Spur 5: MnCl₂, Spur 6: NAD⁺, Spur 7: DTT, Spur 8: 2-Ketoglukose, Spur 9: 2-Ketogalaktose, Spur 10: Vollansatz

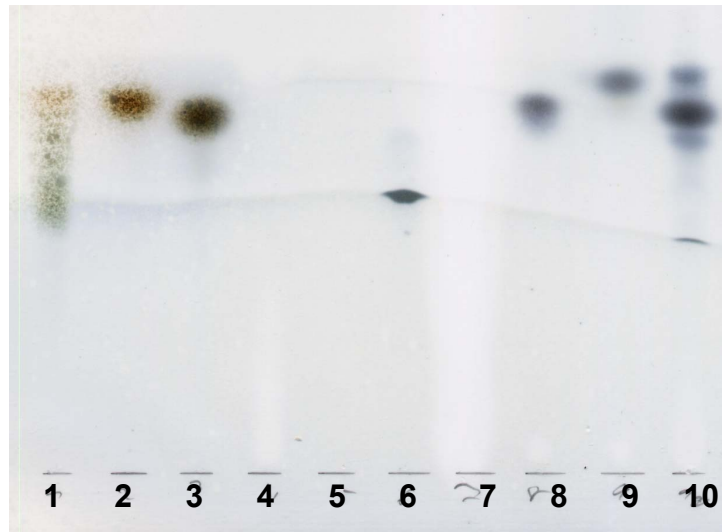


Abbildung 26: Lauf- und Anfärbeverhalten von Reaktionsansätzen und möglichen (Zwischen-) Produkten, Sprühaengenz: Anilin / Diphenylamin / Aceton / H_3PO_4 , Spur 1: Marker G1-G7, Spur 2: Glukose, Spur 3: Galaktose, Spur 4: Tris, Spur 5: MnCl_2 , Spur 6: NAD^+ , Spur 7: DTT, Spur 8: 2-Ketoglukose, Spur 9: 2-Ketogalaktose, Spur 10: Vollansatz

Folgende Sprühreagenzien wurden eingesetzt:

1)		2)	
0,4 g	Dinitrophenylhydrazin	1 ml	Anilin
4 ml	H_2SO_4 konz	1 g	Diphenylamin
40 ml	Ethanol _{abs}	100 ml	Aceton
		1/10 vol	H_3PO_4 frisch dazu

Als Laufmittel diente 1-Propanol/ Essigester/ $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ (60:10:30). Beide Sprühreagenzien wurden bei 140°C für 10 min entwickelt.

Wie zu sehen ist, lassen sich nur DTT, die Substrate und der unbekannte Spot anfärben. In Ansätzen, in denen kein DTT eingesetzt wurde, erschien der zusätzliche Spot nicht. Zunächst wurde versucht, die Bedingungen in denen SpotX auftrat, im präparativen Maßstab zu optimieren. Leider ließ er sich hieraus nicht aufgereinigen, ohne zerstört zu werden. Aus den NMR-Spektren konnte nur reine Glukose nachgewiesen werden. 1-Mercapto-2-propanol bot sich aufgrund seiner hohen Ähnlichkeit zu DTT an, dieses zu ersetzen. Auch mit 1-Mercapto-2-propanol war der zusätzliche Spot auf der DC zu beobachten (SpotX2) und lief bei der DC mit demselben R_f -Wert. Im Gegensatz dazu waren Versuche mit 1-Amino-2-propanol und 1,2-Propandiol erfolglos. Hier wurde der Spot nicht dargestellt. Der mit 1-

Mercapto-2-propanol erhaltene „SpotX2“ ließ sich nun von Kieselgel extrahieren und bot in Vorversuchen ein von der Glukose unterschiedliches NMR-Spektrum. Um eine größere Substanzmenge für eine Charakterisierung zu erhalten, wurde nun mit 1-Mercapto-2-propanol der Enzymansatz optimiert.

Zur präparativen Darstellung des „SpotX2“ diente folgender Ansatz:

Enzym	(7 mg/ml)	0,25 ml
H ₂ O		0,15 ml
Tris-HCl	(0,5 M pH 7 ^{60°C})	0,1 ml
MnCl ₂	(10 mM)	0,1 ml
NAD ⁺	(9 mM)	0,1 ml
1-Mercapto-2-propanol		0,05 ml
Glukose	20%	0,25 ml

Dieser Inkubationsansatz wurde für 4 h bei 60°C inkubiert und anschließend auf präparative Dickschichtchromatographieplatten aufgetragen, um mit oben genannten Laufmittel entwickelt zu werden. Anschließend wurde der Rand der DC gefärbt und die Bande von der Platte gekratzt, um das Kieselgel mit Methanol zu waschen. Dieses wurde nun bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingedampft. Es blieben ca. 0,2 mg Feststoff übrig. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, um insgesamt ca. 10 mg des unbekanntes Spots zu erhalten.

Bei einer anschließenden Untersuchung der Masse mittels ESI-MS konnte eine Masse von 254 g/mol ermittelt werden. Im Spektrum (Abbildung 27) sind zwei deutliche Peaks bei 277,3 m/z und 531,1 m/z im plus-Modus und bei 253,4 m/z und 507,4 m/z zu sehen. Im plus-Modus wird die tatsächlich detektierte Masse dargestellt, die sich aus dem Produkt und der Masse des Ionisierungsmittels Natrium zusammensetzt. Im minus-Modus wird die Masse des Natriums bereits durch die Bearbeitungssoftware abgezogen. Häufig treten im Massenspektrum Dimere auf, die durch die Ionisierung miteinander in Wechselwirkung treten.

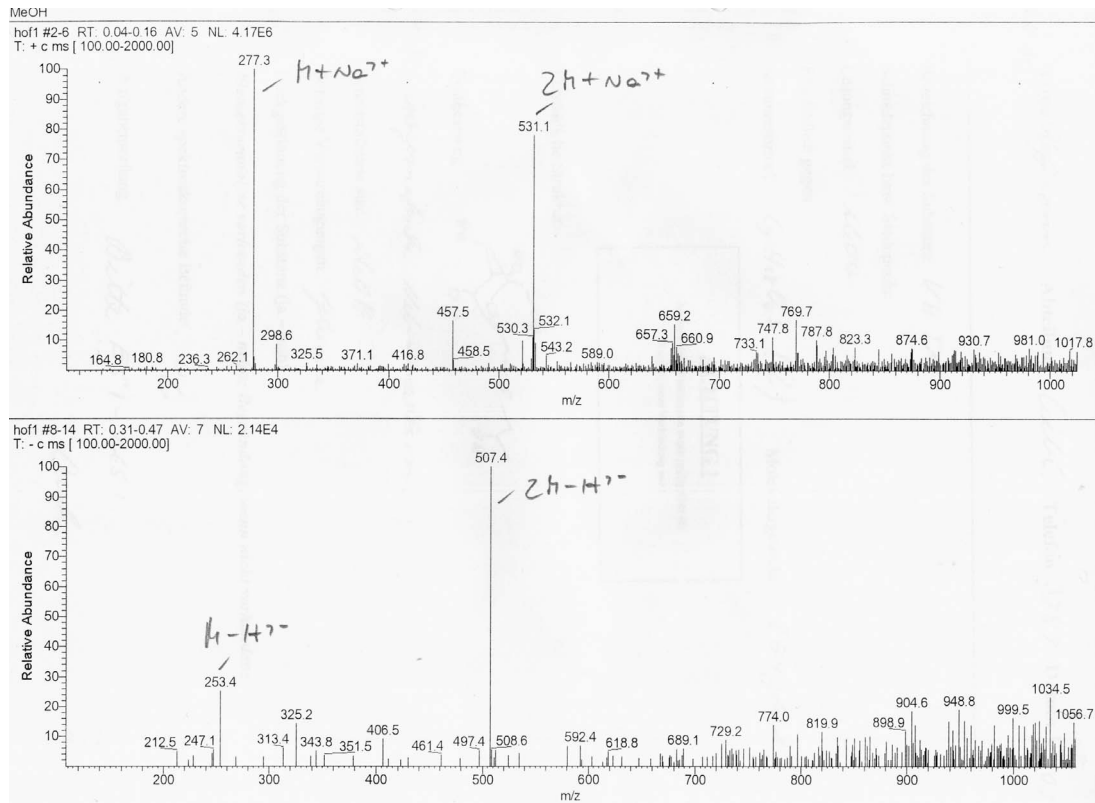


Abbildung 27: ESI-MS-Spektrum von „SpotX2“

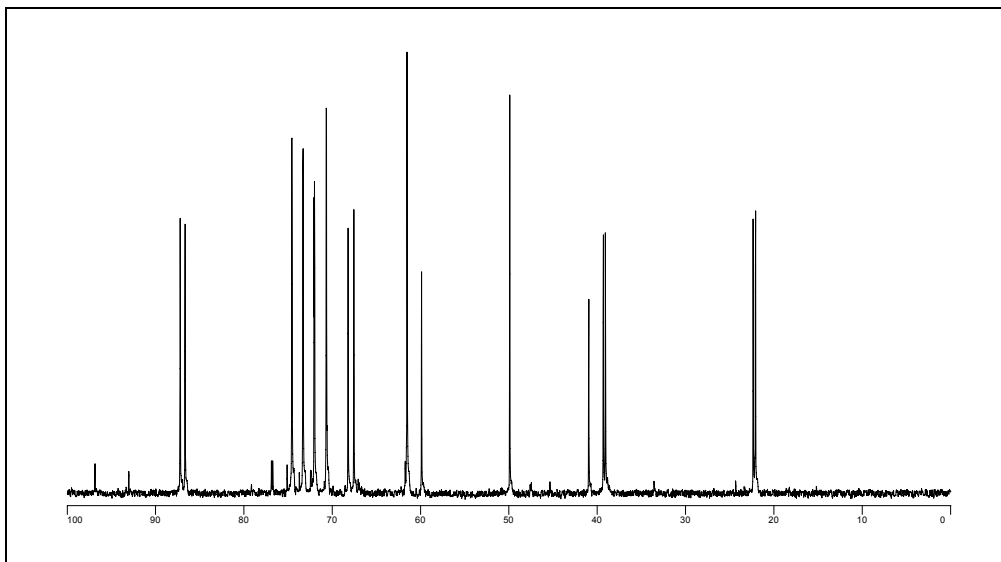


Abbildung 28: ¹³C-NMR, MeOD, 300MHz

Aus dem NMR- und ESI-MS-Spektrum konnte folgende Verbindung ermittelt werden:

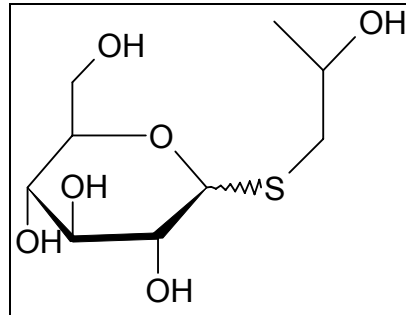


Abbildung 29: 2-Hydroxymethyl-6-(2-hydroxypropylsulfanyl)-glukopyranosid

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 75.479 MHz): $\delta = [22,1 (\text{CH}_3), 22,4 (\text{CH}_3)]\text{C1}$, $[39,0 (\text{CH}_2), 39,3 (\text{CH}_2)]\text{C1}_{\text{iPropyl}}$, $[59,9 (\text{CH}_2\text{OH}), 61,5 (\text{CH}_2\text{OH})]\text{C6}$, $[67,6 (\text{CHOH}), 68,2 (\text{CHOH})]\text{C2}_{\text{iPropyl}}$, $[70,7 (\text{CHOH})]\text{C4}$, $[72,0 (\text{CHOH})]\text{C2}$, $[73,3 (\text{CHOH})]\text{C3}$, $[74,6 (\text{CHC})]\text{C5}$, $[86,7 (\text{CHS}), 87,2 (\text{CHS})]\text{C1}$

Auffallend ist, daß sowohl das α - als auch das β -Anomer dieses Zuckerderivats auftraten. Leider war aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum keine Zuordnung der Signale zum jeweiligen Anomer möglich.

3.6. Kristallisation von AgIA

In Kooperation mit Prof. N. Sträter ist AgIA kristallisiert und anschließend mittels Röntgenbeugung vermessen worden (Lodge et al, 2003). AgIA ist die erste Glukosidase, die aus der GHF4 kristallisiert wurde. Im Kristall konnte die NAD^+ -Bindedomäne bestätigt werden. NAD^+ wurde an dem zuvor postulierten (Raasch et al., 2001) Rossmann-Fold gefunden und der Nicotinamidring ragt in das aktive Zentrum hinein. Wie aus anderen manganabhängigen Enzymen bereits bekannt ist, sind verschiedene Histidine an der Metallkoordination beteiligt. His-175 und His-177 konnten als wahrscheinliche Bindepartner verifiziert werden. Trotz der Anwesenheit von Mangan im Kristallisationsansatz ließ es sich nicht im aktiven Zentrum nachweisen. Hierfür sind zwei mögliche Erklärungen denkbar. Erstens ist der niedrige pH von 4,6 zu nennen, bei dem die Histidine protoniert vorliegen und zweitens der erstaunliche Befund, daß das Cys-174 doppelt oxidiert ist.

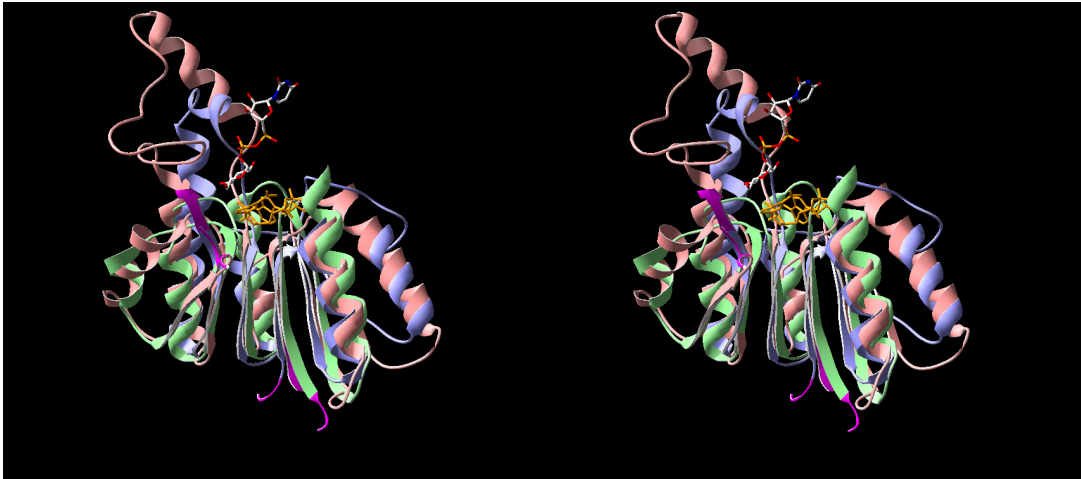


Abbildung 30: Stereodarstellung der Elektronendichte. rot → *T. maritima* AgIA (pos. 4-177), grün → Glucose/galactose-binding protein (1GCA) (pos. 1-110) blau → UDP-Galactose-4-epimerase (1EK6) (pos. 2-133) mit NAD und UDP-Glc

Die Kristalle von AgIA aus *T. maritima* konnten bis auf 1,9 Å aufgelöst werden. Das Enzym liegt als Dimer vor. Das Cys174 konnte bereits durch direkte Mutagenese (C. Raasch, persönliche Mitteilung) als für die Katalyse essentiell bestimmt werden. Mutanten, in denen das Cystein durch ein Serin ersetzt wurde, waren komplett inaktiv. Im Rahmen der Röntgenbeugung wurde diese Aminosäure als doppelt oxidiert identifiziert (Abbildung 31). Cys174 liegt in AgIA als Sulfinsäure vor, was in dieser Enzymfamilie noch nicht beobachtet wurde.

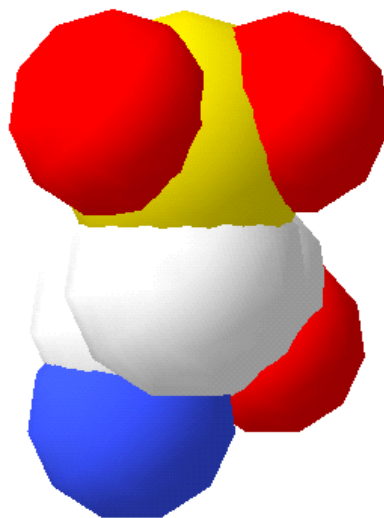


Abbildung 31: Elektronendichtedarstellung von Cys174 aus AgIA

AglA liegt im Kristall anscheinend inaktiv vor, da das kokristallisierte Substrat Maltose nicht umgesetzt wurde. Es sollte versucht werden, dieses Enzym in nicht oxidierte Form zu erhalten.

3.7. Anaerobe Aufreinigungen und Anzuchten

Zunächst wurde versucht, AglA-produzierenden Stamm *E. coli* JM83 aerob anzuzüchten und anschließend das exprimierte Enzym anaerob aufzureinigen. Hierfür wurden die Puffer entgast und das gereinigte Enzym unter Stickstoffatmosphäre gelagert. Dies führte aber zu keiner weiteren Aktivitätssteigerung. Daraufhin sollte auch der AglA-produzierende Stamm in verschiedenen Standardmedien zur anaeroben Anzucht wachsen. Die Zellen wuchsen nur zu einer sehr geringen optischen Dichte heran und es kam zu keiner Überexpression. Folgende Abwandlung des M9-Mediums führte zu einem Zellwachstum und erbrachte nach sieben Tagen Inkubation bei 37°C und 0,5 mg Enzym aus 4 g Zellmasse.

Für einen Liter:	Trypton	32 g
	Hefe	20 g
	Na ₂ CO ₃	6 g
	KH ₂ PO ₄	3 g
	NaCl	0,5 g
	Glukose	3,6 g
	L-Tryptophan	0,5 g
	Ampicillin	100 mg
	IPTG	0,5 mM

Aber auch bei dieser Aufreinigung war keine weitere Aktivitätssteigerung zu verzeichnen.

3.8. Fluoreszenz- und Absorptionsuntersuchungen an AgIA

Wegen dem ungewöhnlichen Bedarf an NAD^+ wurde vermutet, daß es sich bei der Bindungsspaltung um einen Redox-Mechanismus handeln könnte. In dem Fall sollte im Reaktionszyklus NADH auftreten. NADH zeigt zwei sehr eindeutige Eigenschaften, mit denen sich die Anwesenheit von NADH sehr empfindlich nachweisen lässt. Zum einen die Absorption von UV-Licht bei 340 nm und zum anderen die Fluoreszenz bei 460 nm. Durch UV-Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie-Messungen mit freundlicher Unterstützung durch Herrn Dr. M. Rudolph wurde versucht, die NADH-Bildung durch AgIA nachzuweisen. Zunächst wurden die Absorptionsspektren von AgIA (Abbildung 32) und NADH (Abbildung 33) aufgenommen.

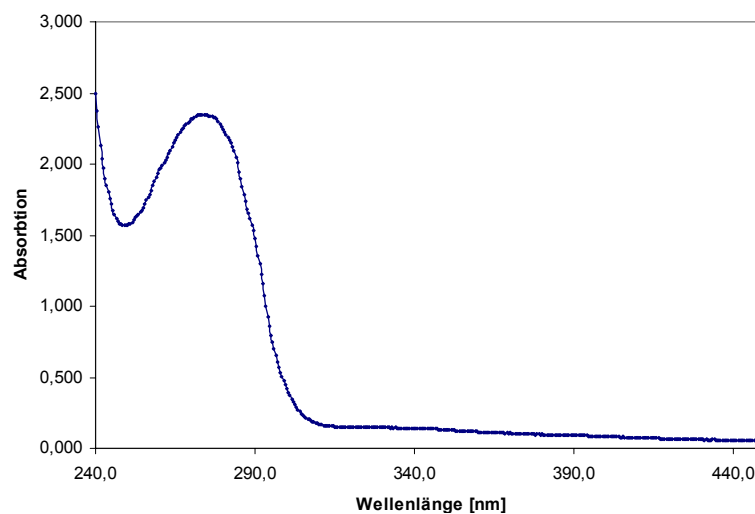


Abbildung 32: Absorptionsspektrum von AgIA

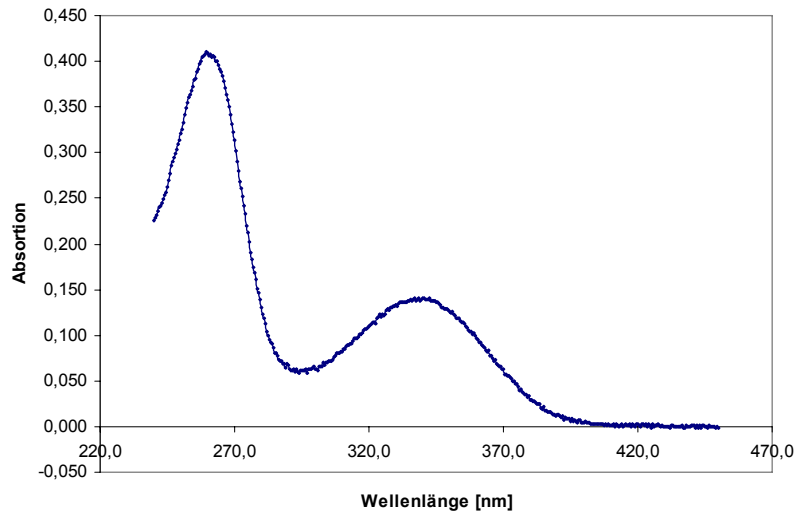


Abbildung 33: Absorptionsspektrum von NADH

Wie in der Ausschnittsvergrößerung (Abbildung 34) konnte mittels Absorption NADH nicht eindeutig nachgewiesen werden. Es ist zwar ein Signal bei 340 nm zu erkennen, ist aber zu schwach, um eine eindeutige Aussage zu treffen.

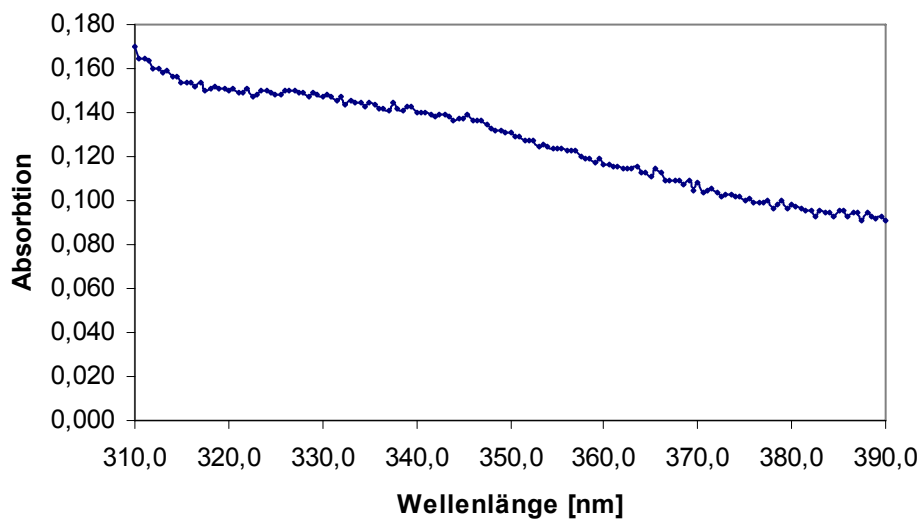


Abbildung 34: Ausschnittsvergrößerung von 320-390 nm des Absorptionsspektrum von AgIA

Das Enzym wurde mittels Fluoreszenz untersucht. Hierbei stellte sich heraus, daß das Enzym allein schon eine sehr starke Fluoreszenz zeigte, obwohl noch keine Cofaktoren anwesend waren.

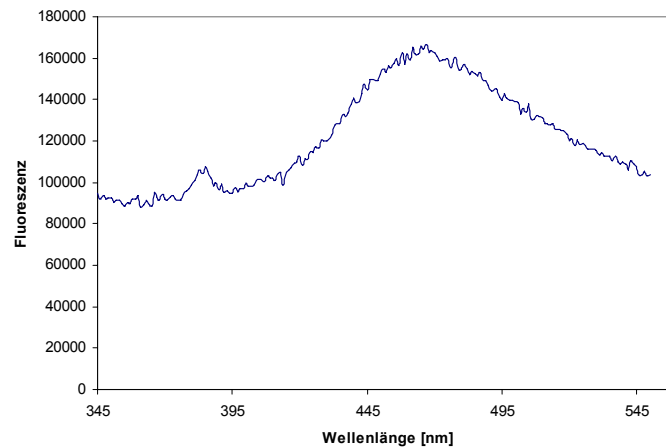


Abbildung 35: Fluoreszenzspektrum von AgIA allein ohne Cofaktoren

Für das Fluoreszenzspektrum ohne Enzym wurde folgender Messansatz verwendet:

H ₂ O		0,65 ml
Tris-HCl	(0,5 M pH 7 ^{60°C})	0,1 ml
MnCl ₂	(10 mM)	0,1 ml
NAD ⁺	(9 mM)	0,1 ml
DTT	(1M)	0,05 ml

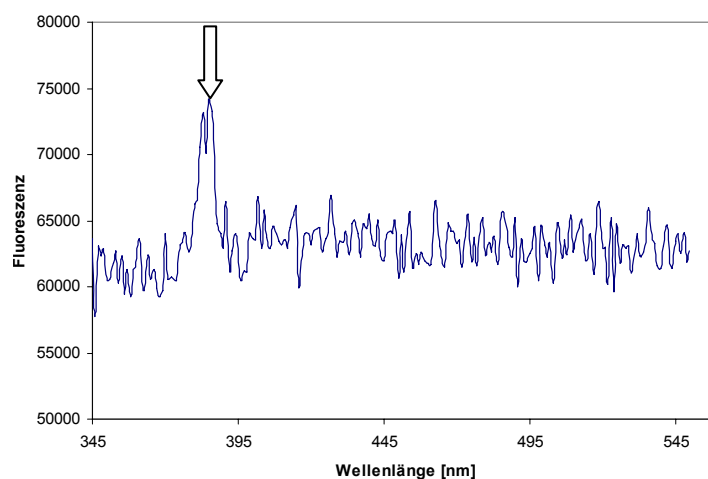


Abbildung 36: Fluoreszenzspektrum aller Cofaktoren ohne Zugabe von Enzym. Pfeil: Ramanpeak des Wassers.

Wie in Abbildung 36 zu sehen ist, zeigt der Ansatz ohne Enzym keine Fluoreszenz. Es ist nur der Raman-Peak des Wassers zu sehen.

Da nicht klar war, ob das Enzym selbst diese Fluoreszenz zeigt, oder noch im Rossmann-Fold gebundenes NADH die Strahlung auf das Molekül überträgt, wurde das Enzym mit Perchlorsäure bei 90°C gefällt. Hierfür diente folgender Reaktionsansatz:

AgIA (7 mg/ml)	1 ml
HClO ₃ (1 M)	0,75 ml

Nach Inkubation für 5 min bei 90°C wurde mit 0,25 ml Kaliumacetat (3 M) neutralisiert. Das Präzipitat wurde anschließend bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert und danach der Überstand vermessen.

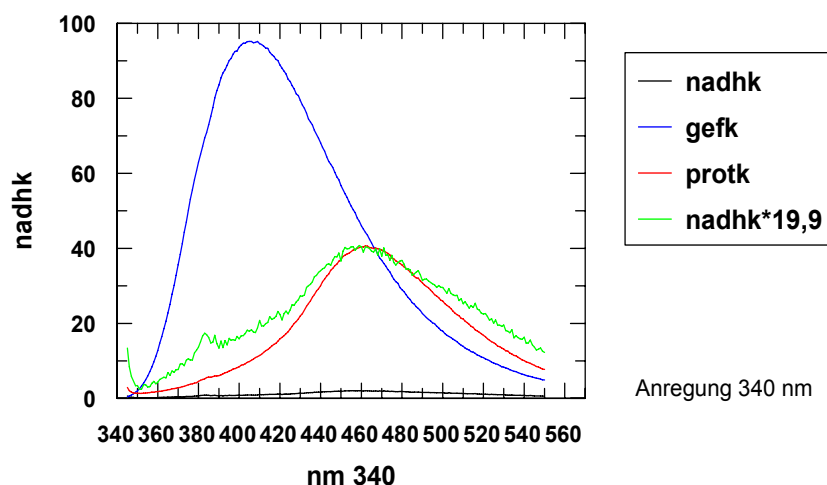


Abbildung 37: Überlagerung der Emissionsspektren. NADH Stammlösung (5 µM) (schwarz), AgIA (5 µM) (rot), AgIA (gefällt) (blau) und NADH Stammlösung (5 µM) mit dem Faktor 19,9 multipliziert (grün), das k am Ende der Bezeichnungen steht für gegen Puffer und Cofaktoren bereinigte Werte.

Erstaunlicherweise zeigt der Überstand des gefällten Proteins eine hohe Fluoreszenz. Sie liegt aber deutlich außerhalb des Emissionsmaximums von NADH und scheint durch Aminosäuren verursacht zu sein, die durch die Fällungsreaktion mit Perchlorsäure abgespalten wurden. Eine NADH Stammlösung die äquimolar zum Enzym gemessen wurde, zeigte eine fast 20x schwächere Emission, als die

entsprechende Enzymlösung. Die Emissionsmaxima der NADH- und der Enzymlösung liegen beide bei 460 nm.

3.9. Enzyme der Glykosidhydrolase-Familie 4 von *Petrogala miotherma*

3.9.1. Klonierungsstrategie

In *P. miotherma* sind drei ORFs für GHF4-Enzyme anotiert. Aufgrund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit bzw. Identität am Anfang und am Ende der ORFs war es nicht möglich, die drei putativen α -Glukosidasen RPMI00511, RPMI00720 und RPMI01263 direkt mittels PCR aus der genomischen DNA zu amplifizieren. Um die drei Enzyme zu klonieren, mussten zuerst durch PCR geeignete Templates erstellt werden. Dafür wurden Primer gewählt, die ein beträchtliches Stück sequenzauf- bzw. abwärts vom Start- und Stopcodon entfernt banden. Diese Templates waren ca. 600 bp größer, als das zu klonierende Gen. Mit ihnen war es nun möglich, das gesuchte ORF zu klonieren und gleichzeitig die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* einzufügen.

3.10. Untersuchung des ORFs RPMI00511

3.10.1. Klonierung von RPMI00511 aus *P. miotherma* in *E.coli* BL21

Die Isolierung des Templates für RPMI00511 erfolgte aus der genomischen DNA von *P. miotherma* mit Hilfe von Amplifikation durch PCR. Die verwendeten Primer waren 24 bzw. 30 bp lang.

Bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')
511_for+400	ggg cct ttg gtt gaa tct cct gta
511_rev+200	ggg ttt ttg taa agg aaa gat agt tac cga

Substanz	Volumen [µl]
PCR Grade Water	28,6
dNTP-Mix (2 mM)	5
Template-DNA	1
Primer „forward“	4
Primer "reverse"	4
KOD HiFi DNA Polymerase	0,4
MgCl ₂ 10 mM	5,0
10x Puffer	5
Gesamtvolumen	50,0

Temperatur [°C]	Zeit [sek]	Reaktion
98	15	Denaturierung
Gradient 60-80	5	Primerannealing
72	40	Primerverlängerung

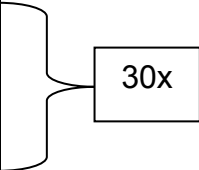
} 30x

Der PCR-Ansatz wurde bei den angegebenen Bedingungen inkubiert. Anschließend extrahierte wurde das 2 kb PCR-Produkt auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel herausgeschnitten und extrahiert. Dieses Fragment diente nun als Template für die folgende PCR, in der die Schnittstellen *NdeI* und *HindIII* eingefügt wurden.

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')
511_gen_for	ggg <u>cat agt</u> cca gtt aaa att tct ttt ata gga
511_gen_rev	ggg <u>aag ctt</u> tta cct tct ata atg ctc ctt cat tcc

Substanz	Volumen [µl]
PCR Grade Water	28,6
dNTP-Mix (2 mM)	5
Template-DNA	1
Primer „MelA forward“ *	4
Primer „MelA reverse“ *	4
KOD HiFi DNA Polymerase	0,4
MgCl ₂ 10 mM	5,0
10x Puffer	5
Gesamtvolumen	50,0

Temperatur [°C]	Zeit [sek]	Reaktion
98	15	Denaturierung
Gradient 60-80	5	Primerannealing
72	40	Primerverlängerung



Dieses wurde nun mit dem *EcoRV* geschnittenen pBSK⁺-Vektor ligiert und in *E. coli* XL1blue transformiert. Nach Blau-Weiß-screening wurde ein Klon mit korrekt inseriertem PCR-Fragment ausgewählt und unter Verwendung der neu eingefügten Schnittstellen *NdeI*/ *HindIII* in den Vektor pET24c kloniert (Abbildung 38). Dieses neue Konstrukt wurde nun zur heterologen Expression in den Stamm *E. coli* BL21 elektroporiert.

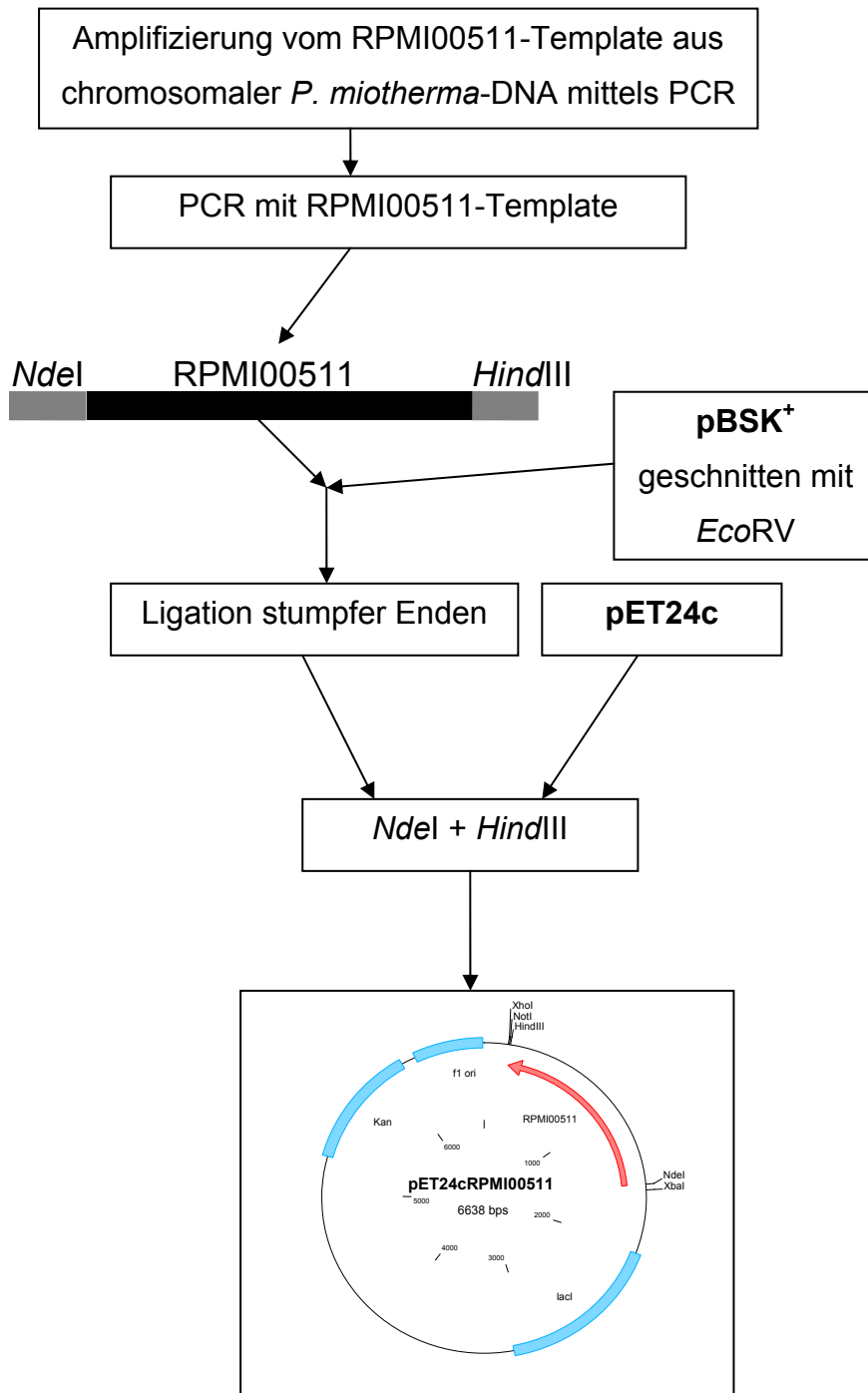


Abbildung 38: Klonierungsstrategie für *P. miotherma* ORF RPMI00511

3.10.2. Anzucht und Herstellung eines Rohextrakts

Für eine Charakterisierung wurde RPMI00511 im präparativen Maßstab angezogen. Hierfür impfte man 1,5 l LB_{Kan} mit 30 ml Inokulum an und induzierte bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 mit 0,5 mM (Endkonzentration) IPTG. Danach inkubierte man über Nacht unter kräftiger Belüftung bei 37°C. Die Zellen wurden anschließend bei 7000 Upm in GS3-Bechern geerntet, in 20 mM Tris-HCl pH 7 aufgenommen und mittels einer French Pressure Cell aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand anschließend 15 min bei 60°C denaturiert. Bei dieser Hitzefällung werden ein Großteil der Wirtsproteine zerstört und das hitzestabile Enzym bleibt bei der anschließenden Zentrifugation bei 14000 rpm im Überstand.

3.10.3. Aufreinigung des von RPMI00511 kodierten Enzyms mittels FPLC

Der Überstand aus der Hitzefällung wurde sterilfiltriert und anschließend an einem Anionentauscher Source 15Q aufgereinigt.

Parameter	
Medium :	Source 15 Q
Säule :	XK 26
Säulenvolumen :	50 ml
Puffer A :	20 mM Tris-Cl pH 7
Puffer B :	20 mM Tris-Cl pH 7, 1M NaCl
Flußrate :	10 ml/min
Fraktion :	10 ml
Equilibrierung :	2 SV Puffer B, 10 SV Puffer A
Gradient :	siehe Elutionsprofil

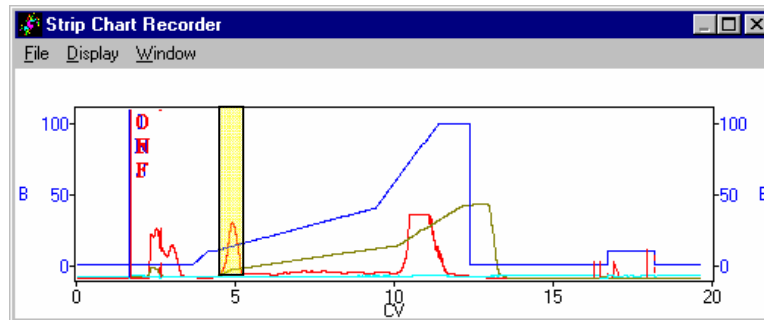


Abbildung 39: Chromatogramm des Source 15Q-Laufs. Blau: Gradient, grün: Leitfähigkeit, rot: Proteinkonzentration (aktive Fraktionen gelb hinterlegt)

Die gelb hinterlegten Fraktionen wurden gepoolt und mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft (Abbildung 40).

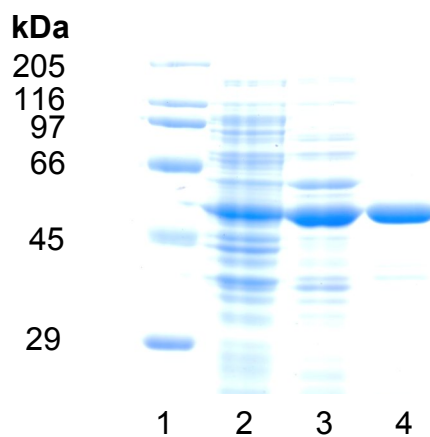


Abbildung 40: SDS-Page der Reinigungsschritte von RPMI00511 (Spur 1: Marker, Spur 2: Rohextrakt, Spur 3: hitzegefällter Rohextrakt, Spur 4: Source 15Q-Pool)

3.10.4. Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad des von RPMI00511 kodierten Enzyms

Der Oligomerisierungsgrad mittels wurde wie in Abschnitt 3.3.1 mittels Gelfiltration bestimmt. Hierfür diente eine Superose-6-Gelfiltrationssäule der Firma Pharmacia. Für das RPMI00511-Produkt wurde ein Elutionsvolumen von 14,55 ml ermittelt; mit der aus der Regressionsgraden abgeleiteten Formel:

$$\log MW [\text{kDa}] = -1,2767 \cdot K_{av} + 5,9996$$

errechnete sich daher für das native Enzym eine Molekularmasse von 283 kDa. Das entspricht etwa der fünffachen Masse der aus dem SDS-Gel abgeleiteten und aus der Proteinsequenz berechneten Größe von 54 kDa. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die putative α -Glukosidase als Pentamer vorliegt.

3.10.5. Biochemische Charakterisierung

3.10.5.1. Substratspektrum

Trotz intensiver Untersuchungen mit verschiedenen Substraten, die sowohl α - als auch β -Verknüpfungen und unterschiedliche Oligomerisierungsgrade aufwiesen, konnte keine Aktivität zugeordnet werden.

3.11. Untersuchung des ORFs RPMI00720

3.11.1. Klonierung des ORFs RPMI00720

Die Isolierung des Templates für RPMI00720 erfolgte aus der genomischen DNA von *P. miotherma* mit Hilfe von Amplifikation durch PCR. Die verwendeten Primer waren 24 bp lang.

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')
720_for_+400	ggg <u>aat tcc</u> ccc tgc ttt ttt tgt
720_rev+200	ggg <u>agc tat</u> tcc tga aga agt gga

Der PCR-Ansatz wurde wie schon in 3.10.1 beschrieben gewählt, ebenso wie die PCR-Bedingungen.

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')
1263_720_for_gen	ggg cat atg aca gct atc aag tta
1263_720_gen_rev	ggg aag ctt cta ttt ttt gct gta gtg ctt

Der PCR-Ansatz wurde bei den angegebenen Bedingungen inkubiert und anschließend extrahierte man das 1,4 kb PCR-Produkt auf einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel herausgeschnitten und extrahiert. Dieses wurde nun mit dem *EcoRV* geschnittenen pBSK⁺-Vektor ligiert und in *E. coli* XL1blue transformiert. Nach Blau-Weiß-screening wurde ein Klon mit korrekt inseriertem PCR-Fragment ausgewählt und unter Verwendung der neu eingefügten Schnittstellen *NdeI*/ *HindIII* in den Vektor pET24c kloniert (Abbildung 41). Dieses neue Konstrukt wurde nun zur heterologen Expression in den Stamm *E. coli* BL21 elektroporiert.

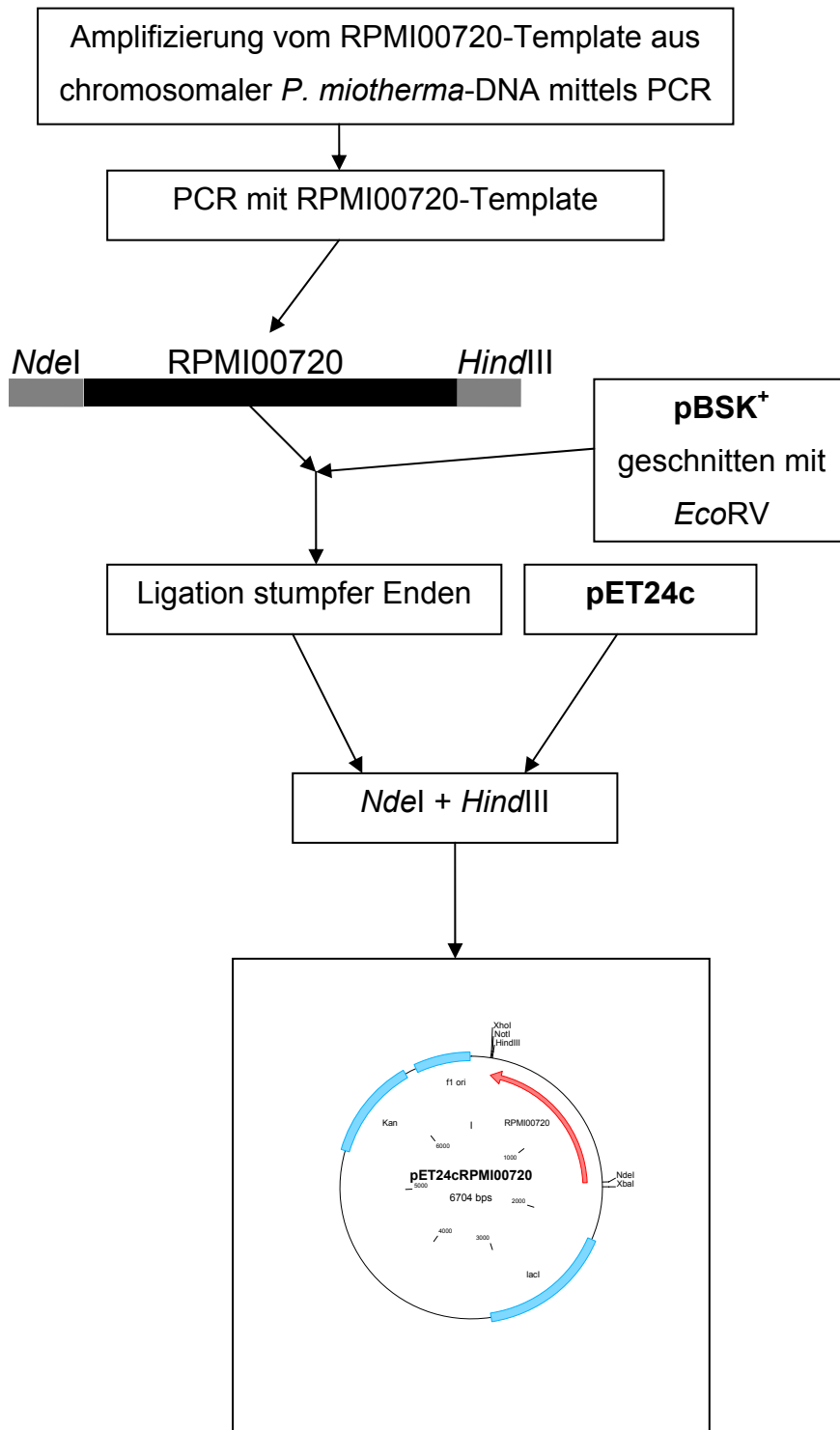


Abbildung 41: Klonierungsstrategie für ORF RPMI00720

3.11.2. Anzucht und Herstellung eines Rohextrakts

Der RPMI00720 exprimierende Stamm *E. coli* BL21 wurde im großen Maßstab angezogen. Hierfür wurden 1,5 l LB_{Kan} mit 30 ml Inokulum angeimpft und bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 mit 0,5 mM (Endkonzentration) IPTG induziert. Danach wurde über Nacht unter kräftiger Belüftung bei 37°C bebrütet. Die Zellen wurden anschließend bei 7000 Upm in GS3-Bechern geerntet, in 20 mM Tris-HCl pH 7 aufgenommen und mittels einer French Pressure Cell aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand anschließend 15 min bei 60°C denaturiert. Bei dieser Hitzefällung wurden ein Großteil der Wirtsproteine zerstört und das hitzestabile Enzym blieb bei der anschließenden Zentrifugation bei 14000 rpm im Überstand.

3.11.3. Aufreinigung des von RPMI00720 kodierten Enzyms mittels FPLC

Der Überstand aus der Hitzefällung wurde sterilfiltriert und anschließend an einem Anionentauscher Source 15Q aufgereinigt.

Parameter	
Medium :	Source 15 Q
Säule :	XK 26
Säulenvolumen :	50 ml
Puffer A :	20 mM Tris-Cl pH 7
Puffer B :	20 mM Tris-Cl pH 7, 1M NaCl
Flußrate :	10 ml/min
Fraktion :	10 ml
Equilibrierung :	2 SV Puffer B, 10 SV Puffer A
Gradient :	siehe Elutionsprofil

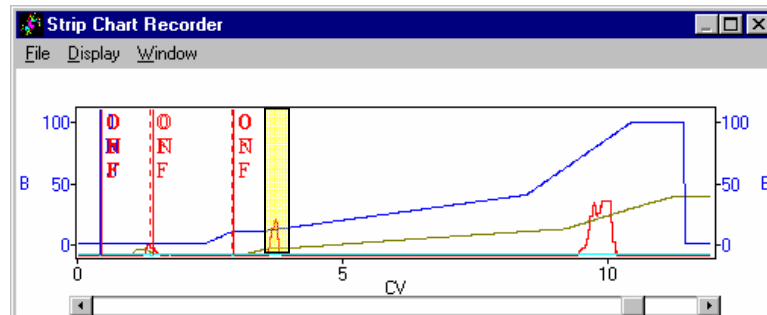


Abbildung 42: Chromatogramm des Source 15Q-Laufs, blau: Gradient, grün: Leitfähigkeit, rot: Proteinkonzentration (aktive Fraktionen gelb hinterlegt)

Die gelb hinterlegten Fraktionen wurden gepoolt und mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft (Abbildung 43).

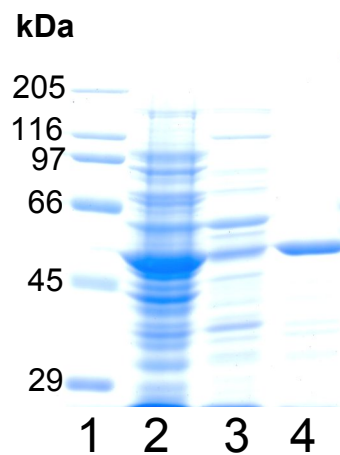


Abbildung 43: SDS-PAGE der Reinigungsschritte von RPMI00720 (Spur 1: Marker, Spur 2: Rohextrakt, Spur 3: hitzegefällter Rohextrakt, Spur 4: Source 15Q-Pool)

3.11.4. Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad von RPMI00720

Wie schon in 3.3.1 beschrieben, wurde der Oligomerisierungsgrad mittels Gelfiltration ermittelt. Hierfür diente eine Superose-6-Gelfiltrationssäule der Firma Pharmacia. Für RPMI00720 wurde ein Elutionsvolumen von 15,70 ml ermittelt; mit der aus der Regressionsgraden abgeleiteten Formel:

$$\log MW [\text{kDa}] = -1,2767 \cdot K_{av} + 5,9996$$

errechnete sich daher für das native Enzym eine Molekularmasse von 228 kDa. Das entspricht etwa der vierfachen Masse der aus dem SDS-Gel abgeleiteten Größe von 55,5 kDa. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die putative α -Glukosidase als Tetramer vorliegt.

3.11.5. Biochemische Charakterisierung

3.11.5.1. Substratspektrum

Ein breit angelegtes Screening (2.4.3.4) mit verschiedenen α -, β -Substraten und unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad zeigte, daß von ORF RPMI00720 kodierte Enzym genauso wie AgIA aus *T. maritima* (Raasch et al., 2001), sowohl α -galaktosidische, als auch α -glukosidische Bindungen spalten kann. Wie bei AgIA wurde eine höhere Aktivität gegenüber α -glukosidischen Verknüpfungen festgestellt. Die Aktivität gegenüber pNP- α -Gal lag nur bei 65 %.

Substrate	720
Polymere	
β-Dextran, Glycogen, Dextran, Amylopectin Stärke	-
Maltooligosaccharide	
Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose, Maltoheptaose	-
Cyclodextrine	
γ-Cyclodextrin, β-Cyclodextrin, α-Cyclodextrin	-
Disaccharide	
Maltose	+
Raffinose	+
Saccharose	+
Cellobiose	-
Melibiose	+
Lactose	-
Synthetische Substrate	
pNP-α-D-Glukose	+
pNP-β-D-Glukose	-
pNP-α-D-Galaktose	+
pNP-β-D-Galaktose	-

3.11.5.2. Enzymkinetik

Für die Ermittlung der kinetischen Daten der RPMI00720-α-Glukosidase wurde die Aktivität des Enzyms mit steigender Konzentration an para-Nitrophenyl-α-D-glukopyranosid (pNP-α-Glu) bestimmt (2.4.2.9) (Abbildung 44). In folgenden Abbildungen finden sich die entsprechenden Michaelis-Menten-, Lineweaver-Burke- und Eadie-Hofstee-Auftragungen zu Berechnung von K_m und v_{max} .

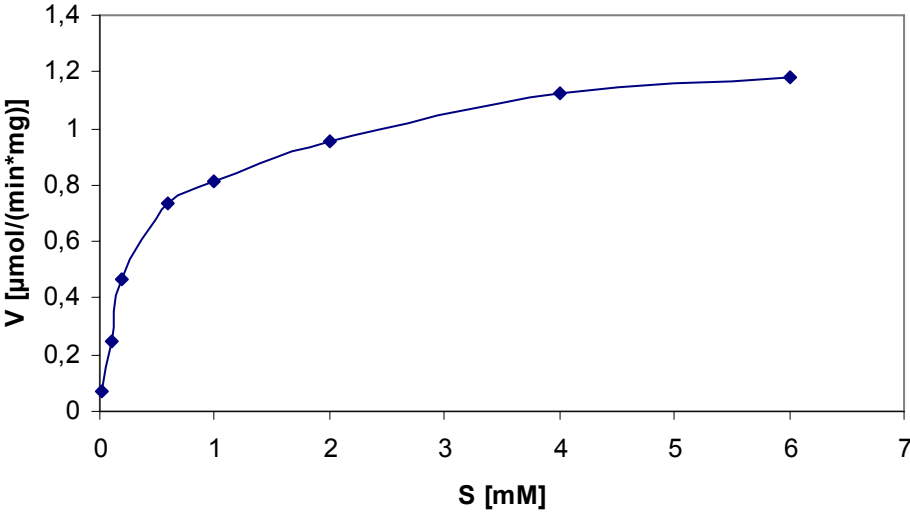


Abbildung 44: Abhängigkeit der Aktivität von der pNP-α-Glu-Konzentration (Michalis-Menten-Diagramm).

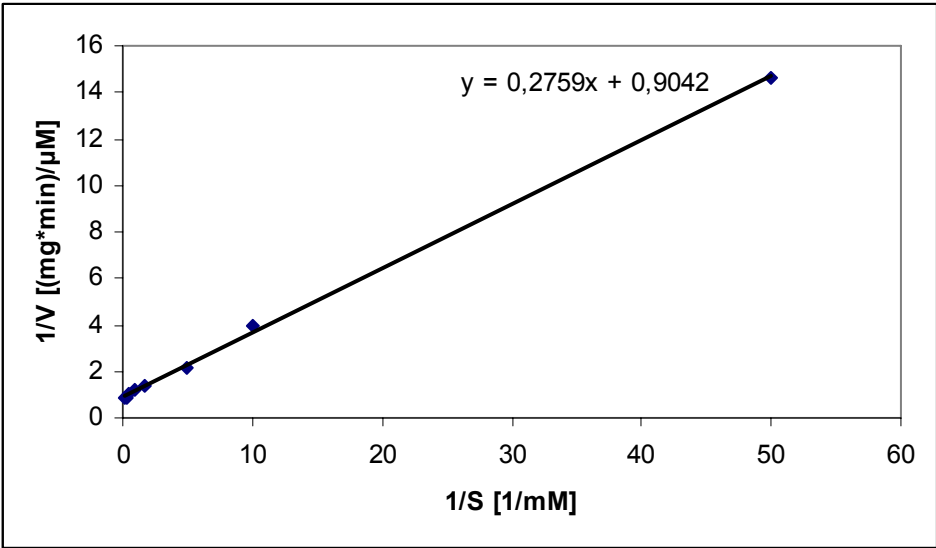


Abbildung 45: Darstellung der Daten aus Abbildung 44 als Lineweaver-Burke-Diagramm

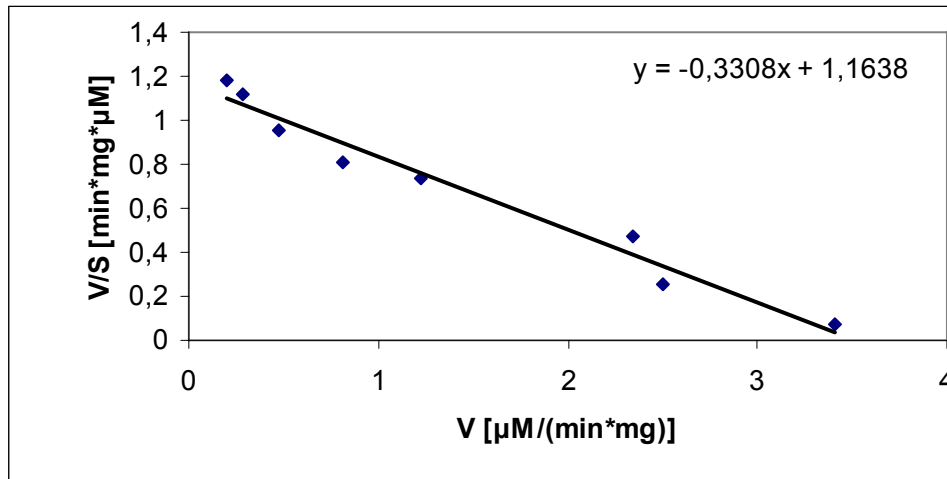


Abbildung 46: Darstellung der Daten aus Abbildung 44 als Eadie-Hofstee-Diagramm

Für die Aktivität an pNP- α -Glu ergeben sich aus dem Lineweaver-Burke- und Eadie-Hofstee-Diagramm folgende Werte für K_m und v_{max} für RPMI00720:

	Lineweaver-Burke	Eadie-Hofstee
K_m	0,31 mM	0,33 mM
v_{max}	1,11 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$	1,16 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$

3.11.5.3. Bestimmung des pH-Optimums

Hierfür wurde die Aktivität der α -Glukosidase mit pNP- α -Glu in einem pH-Bereich zwischen 5,5 und 10 bestimmt (2.4.2.9). Es wurden folgende Puffer für die verschiedenen pH-Bereiche verwendet: Natriumsuccinat (pH 5.5-7.0), HEPES (pH 7.0-8.5), 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonsäure (CAPS; pH 9.0-10). Die Puffer wurden bei 60°C eingestellt.

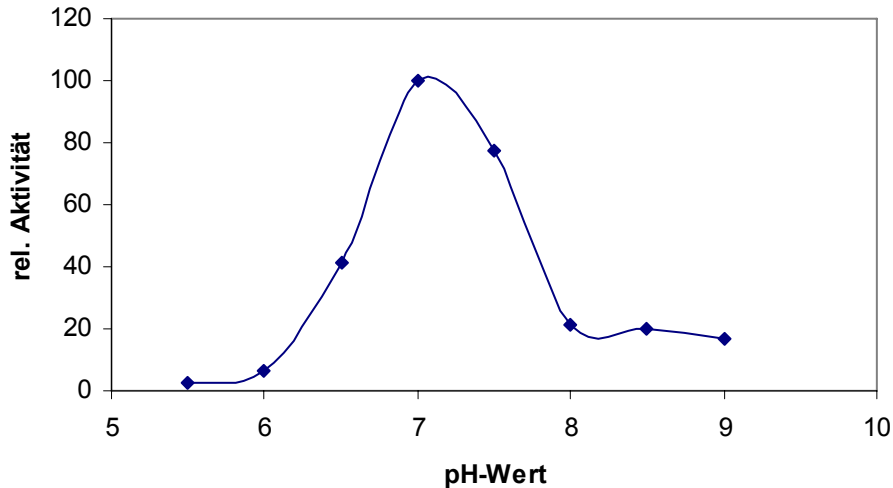


Abbildung 47: pH-Kurve

Es zeigte sich ein Aktivitätsmaximum bei einem pH 7, wobei alle Messpunkte prozentual in Relation zur höchsten Aktivität gesetzt wurden.

3.11.5.4. Bestimmung des „Temperaturoptimums“

Analog zur Messung der optimalen Aktivität in Abhängigkeit der H^+ -Ionenkonzentration wurde in diesem Fall der Temperaturbereich gesucht, in dem das Enzym seine maximale Aktivität an pNP- α -Glu entfaltet.

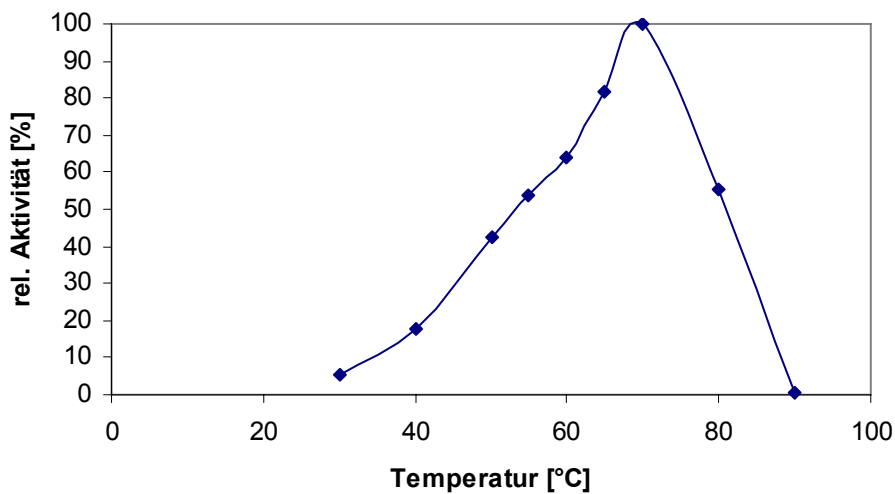


Abbildung 48: „Temperaturoptimum“ der RPMI00720-kodierten α -Glukosidase

Die höchste Aktivität des Enzyms wurde bei 70°C ermittelt. Alle nachfolgenden Tests wurden dann bei 60°C durchgeführt. Eine Inkubationstemperatur von 10°C unter dem Temperaturoptimum sollte verhindern, daß das Enzym während der Aktivitätsbestimmung zu stark inaktiviert wurde und somit die Messung verfälschte.

3.11.5.5. Bestimmung der Thermostabilität

Die Ansätze (2.4.3.3) wurden bei den entsprechenden Temperaturen vorinkubiert. Dabei wurden 4,2 µg Enzym pro Messung eingesetzt. Die Vorinkubation erfolgte bei 40, 50, 60, 70, 80 und 90°C. Das Ergebnis der thermischen Inaktivierung ist in (Abbildung 48) dargestellt.

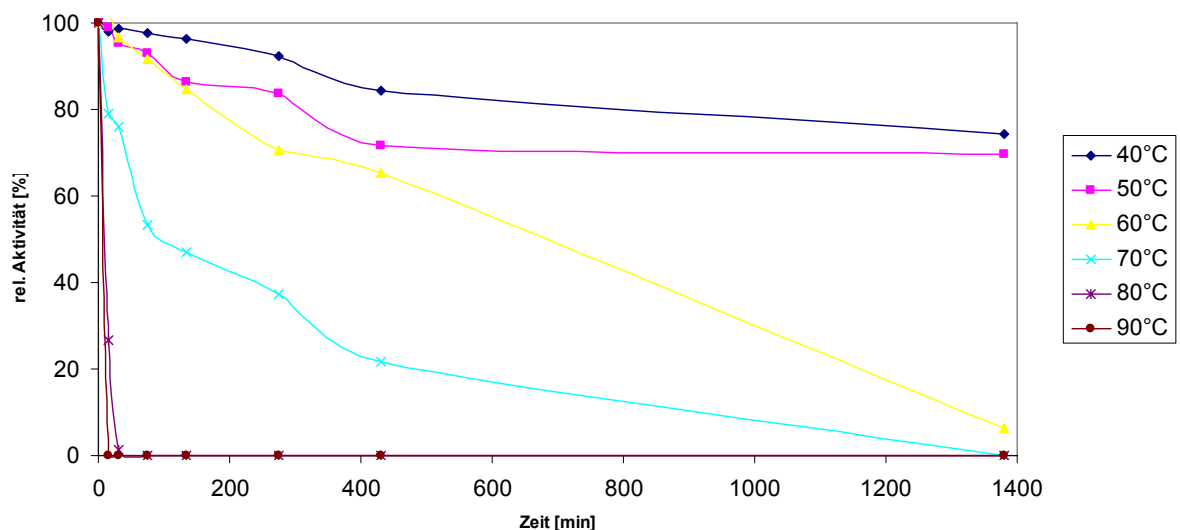


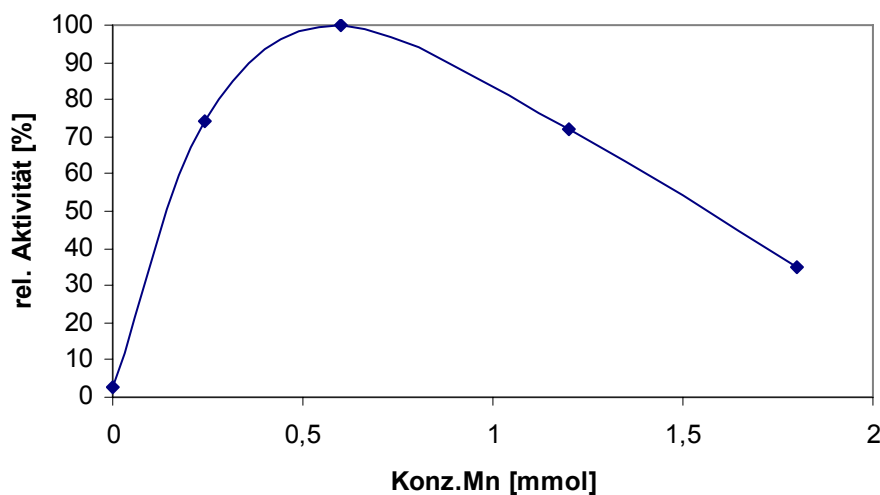
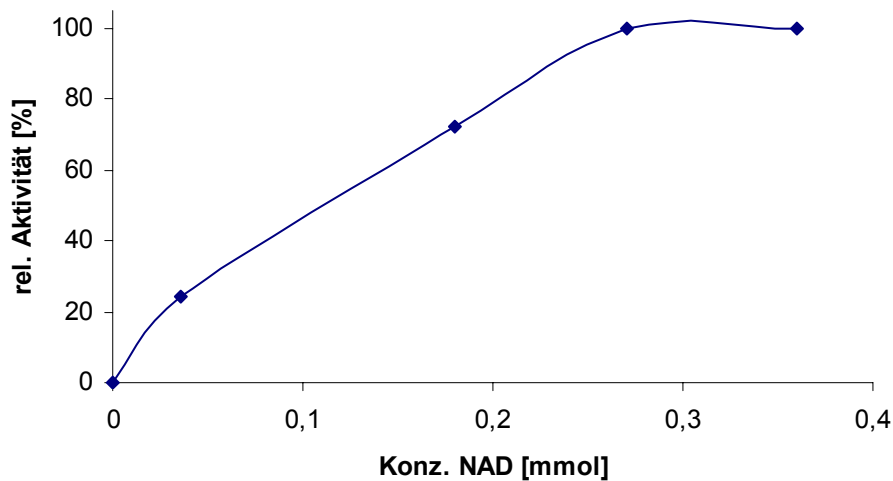
Abbildung 49: Temperaturinaktivierung

Wie aus Abbildung 49 hervorgeht, verliert das Enzym über 60°C sehr schnell seine Aktivität. Im Temperaturbereich bis 60°C zeigt RPMI00720 eine hohe Toleranz gegenüber Inaktivierung durch Hitzeeinwirkung.

3.11.5.6. Abhängigkeit der RPMI00720- α -Glukosidase von Cofaktoren

Die von RPMI00720 abgeleitete Aminosäuresequenz weist die typischen konservierten Bereiche auf, wie alle Enzyme der GHF4. Dementsprechend wurde für das Enzym die Abhängigkeit von den für die GHF4-Enzyme üblichen Cofaktoren festgestellt (2.4.2.10). Optimale Aktivität wurde bei folgenden Konzentrationen der Cofaktoren erreicht:

NAD ⁺	2,7 mM
DTT	0,25 M
Mn ²⁺	0,6 mM
Tris-HCl pH 7 ^{60°C}	0,1 M



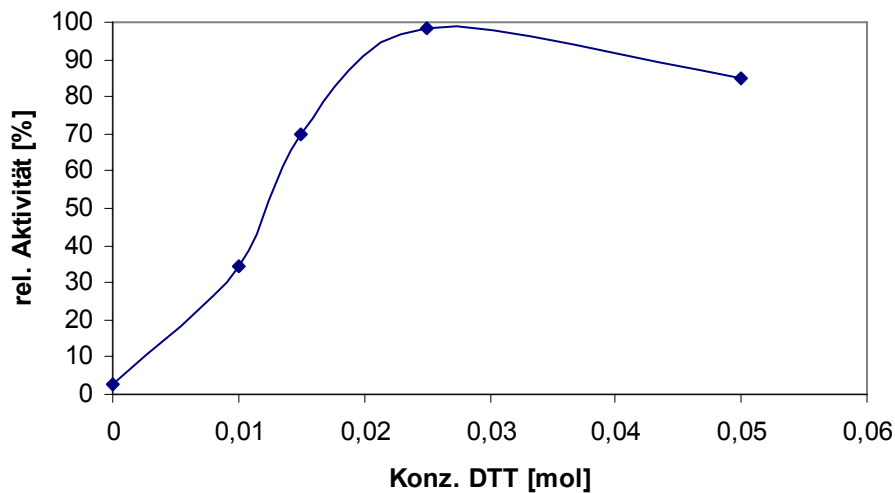


Abbildung 50: Effekt der Konzentration von NAD^+ , Mn^{2+} und DTT auf die Aktivität von gereinigtem RPMI00720. Zur Messung wurde die Konzentration des jeweiligen Parameters variiert, während die beiden anderen Cofaktoren in optimaler Konzentration zugesetzt wurden.

Für die volle enzymatische Aktivität war die Anwesenheit aller drei Cofaktoren notwendig. Fehlte auch nur eine der drei Komponenten Mn^{2+} , NAD^+ oder DTT, so war ein dramatischer Einbruch der maximalen Aktivität zu verzeichnen.

Weitere Tests mit zweiwertigen Ionen (Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} und Fe^{2+}) zeigten keine signifikante Aktivität.

DTT zeigte eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber Mercaptoethanol. Im folgenden Diagramm (Abbildung 51) sind beide Reduktionsmittel gegenübergestellt.

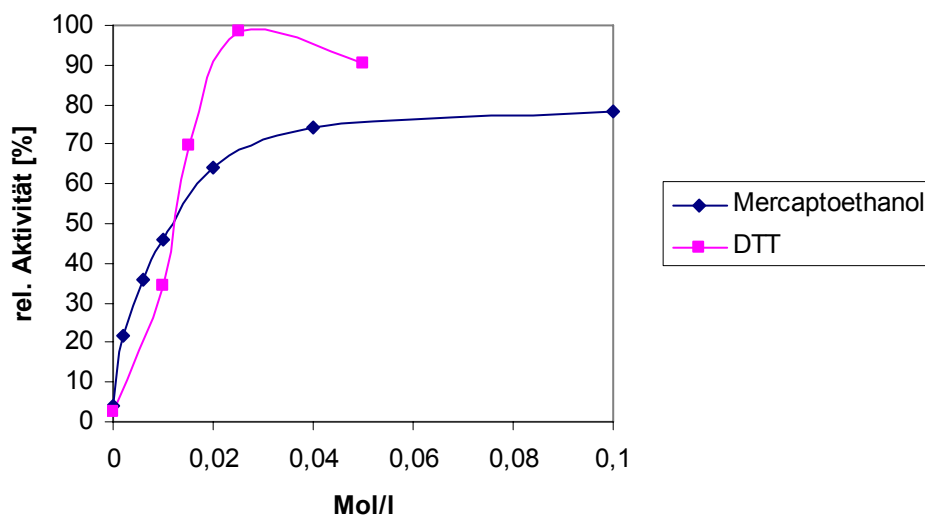


Abbildung 51: Vergleich der Aktivitätssteigerung von DTT und Mercaptoethanol

Mercaptoethanol erreicht selbst in höheren Konzentrationen nur etwa 78% der maximalen Aktivität.

3.12. Untersuchung des ORFs RPMI01263

3.12.1. Klonierung von RPMI01263 aus *P. miotherma* in *E. coli*

Die Isolierung des Templates für RPMI01263 erfolgte aus der genomischen DNA von *P. miotherma* mit Hilfe von Amplifikation durch PCR. Die verwendeten Primer waren 24 bzw. 27 bp lang.

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')
1263_for+400	ggg tag tgg ctc ctg agg aga tat
1263_rev+200	ggg gat cgt tgg aga aaa ttg taa tga

Der PCR-Ansatz wurde, wie schon in 3.10.1 beschrieben, gewählt, ebenso wie die PCR-Bedingungen.

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')
1263_720_for_gen	ggg <u>cat atg</u> aca gct atc aag tta
1263_720_gen_rev	ggg <u>aag ctt</u> cta ttt ttt gct gta gtg ctt

Der PCR-Ansatz wurde bei den angegebenen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde das 1,4 kb PCR-Produkt auf einem 0,8 %igen Agarose-Gel aufgetrennt und aus dem Gel herausgeschnitten und extrahiert. Dieses wurde nun mit dem *EcoRV* geschnittenen pBSK⁺-Vektor ligiert und in *E. coli* XL1blue transformiert. Nach Blau-Weiß-screening wurde ein Klon mit korrekt inseriertem PCR-Fragment ausgewählt und unter Verwendung der neu eingefügten Schnittstellen *NdeI*/*HindIII* in den Vektor

pET24c kloniert (Abbildung 52). Dieses neue Konstrukt wurde nun zur heterologen Expression in den Stamm *E. coli* BL21 elektroporiert.

3.12.2. Klonierungsstrategie

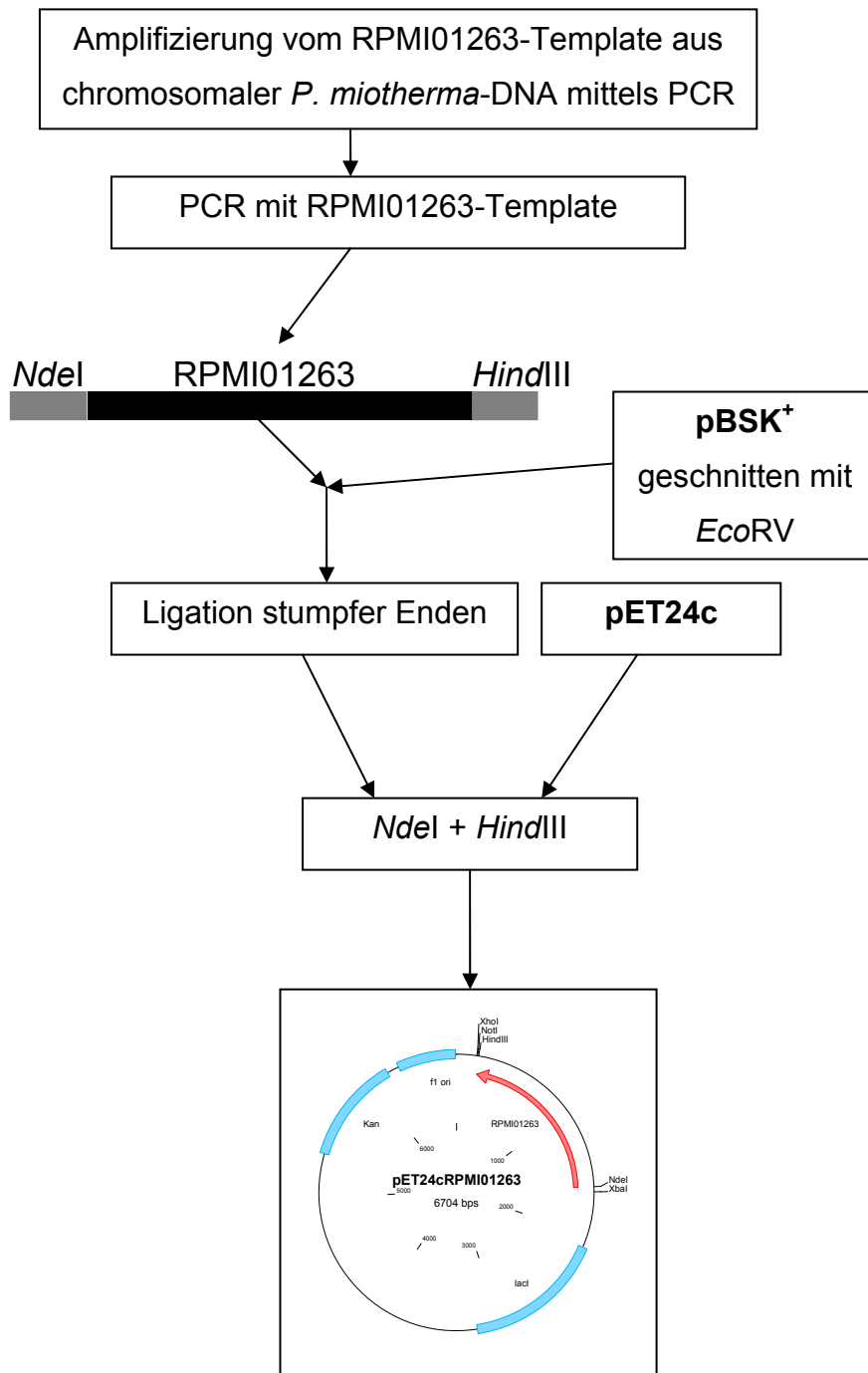


Abbildung 52: Klonierungsstrategie für *P. miotherma* ORF RPMI01263

3.12.3. Anzucht und Herstellung eines Rohextraktes

Für eine Charakterisierung wurde RPMI01263 im präparativen Maßstab gewonnen. Hierfür wurden 1,5 l LB_{Kan} mit 30 ml Inokulum angeimpft und bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 mit 0,5 mM (Endkonzentration) IPTG induziert. Danach wurde über Nacht unter kräftiger Belüftung bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 7000 Upm in GS3-Bechern geerntet, in 20 mM Tris-HCl pH 7 aufgenommen und mittels einer French Pressure Cell aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 14000 rpm abzentrifugiert und der Überstand anschließend 15 min bei 60°C denaturiert. Bei dieser Hitzefällung wurden ein Großteil der Wirtsproteine zerstört, und das hitzestabile Enzym blieb bei der anschließenden Zentrifugation bei 14000 rpm im Überstand.

3.12.4. Aufreinigung des von RPMI01263 kodierten Enzyms mittels FPLC

Der Überstand aus der Hitzefällung wurde sterilfiltriert und anschließend an einem Anionentauscher Source 15Q aufgereinigt.

Parameter

Medium :	Source 15 Q
Säule :	XK 26
Säulenvolumen :	50 ml
Puffer A :	20 mM Tris-Cl pH 7
Puffer B :	20 mM Tris-Cl pH 7, 1M NaCl
Flußrate :	10 ml/min
Fraktion :	10 ml
Equilibrierung :	2 SV Puffer B, 10 SV Puffer A
Gradient :	siehe Elutionsprofil

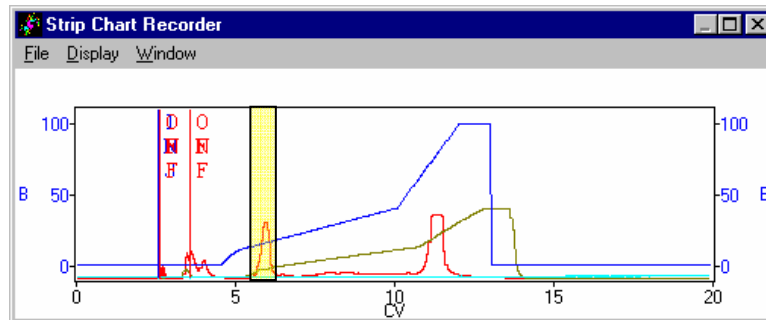


Abbildung 53: Chromatogramm des Source 15Q-Laufs, blau: Gradient, grün: Leitfähigkeit, rot: Proteinkonzentration (aktive Fraktionen gelb hinterlegt)

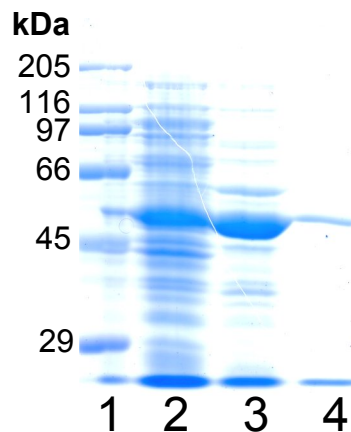


Abbildung 54: SDS-PAGE der Reinigungsschritte von RPMI01263 (Spur 1: Marker, Spur 2: Rohextrakt, Spur 3: hitzegefällter Rohextrakt, Spur 4: Source 15Q-Pool)

3.12.4.1. Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad von RPMI01263

Wie schon in 3.3.1 beschrieben, wurde der Oligomerisierungsgrad mittels Gelfiltration ermittelt. Hierfür wurde eine Superose-6-Gelfiltrationssäule der Firma Pharmacia verwendet. Für RPMI01263 erhielt man ein Elutionsvolumen von 15,70 ml; mit der aus der Regressionsgraden abgeleiteten Formel:

$$\log \text{MW [kDa]} = -1,2767 \cdot K_{av} + 5,9996$$

errechnete sich daher für das native Enzym eine Molekularmasse von 228 kDa. Das entspricht etwa der fünffachen Masse der aus dem SDS-Gel abgeleiteten Größe von

55,5 kDa. Somit kann davon ausgegangen werden, daß die putative α -Glukosidase als Tetramer vorliegt.

3.12.5. Substratspektrum

Ein breit angelegtes Screening (2.4.3.4) mit verschiedenen α -, β -Substraten und unterschiedlichem Oligomerisierungsgrad zeigte, daß von ORF RPMI00720 kodierte Enzym genauso wie AgIA aus *T. maritima* (Raasch et al., 2001), sowohl α -galaktosidische, als auch α -glukosidische Bindungen spalten kann. Wie bei AgIA wurde eine höhere Aktivität gegenüber α -glukosidischen Verknüpfungen festgestellt. Die Aktivität gegenüber pNP- α -Gal lag nur bei 60 %.

Substrate	1263
Polymere	
β -Dextran, Glycogen, Dextran, Amylopectin Stärke	-
Maltoologosaccharide	
Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose, Maltoheptaose	-
Cyclodextrine	
γ -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin, α -Cyclodextrin	-
Disaccharide	
Maltose	+
Raffinose	+
Saccharose	+
Cellobiose	-
Melibiose	+
Lactose	-
Synthetische Substrate	
pNP- α -D-Glukose	+
pNP- β -D-Glukose	-
pNP- α -D-Galaktose	+
pNP- β -D-Galaktose	-

3.12.6. Enzymkinetik

Für die Ermittlung der kinetischen Daten von RPMI01263 wurde die Aktivität des Enzyms mit steigender Konzentration (2.4.2.9) an pNP- α -Glu bestimmt (Abbildung 55). In folgenden Abbildungen finden sich die entsprechenden Michaelis-Menten-, Lineweaver-Burke- und Eadie-Hofstee-Auftragungen zur Berechnung von K_m und V_{max} .

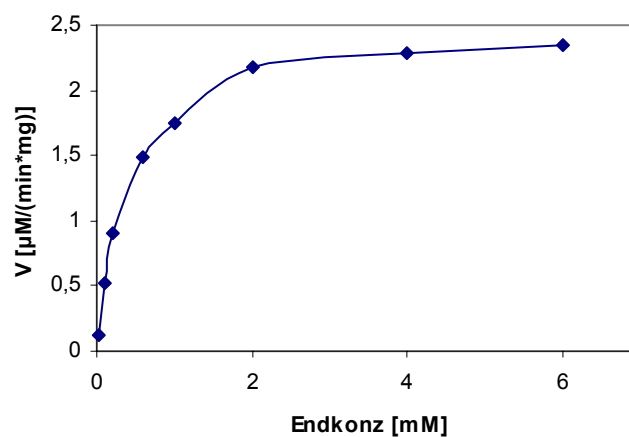


Abbildung 55: Abhängigkeit der Aktivität von der pNP- α -Glu-Konzentration (Michaelis-Menten-Diagramm)

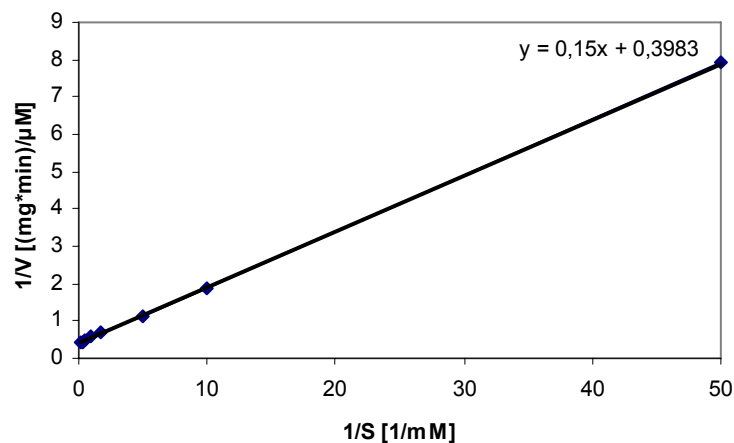


Abbildung 56: Darstellung der Daten aus Abbildung 55 als Lineweaver-Burke-Diagramm

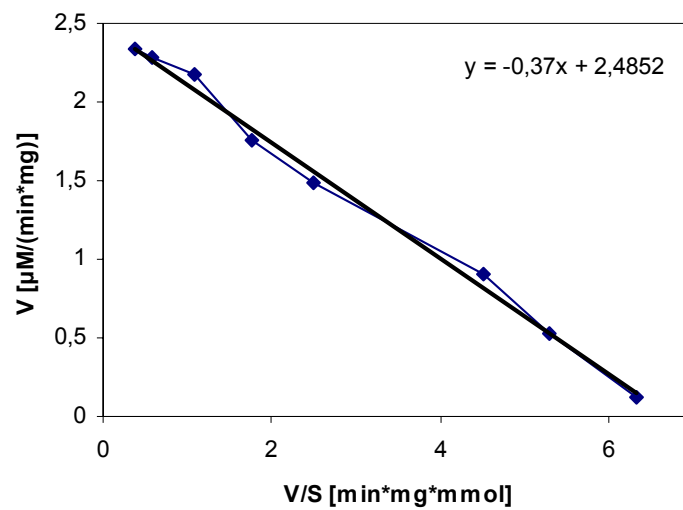


Abbildung 57: Darstellung der Daten aus Abbildung 55 als Eadie-Hofstee

Tabelle 15: Zusammenfassung der kinetischen Daten

	Lineweaver-Burke	Eadie-Hofstee
K_m	0,40 mM	0,37 mM
V_{max}	2,51 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$	2,49 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$

3.12.7. Biochemische Charakterisierung

3.12.7.1. Bestimmung des pH-Optimum

Hierfür wurde die Aktivität der α -Glukosidase mit pNP- α -Glu in einem pH-Bereich zwischen 5,5 und 10 bestimmt (2.4.3.1). Es wurden folgende Puffer für die verschiedenen pH-Bereiche verwendet: Natriumsuccinat (pH 5.5-7.0), HEPES (pH 7.0-8.5), 3-(cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure (CAPS; pH 9.0-10). Die Puffer wurden bei 60°C eingestellt.

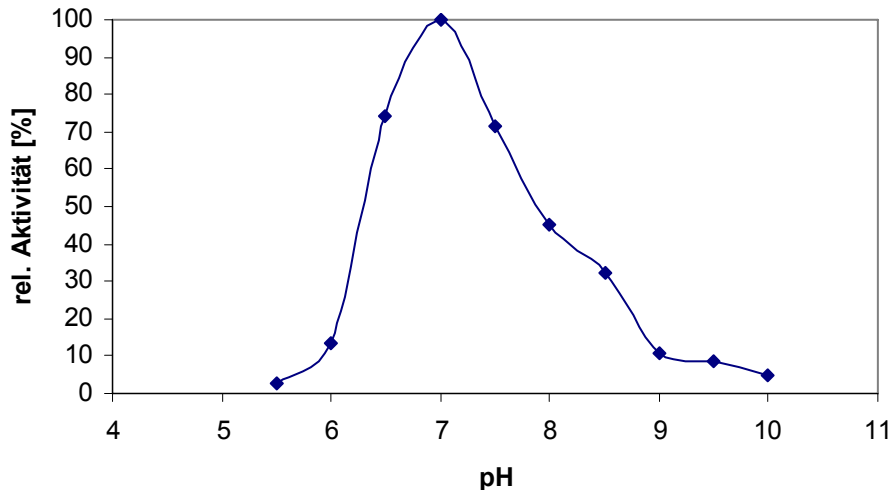


Abbildung 58: Bestimmung des pH-Optimums von RPMI01263

Es zeigte sich ein pH-Optimum bei einem pH-Wert von 7, wobei alle Messpunkte prozentual in Relation zur höchsten Aktivität gesetzt wurden.

3.12.7.2. Bestimmung des Temperaturoptimums

Analog zur Messung der optimalen Aktivität in Abhängigkeit der H^+ -Ionenkonzentration, wurde in diesem Fall der Temperaturbereich gesucht, in dem das Enzym seine höchste Aktivität an pNP- α -Glu entfaltet (2.4.3.2).

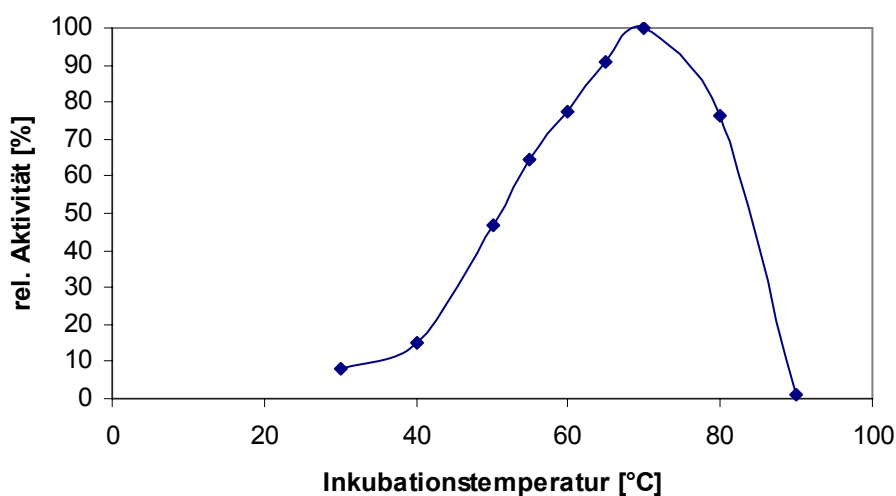


Abbildung 59: Bestimmung des „Temperaturoptimums“ der RPMI01263-kodierten α -Glukosidase

Die höchste Aktivität hatte das Enzym bei 70°C. Alle nachfolgenden Tests wurden dann bei 60°C durchgeführt. Eine Inkubationstemperatur von 10°C unter dem Temperaturoptimum sollte verhindern, daß das Enzym während der Aktivitätsbestimmung zu stark inaktiviert wurde und somit die Messung verfälschte.

3.12.7.3. Bestimmung der Thermostabilität

Es wurde wie unter 3.11.5.5 beschrieben vorgegangen. Die Ansätze wurden bei den entsprechenden Temperaturen vorinkubiert. Dabei wurden jeweils 10 µg Enzym pro Messung eingesetzt. Die Vorinkubation erfolgte bei 40, 50, 60, 70, 80 und 90°C. Das Ergebnis der thermischen Inaktivierung ist in Abbildung 60 dargestellt.

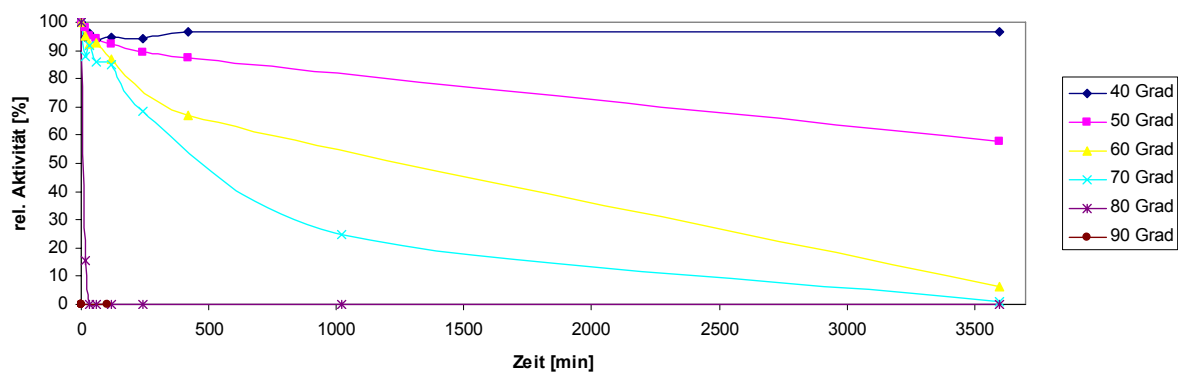


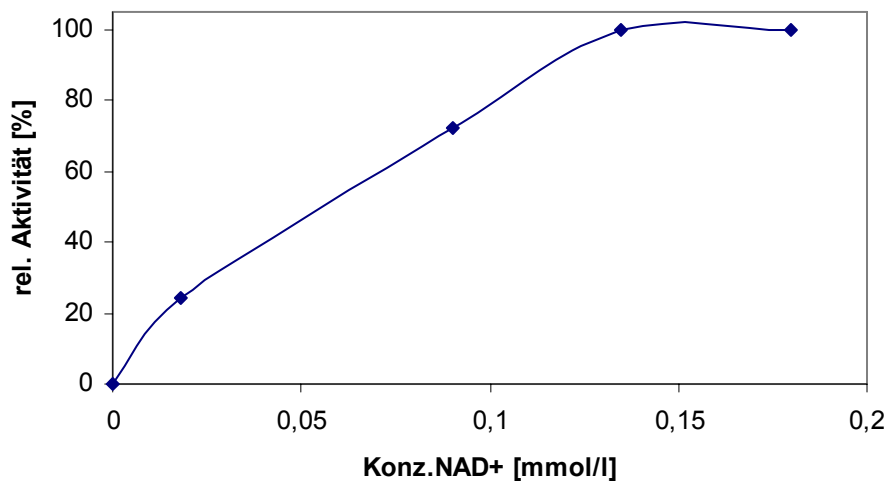
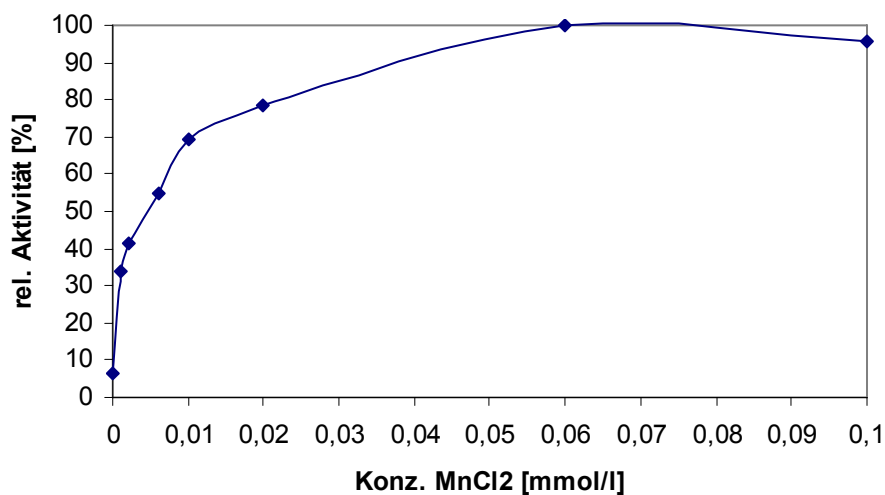
Abbildung 60: Temperaturinaktivierung

Wie aus Abbildung 60 hervorgeht, wurde die Aktivität nach über sieben Stunden bei 50°C fast nicht beeinträchtigt. Bei Temperaturen über 60°C tritt jedoch nach zwei Stunden ein zügiger Aktivitätsverlust ein.

3.12.7.4. Abhängigkeit der RPMI01263- α -Glukosidase von Cofaktoren

Die von RPMI00720 abgeleitete Aminosäuresequenz weist die typischen konservierten Bereiche vor, wie alle Enzyme der GHF4. Dementsprechend wurde für das Enzym die Abhängigkeit von den für die GHF4-Enzyme üblichen Cofaktoren festgestellt (2.4.2.10). Optimale Aktivität wurde bei folgenden Konzentrationen der Cofaktoren erreicht:

NAD ⁺	0,9 mM
DTT	0,25 M
Mn ²⁺	0,6 mM
Tris-HCl pH 7 ^{60°C}	0,1 M



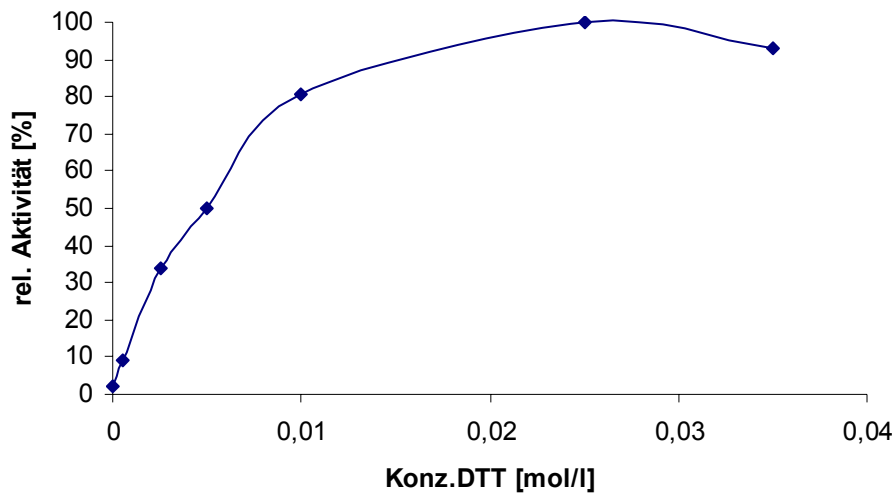


Abbildung 61: Effekt der Konzentration von NAD^+ , Mn^{2+} und DTT auf die Aktivität von gereinigtem RPMI01263. Zur Messung wurde die Konzentration des jeweiligen Parameters variiert, während die beiden anderen Cofaktoren in optimaler Konzentration zugesetzt wurden.

Für die volle enzymatische Aktivität war die Anwesenheit aller drei Cofaktoren notwendig. Fehlte auch nur eine der drei Komponenten Mn^{2+} , NAD^+ oder DTT so war ein dramatischer Einbruch der maximalen Aktivität zu verzeichnen.

Weitere Tests mit zweiwertigen Ionen (Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} und Fe^{2+}) zeigten keine signifikante Aktivität.

DTT zeigte eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber Mercaptoethanol. Im folgenden Diagramm (Abbildung 62) sind beide Reduktionsmittel gegenübergestellt.

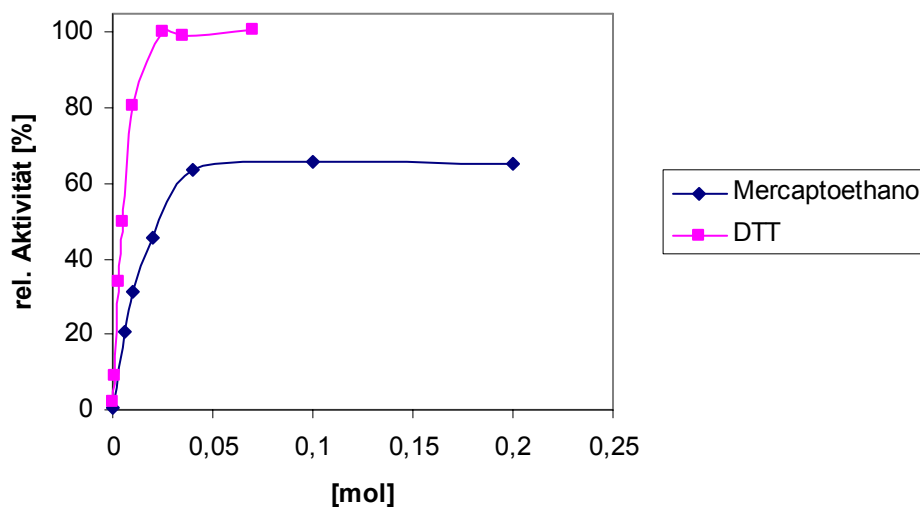


Abbildung 62: Gegenüberstellung von DTT und Mercaptoethanol

Mercaptoethanol erreicht selbst in höheren Konzentrationen nur etwa 65% der Aktivität.

3.13. ESR-Untersuchungen an *E. coli* MelA und das in ORF RPMI01263 kodierte Enzym

Die Elektronenspinresonanz handelt von der Wechselwirkung von elektromagnetischer Strahlung mit magnetischen Momenten von Elektronen und Kernen in Materie. Vieles über die Struktur von Molekülen entstammt dem Studium von Absorptionsspektren. Solche Spektren werden erhalten, wenn man die Dämpfung einer elektromagnetischen Welle, die Materie durchdringt, als Funktion der Frequenz misst. Jede Absorptionslinie im Spektrum entspricht einem Übergang zwischen zwei Energiezuständen der absorbierenden Spezies. Die Frequenz der Linie misst den Energieabstand. Nur wenige aller möglichen Übergänge werden tatsächlich beobachtet. Geführt durch eine geeignete Theorie und entsprechende Auswahlregeln kann aus einem beobachteten Spektrum auf die Struktur geschlossen werden.

In den weitaus meisten Fällen rührt das magnetische Moment des Elektrons überwiegend von seinem Spin her, und die Bahnbewegung liefert nur einen kleinen Beitrag zum gesamten magnetischen Moment. Ein wichtiger Vorteil der ESR ist dabei, daß bei ungepaartem Elektronenspin die Moleküle nur in ihrem elektronischen Grundzustand untersucht werden müssen.

Folgende Systeme sind Gegenstand von ESR Untersuchungen:

- Freie Radikale in Festkörpern, Lösungen und Gasen, z.B. Spin-Label
- Übergangsmetallionen, z.B. in Enzymen
- Punktdefekte in Festkörpern, z.B. Farbzentren

Systeme mit mehreren ungepaarten Elektronen: Triplettzustände, Biradikale

In biologischen Systemen treten paramagnetische Spezies in vielfältiger Form auf, beispielsweise als Übergangsmetallkomplexe, als Zwischenprodukte bei Elektronenübertragungsmechanismen oder als Folgeprodukte von Biomolekülen, die mit Licht oder ionisierender Strahlung geschädigt wurden.

Bei bisherigen Untersuchungen zum Mechanismus der Bindungsspaltung bei den GHF4-Enzymen konnte die Rolle des Mangans noch nicht genau geklärt werden. Bei GlvA aus *B. subtilis* konnte Mangan im Kristall in der Nähe des aktiven Zentrums nachgewiesen werden und ein Mechanismus davon abgeleitet werden (Shyamala et al, 2004). Mangan verlässt in diesem Mechanismus seinen oktaedrischen Komplex mit H₂O. Der Mangan-H₂O-Komplex besitzt ein sehr eindeutiges ESR-Spektrum (Abbildung 63).

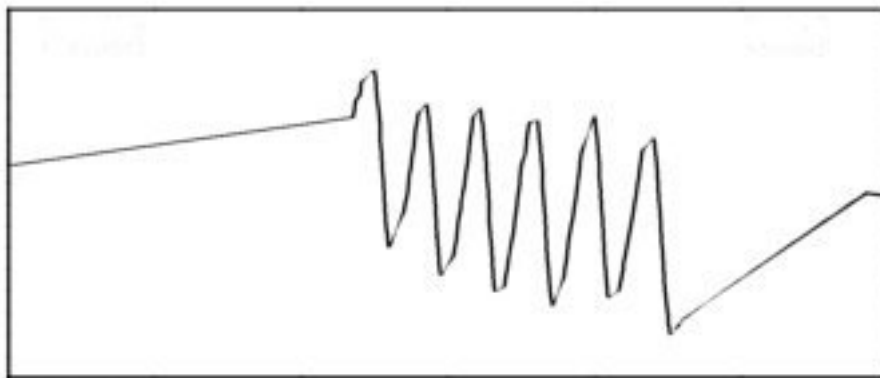


Abbildung 63: ESR-Spektrum von [Mn(H₂O)₆]²⁺ bei 180K

Bei unseren Messungen sollte nun untersucht werden, ob das Mangan diesen Komplex verlässt und vollständig im Enzym gebunden ist. Für diese Testreihe wurden die Enzyme MelA aus *E. coli* und die in ORF RPMI01263 kodierte α -Glukosidase ausgewählt. In Vorversuchen wurden die einzelnen Cofaktoren und Puffer einzeln und in Kombination gemessen, um diese Koordinationen auszuschließen. Zunächst wurde jeweils ein 1:1-Verhältnis von Enzym und Mangan gemessen, um es anschließend mit den Spektren zu vergleichen, in denen das jeweilige Enzym im Überschuss vorhanden ist (Abbildung 64, Abbildung 65).

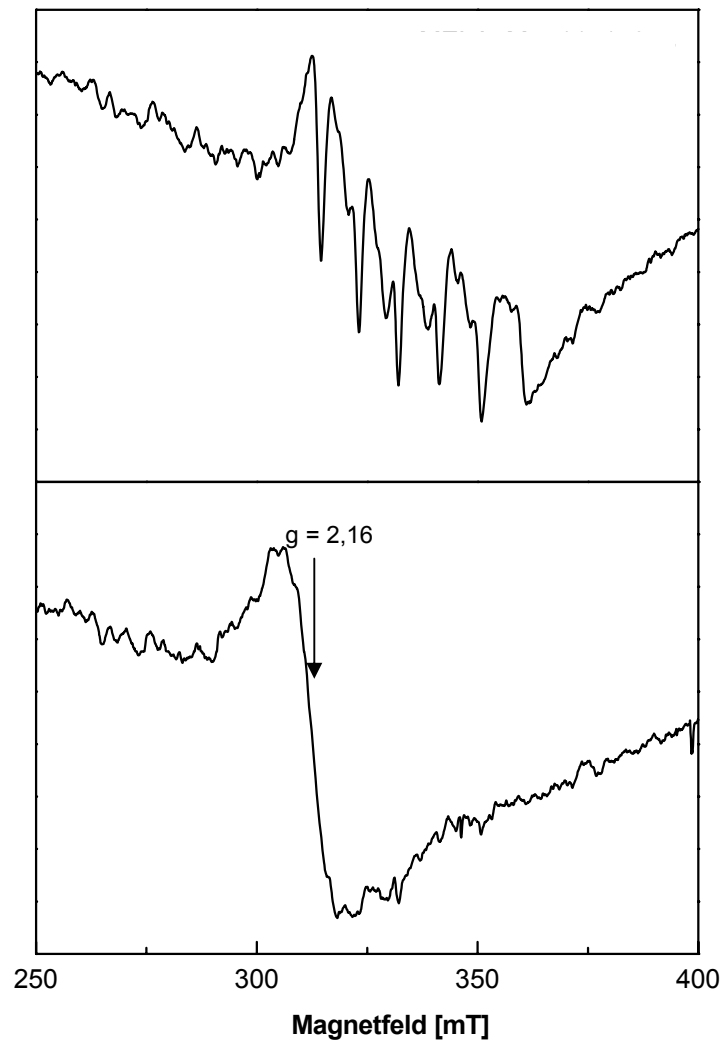


Abbildung 64: ESR-Spektren von MeIA. Oben: (1:1 Verhältnis Mn zu Enzym (MeIA, 40 mg/ml) 91 μ l, $MnCl_2$ [10 mM] 14 μ l, NAD [0,6 mM] 88 μ l, pNP- α -Gal [0,1 M] 10 μ l, unten: (1:0,25 Verhältnis Mn zu Enzym (MeIA, 40 mg/ml) 191 μ l, $MnCl_2$ [10 mM] 3,5 μ l, 176 μ l NAD [0,6], pNP- α -Gal [0,1 M] 20 μ l).

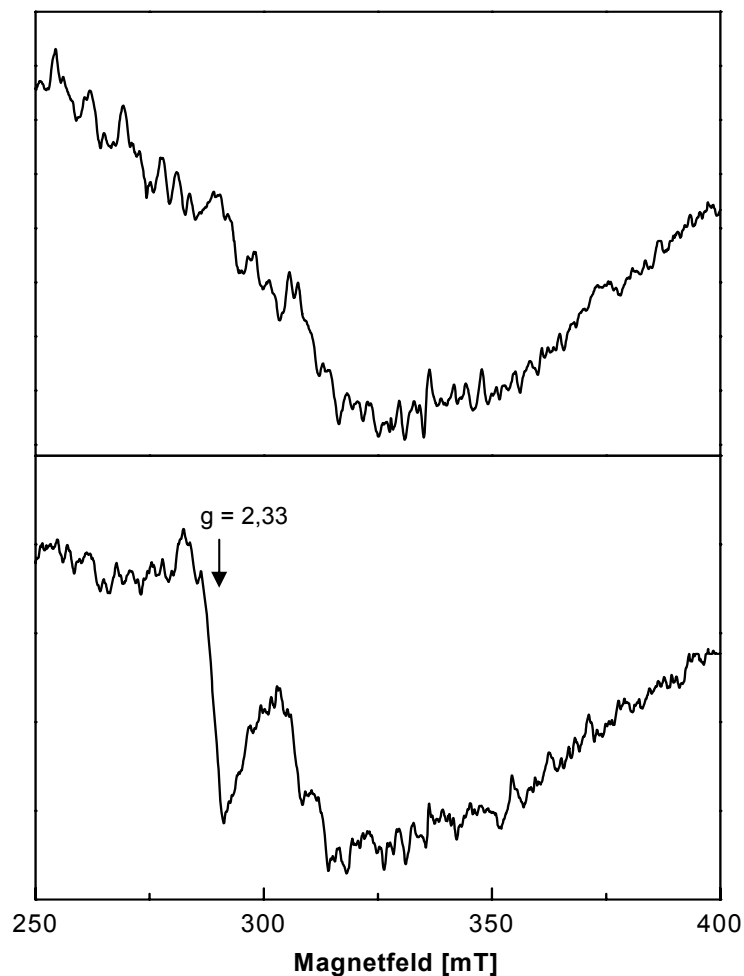


Abbildung 65: ESR-Spektrum des in ORF RPMI01263 kodierten Enzyms, oben: 196 μl Enzym [28,5 mg/ml], 1 μl MnCl_2 [10 mM], 5 μl NAD^+ [0,6 mM], 5 μl DTT [0,25 M], 5 μl pNP- α -Glu [0,1 M], unten: 196 μl Enzym des ORFs RPMI01263 [28,5 mg/ml], 0,5 μl MnCl_2 [10 mM], 5 μl NAD^+ [0,6 mM], 5 μl DTT [0,25 M], 5 μl pNP- α -Glu [0,1 M]

Bei schrittweiser Zugabe von Enzym ist zu sehen, daß sich das typische Manganspektrum zurückbildet. Beim Konzentrationsverhältnis von 1:4 im Falle von MelA und beim Konzentrationsverhältnis 1:2 im Falle der α -Glukosidase aus *P. miotherma* zeigt sich schließlich ein völlig neues ESR-Signal, das nicht mehr aus dem ursprünglichen Spektrum eines $[\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ -Komplexes abzuleiten ist. Eine weitere Veränderung des Konzentrationsverhältnisses Mangan-Enzym führt nur noch zu einer Signalabschwächung. Gleichzeitig wird auch die Messgenauigkeit erreicht. Niedrigere Konzentrationen entzogen sich hierdurch einer weiteren Untersuchung.

Weiterhin wurde das Enzym AgIA aus *T. maritima* unter optimalen Konzentrationen der entsprechenden Cofaktoren (Raasch et al., 2001) gemessen (Abbildung 66).

Ansatz:	Enzym (AgIA)	7 mg/ml	10 μ l
	MnCl ₂	10 mM	20 μ l
	NAD ⁺	9 mM	20 μ l
	DTT	1M	10 μ l
	Tris-Cl	0, 5 M	20 μ l
	Glycerin	99, 9 %	110 μ l
	pNP- α -Glu	0, 1 M	10 μ l

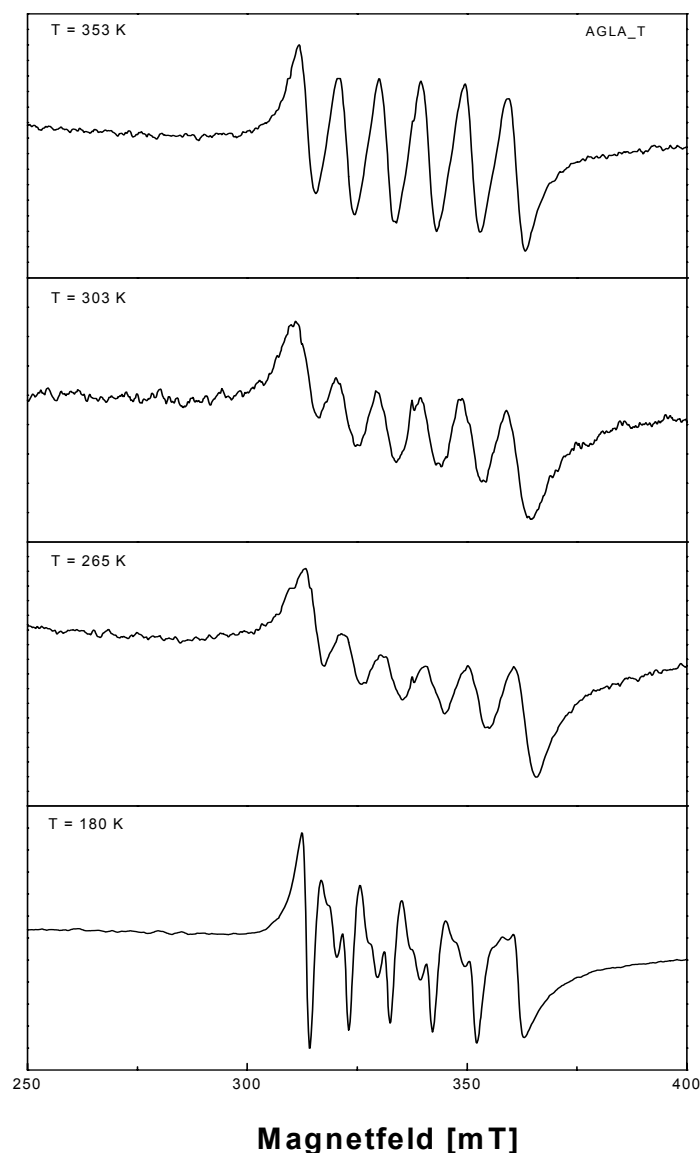


Abbildung 66: ESR-Spektrum des physiologischen Ansatzes bei den Temperaturen: 180 K, 265 K, 303 K, 353 K.

Dieser Ansatz wurde bei steigenden Temperaturen gemessen. Bei der Temperaturshift zeigt sich, daß die Feinstruktur des Spektrums aufgehoben wird. Bei einer Temperatur von 180 K sind die beteiligten Reaktanten in einer Matrix eingefroren. Bei höheren Temperaturen treten Diffusionseffekte auf. Durch die stärkere Molekularbewegung wird die Feinstruktur des ESR-Signals undeutlicher. Trotzdem sind noch anisotrope Effekte zu erkennen, woraus abgeleitet werden kann, daß der ideale oktaedrische Komplex zugunsten eines verzerrten oktaedrischen Komplexes aufgegeben wurde.

4. Diskussion

4.1. Einordnung der O-Glukosidasen

Bei den O-Glukosidasen handelt es sich um eine sehr umfangreiche Gruppe von Enzymen, die sowohl zwischen zwei und mehr Kohlenhydratbausteinen, als auch zwischen Kohlenhydrat- und Nichtkohlenhydratbausteinen die glykosidische Bindung hydrolysieren. Eine bestehende Enzymnomenklatur (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology* → IUB-MB) beschränkte sich lediglich auf eine Einteilung der Glykosylhydrolasen, die sich an ihrer Substratspezifität und teilweise ihrem molekularen Mechanismus orientierte. Eine neue Datenbank (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) verfeinert die Kriterien zur Einordnung der Enzyme in einzelne Familien, den Glykosidhydrolase Familien (GHF) (Henrissat et al., 1991; Henrissat et al., 1993; Henrissat et al., 1996 und Henrissat et al., 1995). Sie unterteilen sich zurzeit in 99 Familien. Hier werden Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz zugrunde gelegt. Welches Vorteile gegenüber der alten Klassifizierung hat. Die strukturellen Eigenschaften der Enzyme treten in den Vordergrund und man kann die evolutionären Beziehungen unter den Enzymen aufdecken. Weiterhin ist es möglich, Erkenntnisse über den Mechanismus auf andere strukturell ähnliche Enzyme zu übertragen. In dieser Arbeit wurden fünf Enzyme der GHF4 untersucht.

4.2. Glukosidasen der GHF4

Die Mitglieder der GHF4 zeichnen sich durch hochkonservierte Bereiche der Aminosäuresequenz und einen ungewöhnlichen Bedarf an Cofaktoren aus. Alle Mitglieder der Familie 4 sind NAD^+ -abhängig und besitzen N-terminal gelegen eine hochkonservierte Sequenz Gly-Xxx-Gly-Ser (GXGS). Dieses Motiv hat große Ähnlichkeit mit dem sogenannten Rossmann-Fold, bestehend aus einer alternierenden Abfolge von β -Strängen und α -Helices ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$), die eine konservierte strukturelle Region für die Bindung eines Cofaktors in Proteinen darstellt. Im klassischen Rossmann-Fold Motiv ist eine glycinreiche Sequenz innerhalb des ersten β -Strangs wichtig (GXGXXG), die über eine Schleife den ersten β -Strang mit der folgenden α -Helix verbindet. Durch gezielte Mutation konnte nachgewiesen werden,

daß das GXGS-Motiv der GHF4 maßgeblich an der NAD⁺-Bindung beteiligt ist (Armbrecht et al., 2002). Zusätzliche Daten aus der Kristallisation von AglA aus *T. maritima* bestätigen, daß NAD⁺ genau in dem Rossmann-Fold-ähnlichen Bereich liegt und bis in das aktive Zentrum reicht (Lodge et al., 2002). Alle bisher untersuchten Mitglieder der GHF4 benötigen zusätzlich ein zweiwertiges Metallion. Dies ist für eine Vielzahl von amylolytischen Enzymen noch nichts Ungewöhnliches, da sie auch Ca²⁺-Ionen für ihre Aktivität benötigen (z.B. α -Amylasen, CGTasen; Janeck, 1997). In dieser Familie werden jedoch vorwiegend Mn²⁺-Ionen benötigt, die in bisherigen Untersuchungen eher zu einer Hemmung der Aktivität geführt haben (Suzuki et al., 1992). Die GHF4 ist die einzige Enzymfamilie, in der die Enzyme sowohl α -, als auch β -spezifische Substrate umsetzen (Thompson et al., 1999). Die Enzyme benötigen für eine vollständige Aktivierung stark reduzierende Bedingungen in Form von DTT oder Mercaptoethanol. Erst vor kurzem konnte ein vermutlicher Mechanismus für die Enzyme der GHF4 vorgeschlagen werden (Shyamala et al., 2004). Bei GlvA aus *B. subtilis* geht man davon aus, daß die 6-Phospho- α -glukosidase unter Retention ein Wasserstoffatom an C2 aus dem umgebenden Wasser einbaut. Hierfür wird das O3 durch NAD⁺ oxidiert, dadurch wird das Wasserstoffatom H2 deutlich azider und Tyr265 kann es abstrahieren. Zusätzlich polarisiert Mn²⁺ die Bindung über eine Koordination mit dem Keto-Sauerstoff. Anschließend folgt eine Elimination und ein 1,2-ungesättigter Michaelakzeptor entsteht als Intermediat. Dieser wird von H₂O angegriffen und das C3-Keton kann durch das NADH wieder reduziert werden. Die Retention an C1 des Zuckers erfolgt wieder über Tyr265, welches seinen abstrahierten Wasserstoff wieder an C2 zurückbindet und damit ein Angriff des Wassers nur von der α -Seite erfolgen kann, koordiniert über Asp172.

Dies alles ist nur möglich, weil bei der Reaktion Mn²⁺ durch seine Koordination die Reaktanten in den entsprechenden Positionen hält. Dieser Befund stützt sich einerseits auf die Daten der Kristallisation und zusätzlich auf NMR-Messungen, bei denen ein Protonenaustausch an C2 gegen ein Deuteriumatom nachgewiesen werden konnte (Shyamala et al., 2004). Das 2-[²H]-D-Glukose-6-phosphat entstand nur bei enzymatischer Umsetzung und nicht bei Kontrollexperimenten ohne Enzym. Dieser Mechanismus konnte die Rolle des DTT und Mercaptoethanol nicht klären.

4.3. Enzymaktivitäten der GHF4

4.3.1. Optimierte Aufreinigung und Charakterisierung von Mela aus *E. coli*

Bereits 1971 konnten Burnstein und Kepes nachweisen, daß die α -Galaktosidase Mela aus *E. coli* eine ungewöhnliche Kombination der Cofaktoren NAD^+ , Mn^{2+} und stark reduzierenden Bedingungen in Form von DTT oder Mercaptoethanol benötigt. Damit begründete Mela eine neue Enzymfamilie, die Glycosidhydrolase-Familie 4 (GHF4). Mela liegt in einem Gencluster, der für Enzyme kodiert, die maßgeblich für den Transport von Melibiose in die Zelle zuständig sind und weiterhin für Enzyme kodiert, die in den Kohlenhydratabbau eingebunden sind (Abbildung 67). Durch seine hohe Instabilität entzog sich das Enzym einer Charakterisierung (Tamai et al., 1988). Es erfolgte lediglich eine Teilcharakterisierung im Rohextrakt. Um eine möglichst schnelle Aufreinigung zu gewährleisten, wurde es im Zuge dieser Arbeit mit einem 6x His tag kloniert. Wie schon in 3.2 beschrieben, ließ sich keine reproduzierbare Anfangsaktivität messen. Erst nachdem das Standardlösungsmittel DMSO gegen H_2O ersetzt wurde, konnten stabile Werte ermittelt werden. Dies schien durch eine starke Koordination von DMSO an das Substrat erschwert worden zu sein, wodurch eine schnelle Freisetzung des Substrates verhindert worden zu sein scheint. Dies könnte mit der relativ hohen Viskosität begründet sein, die DMSO bei Temperaturen um 37°C zeigt. Dieser Effekt trat bei den thermophilen Assays nicht auf, die bei Temperaturen von 60°C durchgeführt wurden. Trotzdem verlor das Enzym innerhalb weniger Stunden irreversibel seine Aktivität. Erst durch Zugabe eines oder mehrerer Cofaktoren ließ sie sich konservieren (Thompson et al., 1999). NAD^+ und Mn^{2+} konnten bereits im aktiven Zentrum im Rahmen von Kristallisationsversuchen nachgewiesen werden (Thompson et al., 2003; Lodge et al., 2004). Die Cofaktoren koordinieren mit den Cystein im aktiven Zentrum und scheinen es vor Oxidation zu einer Sulfinsäure zu schützen. Erstaunlicherweise zeigten die Reduktionsmittel DTT und Mercaptoethanol allein nicht die Eigenschaft, die Aktivität ähnlich lang zu konservieren. Es ist bisher noch fraglich, ob sie tatsächlich direkt an dem Reaktionsmechanismus beteiligt sind.

Bei der Bestimmung des Oligomerisierungsgrades fiel auf, daß bei teilinaktiviertem Enzym ein zusätzlicher Peak auftrat (3.3.1), der ungefähr dem einfachen der

Molekülmasse von MelA entsprach. Thompson beschrieb einen ähnlichen Sachverhalt (Thompson et al., 1999) und es konnte dem Peak ein Monomer des Enzymoligomers zugeordnet werden. Auch hier spielte die Zugabe von Cofaktoren eine große Rolle. Insbesondere Mangan hatte einen großen Einfluß auf den Oligomerisierungsgrad. In Abwesenheit zerfiel das Molekül relativ schnell in monomere und dimere inaktive Teile des Oligomers. Auch bei MelA verlief der Zerfall parallel mit einem deutlich meßbaren Aktivitätsverlust.

Dazu kommt noch der Befund, daß bei ESR-Versuchen eine deutliche Veränderung der Koordinationsphäre um das Mangan zu beobachten ist. Der oktaedrische Komplex mit H_2O wurde deutlich aufgebrochen. Weiterhin auffällig ist, daß kein anderes zweiwertige Ion eine signifikante Aktivität zeigte und daß ausschließlich galaktosidische Bindungen gespalten werden. Diese hohe Spezifität ist bisher in der GHF4 eher ungewöhnlich, da insbesondere die thermophilen Mitglieder zum Teil sowohl glukosidische, als auch galaktosidische Bindungen spalten und sich durch weitere zweiwertige Ionen aktivieren lassen.

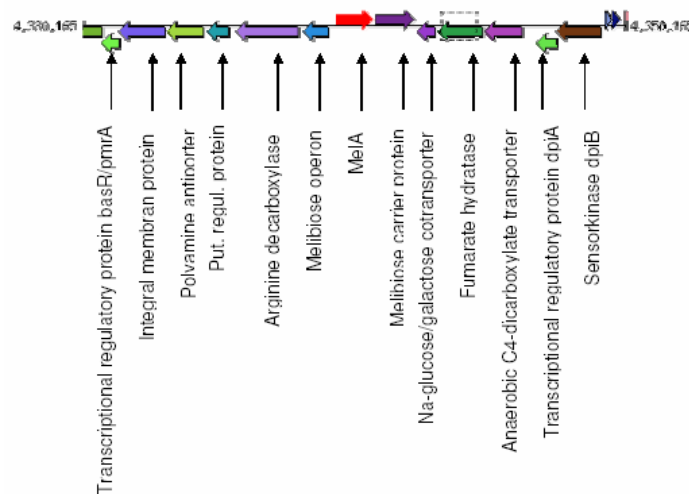


Abbildung 67: Genetisches Umfeld von MelA

4.3.2.putative α -Glukosidase aus ORF RPMI00511 aus *P. miotherma*

Im Gegensatz zu den ORFs RPMI00720 und RPMI01263 von *P. miotherma* ist das ORF RPMI00511 nicht in einem Gencluster lokalisiert, welches für Enzyme, die an der Umsetzung und dem Abbau von Stärke beteiligt sind (Abbildung 68). Es konnte dem Enzym bisher noch kein Substrat zugeordnet werden. Aufgrund seiner hohen Sequenzähnlichkeit zu den Enzymen der GHF4 wurden den Reaktionsansätzen schon die entsprechenden Cofaktoren beigefügt, die für eine optimale Aktivität bei den Enzymen, die durch die ORFs RPMI00720 und RPMI01263 kodiert sind, benötigt wurden. Für die nicht vorhandene Aktivität kann es mehrere Gründe geben. Entweder braucht das Enzym phosphorylierte Substrate, die leider nicht verfügbar waren, oder das Substratspektrum war nicht weit genug gewählt. Weiterhin möglich wäre, daß das Enzym inaktiv vorlag. Die Analyse des Oligomerisierungsgrades zeigte, daß das Enzym, das in RPMI00511 kodiert wird, anscheinend als Pentamer vorliegt, was in dieser Enzymfamilie noch nicht beobachtet wurde. Dieser hohe Grad kann zweierlei bedeuten. Entweder könnte eine falsche Faltung des Proteins vorliegen und darin seine Inaktivität begründet liegen oder das richtige Substrat liegt noch nicht vor, da bisherige Untersuchungen gezeigt haben, daß aktive Enzyme dieser Familie als Oligomer, zumeist als Tetramer, vorliegen

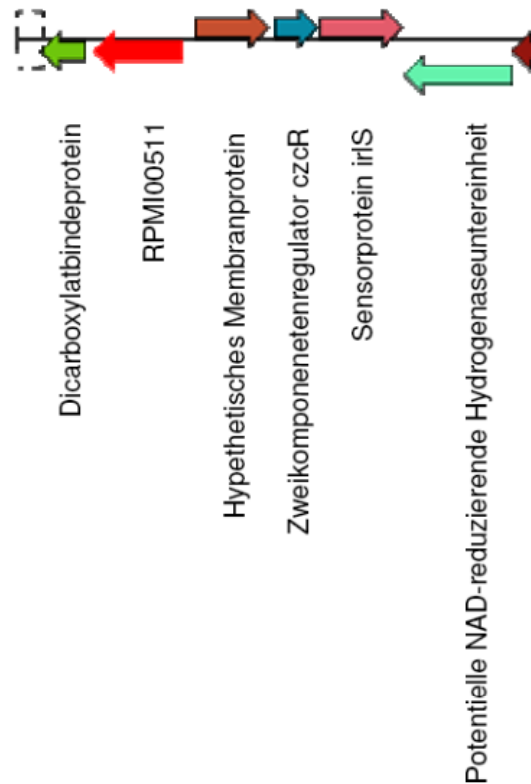


Abbildung 68: Genetisches Umfeld des ORFs RPMI00511

4.3.3.RPMI00720 und RPMI01263 aus *P. miotherma*

ORF RPMI00720 liegt in einem Gencluster, der für Enzyme kodiert, die für den Kohlenhydratabbau und Transport zuständig sind, wohingegen RPMI01263 mehr von ORFs umgeben ist, die für Enzyme kodieren (Abbildung 69, Abbildung 70), die für den Umbau von Kohlenhydraten zuständig sind. RPMI00720 (3.11.5.1) setzt ebenso wie RPMI01263 (3.12.5) sowohl α -glukosidische als auch α -galaktosidische Bindungen um. Beide Enzyme besitzen keine Spezifität in Bezug auf das C4 der Glukose bzw. Galaktose.

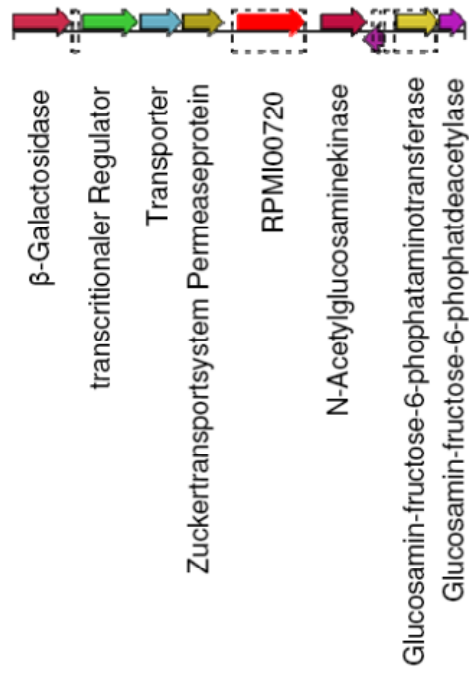


Abbildung 69: Genetisches Umfeld von ORF RPM100720

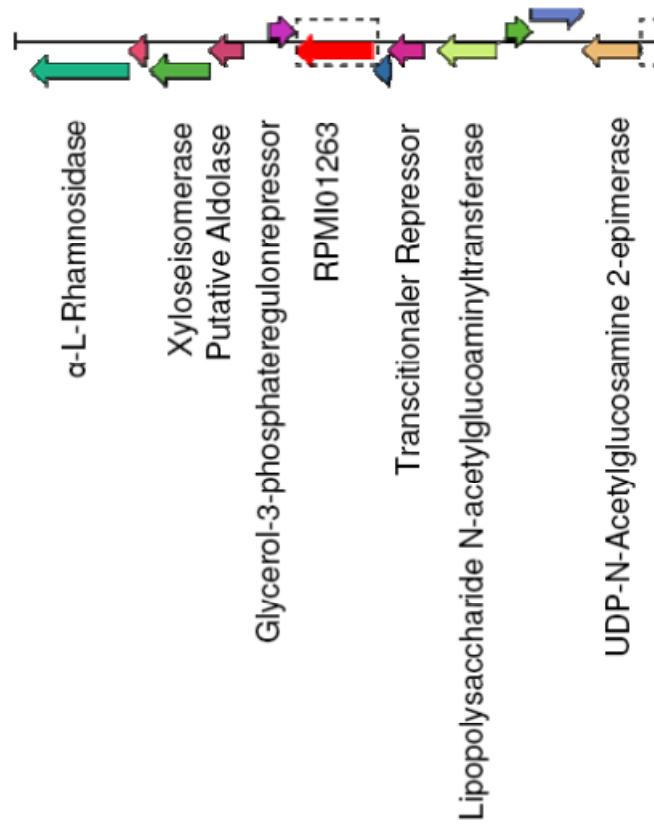


Abbildung 70: Genetisches Umfeld von ORF RPM101263

Bei der Untersuchung zum Oligomerisierungsgrad stellte sich heraus, daß beide Enzyme der ORFs RPMI00720 und RPMI01263, ebenso wie GlvA aus *B. subtilis*, als Tetramer vorliegen, was recht typisch für Vertreter dieser Enzymfamilie ist (Henrissat et al., 1997).

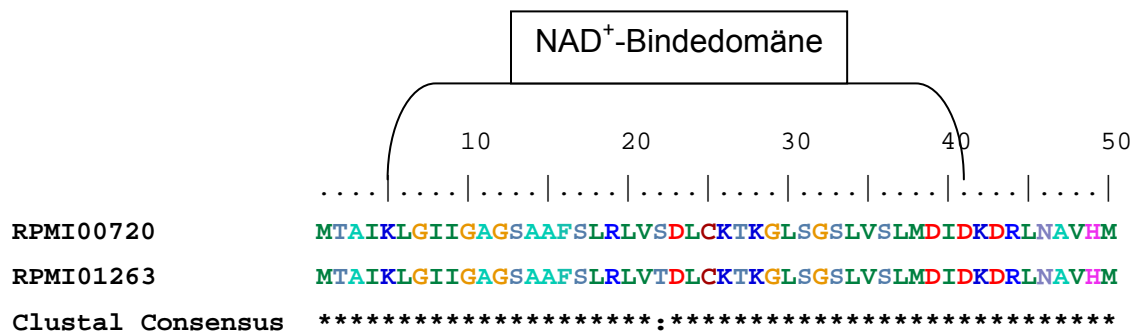


Abbildung 71: Vergleich der Aminosäuresequenzen des NAD⁺-Bindemotivs von den Enzymen aus den ORFs RPMI00720 und RPMI01263

Ein Alignment der beiden ORFs zeigt, daß sie auf Aminosäuresequenzebene eine 98%ige und auf DNA-Sequenzebene noch eine 95%ige Identität besitzen, d.h. sie unterscheiden sich nur in acht Aminosäuren. Dies zeigt sich auch in ihren biochemischen Eigenschaften. Beide Enzyme zeigen gleiches Verhalten gegenüber verschiedenen Substraten, pH und Temperatur (3.11.5, 3.12.7). Sie unterscheiden sich aber in zwei Eigenschaften. Die Unterschiede liegen bei v_{\max} und der optimalen Konzentration an NAD⁺. Obwohl die α -Glukosidase des ORFs RPMI00720 dreimal mehr NAD⁺ für die maximale Aktivität benötigt, ist v_{\max} nur etwa halb so groß wie die aus RPMI01263. Erstaunlich ist der große Unterschied in der optimalen NAD⁺-Konzentration. In der NAD⁺-Bindedomäne gibt es nur einen Aminosäureaustausch, der anscheinend einen großen Einfluß auf die Bindeeigenschaften hat. AgIA aus *T. maritima* und die α -Glukosidase aus ORF RPMI00720 haben einen identischen Rossmann-Fold. Hingegen ist bei der α -Glukosidase aus ORF RPMI01263 ein Austausch von Serin gegen Threonin zu verzeichnen (Abbildung 71). Trotzdem liegt die optimale NAD⁺-Konzentration bei der α -Glukosidase aus RPMI01263 und AgIA bei 0,9 mM und die α -Glukosidase des ORFs RPMI00720 benötigt eine dreimal höhere Konzentration, nämlich 2,7 mM. Die ORFs RPMI01263 und RPMI00720 besitzen eine so hohe Identität sowohl auf Aminosäureebene als auch auf

genetischer Genebene, daß es sehr wahrscheinlich ist, daß es sich bei den beiden Genen um paraloge Gene handelt, die durch eine Genduplikation entstanden sind.

4.4. Mechanistische Untersuchungen

4.4.1. Fluoreszenz- und Absorptionsspektren

Da die Enzyme der GHF4 NAD^+ für eine vollständige Aktivierung benötigen, sollte ein Redox-Mechanismus für die Spaltung der glykosidischen Bindung zugrunde liegen, bei dem intermediär NADH entsteht. Im Gegensatz zu NAD^+ zeigt NADH zwei sehr herausragende Eigenschaften. Zum einen hat NADH ein sehr eindeutiges Absorptionsspektrum bei 340 nm und zum anderen fluoresziert es bei Anregung mit 340 nm bei 460 nm. Das Absorptionsspektrum von AgIA aus *T. maritima* zeigt ein sehr schwaches Signal bei 340 nm (Abbildung 72).

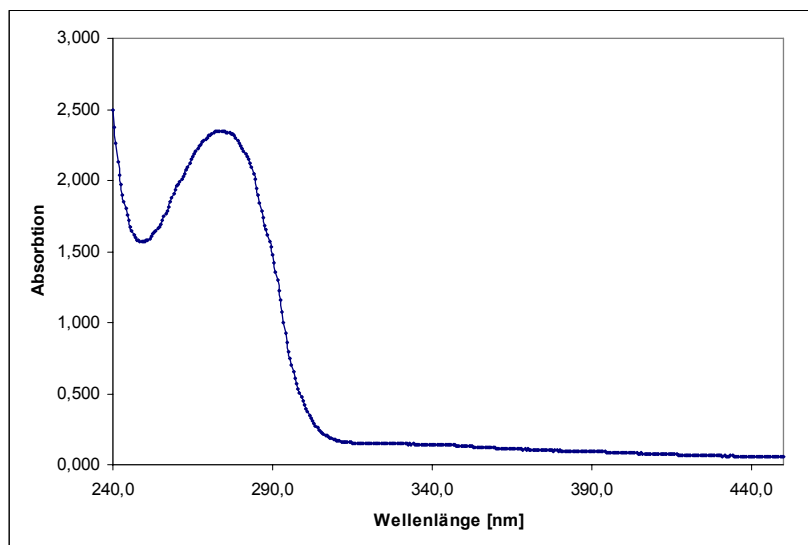


Abbildung 72: Absorptionsspektrum von AgIA aus *T. maritima*

Es scheint in reinem Enzym etwas NADH gebunden zu haben. Weitere Untersuchungen mit Fluoreszenz zeigten, daß das Enzym bei Anregung mit 340 nm ein sehr deutliches Signal bei 460 nm lieferte (Abbildung 73).

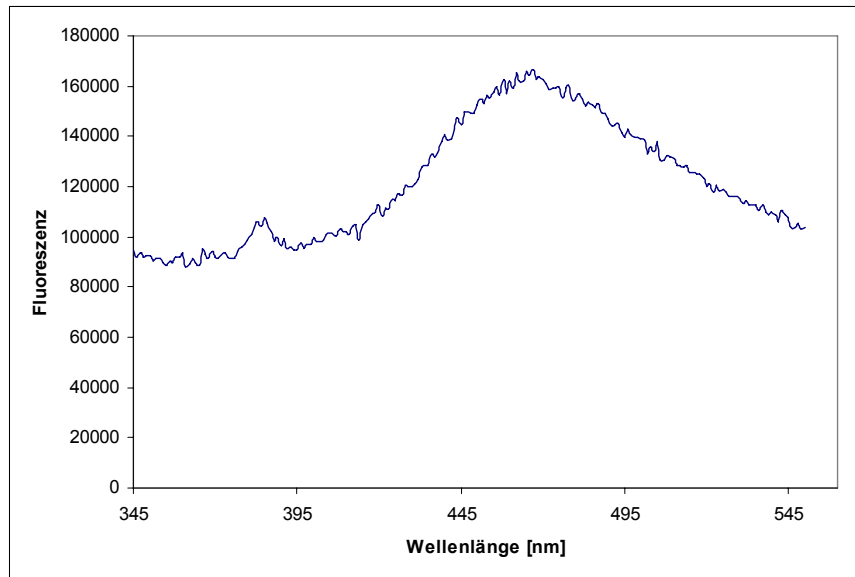


Abbildung 73: Fluoreszenzspektrum von AgIA allein ohne Cofaktoren

Eine äquimolare Menge NADH zu AgIA zeigt eine ca. 20-fach niedrigere Fluoreszenz, als das reine Enzym (Abbildung 74).

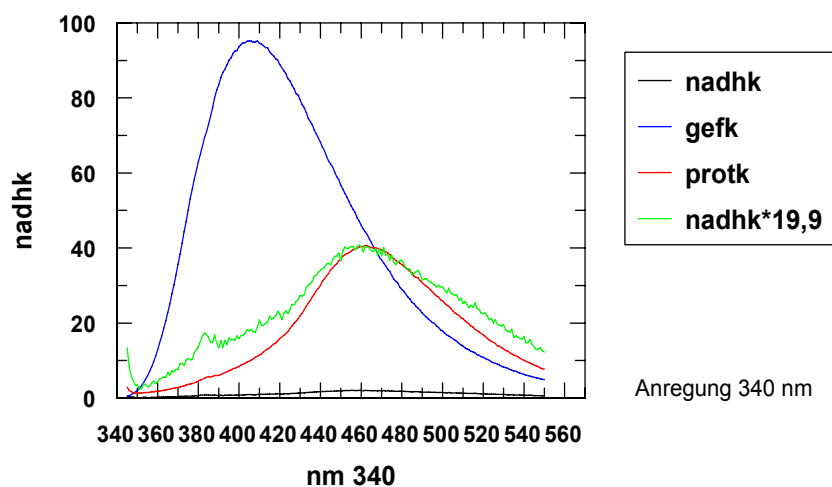


Abbildung 74: Überlagerung der Emissionsspektren. NADH Stammlösung (5 μM) (schwarz), AgIA (5 μM) (rot), AgIA (gefällt) (blau) und NADH Stammlösung (5 μM) mit dem Faktor 19,9 multipliziert (grün).

Die Zugabe von Cofaktoren, insbesondere NAD^+ , konnte bei MelA aus *E. coli* eine Inaktivierung des Enzyms verhindern. Anscheinend wird das NAD^+ im Enzym reduziert und überträgt die Fluoreszenz des entstandenen NADH auf das Enzym. Diese Übertragung scheint zu einer Verstärkung des Signals führen oder Enzym selbst zeigt eine Eigenfluoreszenz bei genau 460 nm.

4.4.2. NMR-Untersuchungen zum Mechanismus

Die anomeren Protonen von Kohlenhydraten sind mittels NMR-Spektroskopie sehr gut zugänglich aufgrund ihrer exponierten Position im NMR-Spektrum. Bereits früher wurde die Spezifität in Bezug auf Inversion oder Retention des Mechanismus der Hydrolyse von Kohlenhydraten untersucht (Gebler et al., 1992). Durch die verschiedene chemische Umgebung der anomeren Protonen besitzt das α -anomere Proton im Falle der Glukose ca. $\Delta 7$ ppm und im Falle der Galaktose eine um ca. $\Delta 3$, 7 ppm weiter ins Tieffeld verschobene Position (http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS/cgi-bin/cre_index.cgi). Leider bewirken paramagnetische Ionen, wie Mn^{2+} , eine deutliche Signalverbreiterung. Deshalb kann man aus Abbildung 75 keine absolute Aussage treffen, daß auch das β -Anomer entsteht, da es unter dem H_2O -Signal liegen könnte. Dies erscheint aber bei den Messungen mit Galaktosesubstraten eher unwahrscheinlich. Man kann davon ausgehen, daß keine β -Glukose durch Inversion entstanden sein sollte, da das Signal für das β -anomere Proton bei ca 5,2 ppm in genügendem Abstand zum H_2O -Signal hätte erscheinen sollen.

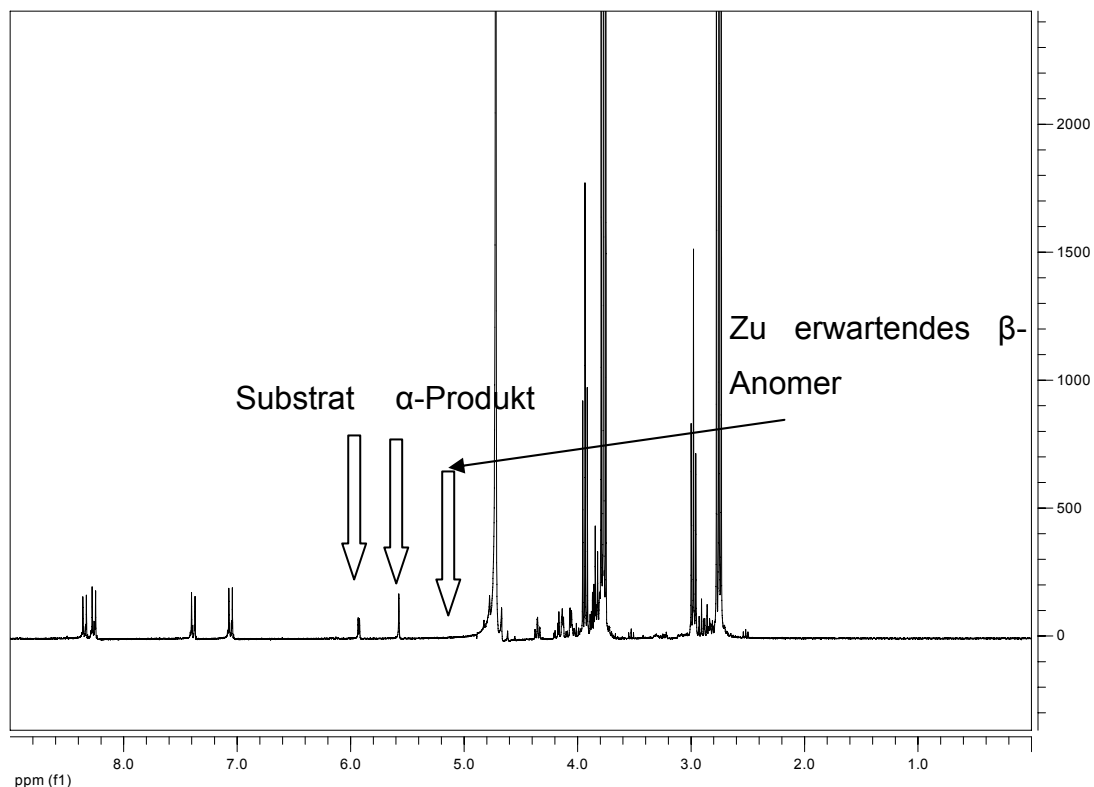


Abbildung 75: 1H -NMR (D_2O , 300 MHz) von pNP- α -Gal und Enzym nach 15 min Inkubation bei 37°C

Da nur eine suboptimale Mangankonzentration eingesetzt werden konnte, ließ sich leider kein vollständiger Umsatz unter den Bedingungen der Messung beobachten.

4.4.3. Kristallisation von AgIA aus *T. maritima*

In Kooperation mit Prof. N. Sträter wurde AgIA kristallisiert und anschließend mittels Röntgenbeugung vermessen (Lodge et al, 2003). AgIA ist die erste Glukosidase, die aus der GHF4 kristallisiert wurde. Im Kristall konnte die NAD⁺-Bindedomäne bestätigt werden. NAD⁺ wurde gebunden an ein Rossmann-Fold gefunden, der Nicotinamidring ragt in das aktive Zentrum hinein. Wie aus anderen manganabhängigen Enzymen bereits bekannt ist, sind verschiedene Histidine an der Metallkoordination beteiligt. His-175 und His-177 konnten als wahrscheinliche Bindepartner verifiziert werden. Trotz der Anwesenheit von Mangan im Kristallisationsansatz ließ es sich nicht im aktiven Zentrum nachweisen. Hierfür sind zwei mögliche Erklärungen denkbar. Erstens ist der niedrige pH von 4,6 zu nennen, bei dem die Histidine protoniert vorliegen und zweitens der erstaunliche Befund, daß das Cys-174 doppelt oxidiert als Sulfinsäure vorliegt.

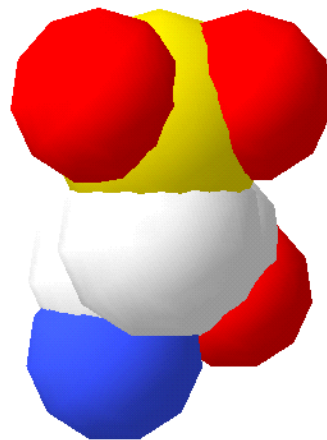


Abbildung 76: Cys174 als Sulfinsäure in AgIA aus *T. maritima* als Elektronendichtedarstellung (gelb: Schwefel, rot: Sauerstoff, weiß: Kohlenstoff, blau: Stickstoff)

Die Kristalle von AgIA aus *T. maritima* konnten bis auf 1,9 Å aufgelöst und der Raumgruppe P2₁ zugeordnet werden. Das Enzym liegt als Dimer vor, was in vorhergehenden Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad bereits beobachtet wurde (Raasch et al., 2001). Vor allem das in der GHF4 hochkonservierte Cys174 spielt eine wichtige Rolle für das aktive Zentrum. Dies wird vor allem auch durch die Tatsache gestützt, daß die Mutante C174S, in der das Cystein gegen ein Serin ausgetauscht wurde, keinerlei enzymatische Aktivität mehr zeigte. AgIA liegt im Kristall anscheinend inaktiv vor, da das kokristallisierte Substrat Maltose nicht umgesetzt wurde. Das nichtreduzierende Ende der Maltose besitzt Wasserstoffbrückenbindungen mit Asn153, His203, Asp119 und Arg263. Zusätzlich liegt eine hydrophobe Wechselwirkung von Val117 mit dem β-Nicotinamidring des NAD⁺ vor. Das reduzierende Ende der Maltose scheint sehr flexibel vorzuliegen. Ein Vergleich mit dem später kristallisierten GlvA aus *B. subtilis* zeigt, daß der Nicotinamidring des NAD⁺ bei AgIA aus dem aktiven Zentrum herausgedreht war (Abbildung 77). Sonst lag NAD⁺ in beiden Kristallen fast deckungsgleich vor. Die Kristalle von GlvA konnten bis auf 2,05 Å aufgelöst werden (Shyamala et al., 2004). Daß der Nicotinamidring des NAD⁺ herausgedreht war, könnte damit erklärbar sein, daß einerseits der pH mit 4,6 relativ niedrig war und damit die Histidine protoniert vorlagen und andererseits das Cys174 doppelt oxidiert war. Damit ist auch zu erklären, warum kein Mangan im aktiven Zentrum gefunden wurde, da es nicht binden konnte. Die in Abbildung 77 darüber gelegte Kristallstruktur von GlvA konnte mit Mangan kristallisiert werden. Die GlvA-Struktur ist fast deckungsgleich mit der Struktur von AgIA. Das Substrat des GlvA ist gespalten und paßt tiefer in das aktive Zentrum, wohingegen die Maltose unverändert im Kristall von AgIA liegt (Abbildung 77). Sie bindet zwar in die Tasche des Enzyms, hat aber deutlich größere Abstände im Vergleich zu den Bindungspartnern der Phosphoglukose des GlvA.

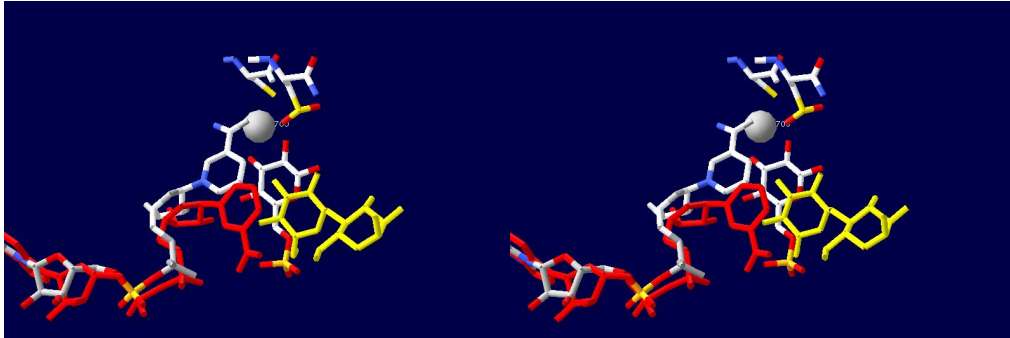


Abbildung 77: 3D-Ansicht der Überlagerung von den Kristallstrukturen (Daten für AgIA aus *T. maritima* einfarbig, Daten für GlvA aus *B. subtilis* mehrfarbig)

4.5. ESR- und Mechanismusuntersuchungen

Mangan liegt im wässrigen Milieu normalerweise als $\text{Mn}[\text{H}_2\text{O}]_6^{2+}$ vor. Dieser Komplex ist hochsymmetrisch und zeigt im ESR ein ebenfalls hochsymmetrisches Spektrum, welches aus sechs nahezu äquidistanten Signalen besteht. Veränderungen der Koordinationssphäre zeigen sich auch in einer Veränderung des Spektrums. Außerdem gibt es nur ein stabiles Isotop (^{55}Mn), das einen Kernspin von $5/2$ aufweist. Sowohl der g -Tensor als auch der Hyperfeintensor sind nahezu isotrop, was dazu führt, daß die $m_s = -1/2 \leftrightarrow 1/2$ -Übergänge auch in ungeordneten Systemen Anlaß zu relativ schmalen Linien geben. Die charakteristische Hyperfeinstruktur ist deshalb oft sehr gut erkennbar (sechs nahezu äquidistante Linien nahezu gleicher Intensität).

Die hier untersuchten Enzyme aus *E. coli*, *P. miotherma* und *T. maritima* sind stark manganabhängig. Shyamala (2004) schlug einen Mechanismus zur Hydrolyse unter direkter Beteiligung von Mn^{2+} vor. Dieser wurde aus der Kristallstruktur von GlvA aus *B. subtilis* abgeleitet (Shyamala et al., 2004). Das Mn^{2+} -Ion ist hier im aktiven Zentrum gebunden und koordiniert mit NAD^+ und verschiedenen Aminosäuren an das Substrat.

Spektren von AgIA, die unter optimalen Konzentrationen der benötigten Cofaktoren aufgenommen wurden, zeigen noch ein deutliches Manganspektrum, das aber bereits anisotrope Effekte aufweist (Abbildung 78). Das Spektrum zeigt Abweichungen vom hochsymmetrischen Spektrum des $\text{Mn}[\text{H}_2\text{O}]_6^{2+}$ -Komplexes. Zusätzlich taucht ein Signal (siehe Pfeil Abbildung 78) auf, das einen Hinweis auf ein

radikalisches Intermediat geben könnte. Dieses Signal taucht erst bei Temperaturen auf, bei denen auch eine leichte Aktivität des Enzyms zu verzeichnen ist, nämlich bei Temperaturen $> 8^{\circ}\text{C}$.

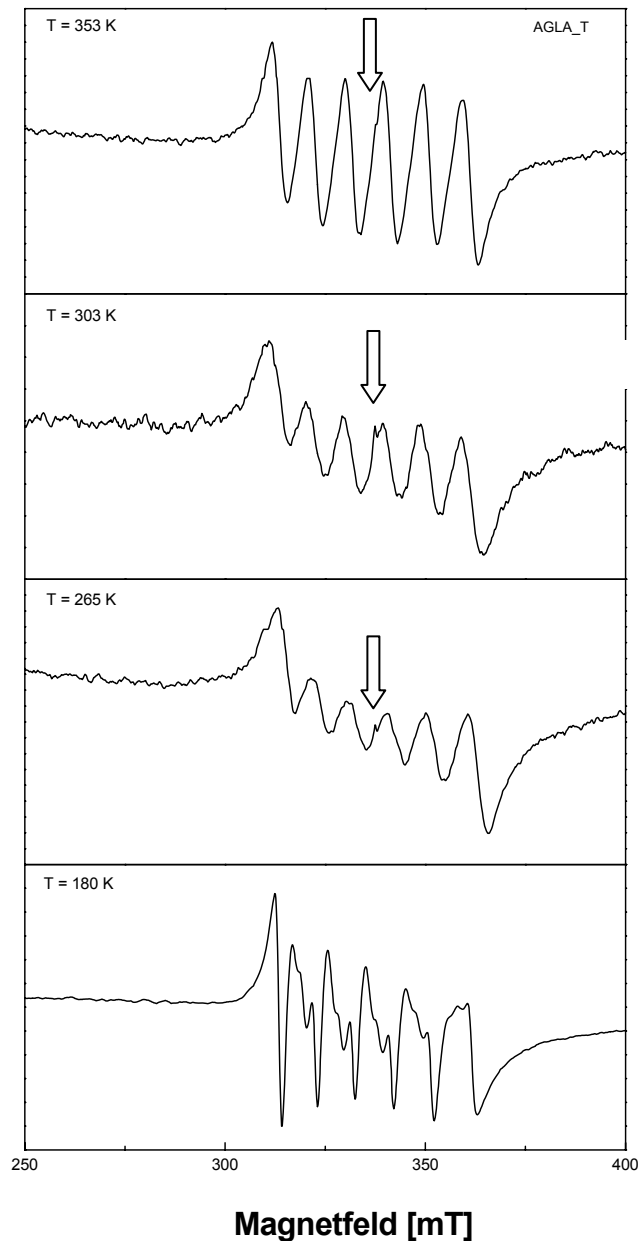


Abbildung 78: Temperaturscan des Assays unter optimalen Konzentrationen der Cofaktoren von AglA aus *T. maritima* im Bereich von 180 – 353 K

Da bereits unter optimalen Bedingungen eine Veränderung der Koordinationssphäre zu verzeichnen war, in denen noch ein deutlicher Überschuß an Mn^{2+} -Ionen vorlag, sollte nun untersucht werden, wie sich das Spektrum verändert, wenn das jeweilige Enzym im Überschuß vorliegt. Bei diesen Messungen, die mit dem *P. miotherma* ORF RPMI01263-Enzym und *E. coli* MelA durchgeführt wurden, (Abbildung 64, Abbildung 65) ist die deutlichste Anisotropie im Spektrum zu sehen.

Da in den Messansätzen das jeweilige Enzym, die notwendigen Cofaktoren und das jeweilige Substrat vorlagen, kann man davon ausgehen, daß Mangan seine Hydrathülle, bestehend aus den sechs H_2O -Molekülen, zugunsten einer Koordination im aktiven Zentrum verlassen hat. Dies wird durch die Daten aus den Kristallisationsdaten von GlvA aus *B. subtilis* gestützt, in denen das Mn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum gebunden ist (Abbildung 79). Zusätzlich fällt auf, daß der g-Wert des Signals des durch den ORF RPMI01263 kodierten Enzyms weiter ins Tieffeld verschoben ist, als der des Signals von MelA. Dieses gibt einen Hinweis auf eine festere Bindung des Mangans in das aktive Zentrum. Da es sich bei der in ORF RPMI01263 kodierten α -Glukosidase um ein thermophiles Enzym handelt, erscheint es sinnvoll, daß das Mn^{2+} -Ion fester in die Enzymtasche gebunden ist und durch die thermische Bewegung nicht so leicht verdrängt werden kann.

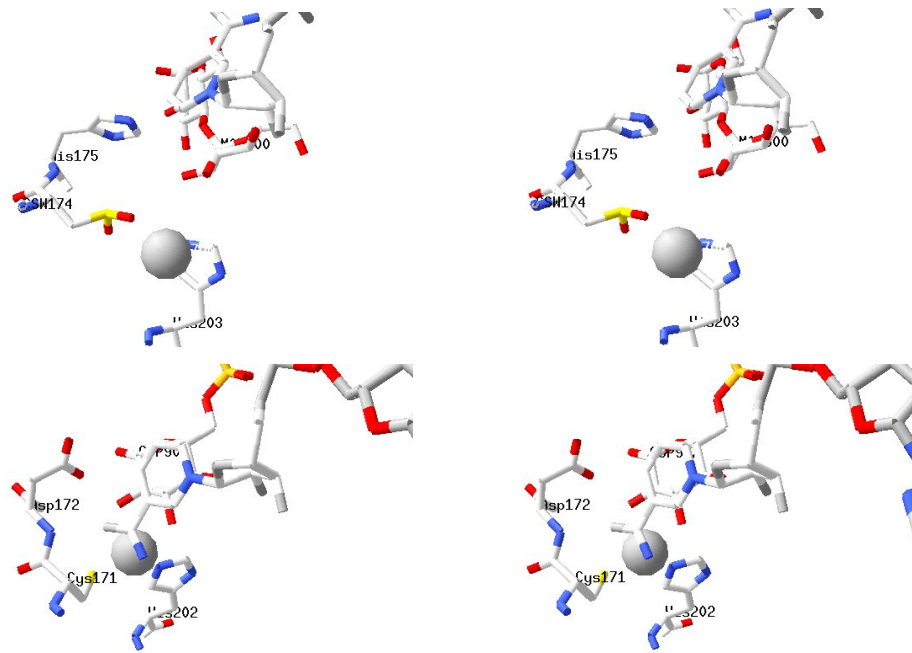


Abbildung 79:Vergleich der Kristallstrukturen von AglA (mit Mn^{2+} aus der Kristallstruktur des GlvA) aus *T. maritima* (oben) und GlvA aus *B. subtilis* (unten).

Bei dem direkten Vergleich der Kristallstrukturen um das aktive Zentrum (Abbildung 79) fällt auf, daß im GlvA aus *B. subtilis* ein Asparagin an Stelle eines Histidin im AglA aus *T. maritima* sitzt. In die Kristallstruktur des AglA aus *T. maritima* wurde das Mangan aus der des GlvA hineinprojiziert. Shyamala et al (2004) stellten für GlvA aus *B. subtilis* einen Reaktionsmechanismus unter Beteiligung des Asparagins vor. Dieser Mechanismus ist aufgrund dieses Aminosäureaustauschs nicht direkt auf AglA übertragbar. Wie in Abbildung 80 zu sehen ist, trifft das auch auf die Enzyme MelA aus *E. coli* und die von den ORFs RPMI00511, RPMI00720 und RPMI01263 kodierten Enzyme zu. Auch hier ist statt des Asparagins ein Histidin in der Aminosäuresequenz vorhanden.

	10	20	30	40	50										
720	-MTAIK	LGII	GAGS	AAFS	LRVSD	DLCK	TKGL	SGSL	VSLMD	IDKDR	LNVAH				
1263	-MTAIK	LGII	GAGS	AAFS	LRVSD	DLCK	TKGL	SGSL	VSLMD	IDKDR	LNVAH				
AglA	-MPSV	KIGI	IAGS	AVFS	LRVSD	DLCK	TPGL	SGST	VTLMD	IDEE	RLDAIL				
511	--MPV	KISF	IGAG	SVRY	TMKLV	GD	LAKT	KE	NGSL	ISFMD	IDEE	RLNAVD			
MelA	MMSAP	KITF	IGAG	STIF	VKNIL	GD	VFH	REAL	KTAH	IALMD	IDP	IRLEESH			
Clustal Consensus	.	*	:	*****	.	:	::	*	:	:	*	:	::	*****	**

```

                60          70          80          90          100
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
720      MLAKKFAEEFGADLRFETTTNVEDAIKDSSSFVVNTALVG-----GHSYF
1263     MLAKKFAEEFGTDLRFETTTNVEDAIKDSSSFVVNTALVG-----GHSYF
AglA     TIAKKYVEEVGADLKFETTMNDDVIIDADFVINTAMVG-----GHTYL
511      NLAKRYTEEIGGNLKFETTTNREESLKDADFVINTALYRAPGHEDGYVSY
Mela     IVVRKLMDSAGASGKITCHTQQKEALEDADFVVVAFQIG-----GY
Clustal Consensus  :::  .. * . ::  : .: : *:.**: :
    
```

```

                110         120         130         140         150
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
720      EQVRKISEKYGYRIGIDSQEFNMVSDYYTISNFNQLKFMHDVAKAIERIS
1263     EQVRKISEKYGYRIGIDSQEFNMVSDYYTISNFNQLKFMHDVAKAIERIS
AglA     EKVRQIGEKYGYRIGIDAQEFNMVSDYYTFSNYNQLKYFVDIARKIEKLS
511      EIMRDVGEKYGYRIGIDSQEFNMVSDYYTFTNYNHLKLSLDIAKSIEKIC
Mela     EPCTVTDVEVCKRHGLEQTIADTLGPGGIMRALRTIPHLWQICEDMTEVC
Clustal Consensus *   . :   :*: :   : :.   :   . :   :... : ...
    
```

```

                160         170         180         190         200
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
720      PKAWLLQAANPVFELT-NLITRTVVPINMVGICGHGHHG-VDHIEKLGGLDA
1263     PKAWLLQAANPVFELT-NLITRTVVPINMVGICGHGHHG-VDHIEKLGGLDA
AglA     PKAWYLQAANPIFEGT-TLVTRTVPIKAVGFCGHGYG-VMEIVEKLGLEE
511      PNAWLMQTANPVFEIT-QLIKRLTNVKVIGFCGHGVVG-VQEVLKTGLLEE
Mela     PDATMLNYVNPAMNTWAMYARYPHIKQVGLCHSVQGTAEELARDLNIDP
Clustal Consensus *.*  :: .** :   * :   *   :: :*:** . * . . : . *...
    
```

```

                210         220         230         240         250
    ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
720      EKVEWQVAGVMEGIWLTKFMYEGKDA--YPLIDELLEKEVKNEFKPTNPFD
1263     EKVEWQVAGVMEGIWLTKFMYEGKDA--YPLIDELLEKEIKNEFKPTNPFD
AglA     EKVDWQVAGVMEGIWLNRFRYNGGNA--YPLLDKWIEEKSKDWKPEPNFN
511      KETDWQVAGVMEGIWLNRFLYKGEDG--YQILDKWIEEESNNWEPKDPWD
Mela     ATLRYRCAGINEMAFYLELERKTADGSYVNLYPELLAAAYEAGQAPKPNIH
Clustal Consensus  :: **: ** :   .: :   . :   : :   . *   .
    
```

```

                260      270      280      290      300
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
720      DQLSPVAKDMYEFYGMPIGDTVNRNGSWKYHYNLETKKKWFGEPEGGVD
1263     DQLSPVAKDMYEFYGMPIGDTVNRNGSWKYHYNLETKKKWFGEPEGGVD
AglA     DQLSPA AIDMYRFYGVMPIGDTVNRNSSWRVHRDLETKKKWFGEPEGGAD
511      THLAPAVIDMYKFYGLLPIGDTTRNSTWKHHHSLQAKKKWYGK-FGGIDN
Mela     GNTRCQNIVRYEMFKKLG YFVTE SSE-----HFAEYTPWFIKPGREDLI
Clustal Consensus  :      *.: :      * .      :      . *: :
    
```

```

                310      320      330      340      350
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
720      ELGWKWYQDRQAEIATAMQKVAKYFQENKNAKLLSKDSLNEIISQTKNDV
1263     ELGWKWYQDRQAEIALAMQKVAKYFQENKNAKLLSKDSLNEIISQTKNDV
AglA     EIGWKWYQDTLKGVTETITKKVAKFIKENPSVRLS---DLGSVLG--KDL
511      EVERPKFYEELRQIKRMIIQVSK----DPSIKIT-----ETW
Mela     ERYKVPLDEYPKRCVEQLANWHKELEEKASRID-----
Clustal Consensus  *      :      .      :      *      .
    
```

```

                360      370      380      390      400
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
720      KEELTKEIYNLLDPQKKSGEQHILLANALLNDEKVDLVLNLPNNGTIPGI
1263     KEEFTKEICSLLD P Q K K S G E Q H I L L A N A L L N D E K V D L V L N L P N N G T I P G I
AglA     EKQFVLEVEKILDPERKSGEQHIPPFDALLNDNKARFVNNIPNKGIIHGI
511      SEEFPK-----KMSGEQQIPFINALTNDVEARLEFLNVLNNGTIKNI
Mela     -----IKPSREYASTIMNAIWTGEP SVIYGNVRNDGLIDNL
Clustal Consensus  :      * *      :      *: ..      :      *: * . * * ..
    
```

```

                410      420      430      440      450
    .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
720      PDDVAVEIPVYADKNGIHR YKIDPPLPERIKKMYLYPRIMRMEWALEAFL
1263     PDDVAVEIPVYADKNGIHR YKIDPPLPERIKKMYLYPRIMRMEWALEAFL
AglA     DDDVVVEVPALVDKNGIHP EKIEPPLPDRVVKYYLRPRIMRMEWALEAFL
511      PDDVVVEVPLKVNKNGMFP EKIEPDLPEKIKNYIIPRITRMEWALESEFI
Mela     PQGCCVEVA CLVDANGIQPTKVG-TLP SHLAALMQTN-INVQTLLEAIL
Clustal Consensus  :.  **: .  .:  **:  *:  **: :      *      *:::
    
```

460 470 480 490


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
720      TGDKRVLEEFLLIRDPRTKSYDQVVKVIDEILALPGNE-EMRKHYSKK-
1263     TGDKKVLEEFLLIRDPRTKSYDQVVKVIDEILALPGNE-EMRKHYSKK-
AglA     TGDIRIIEKELLYRDPRTKSDEQVEKVIIEILALPENE-EMRKHYLKR-
511      TGDRNILEEVLVRDPRTKNYDDIPKLWDEIFDLPFNK-GMKEHYRR--
Mela     TENRDRVYHAAMMDPHTAAVLGIDEIYALVDDLIAAHGDWLPGLHR-
Clustal Consensus * : : . **:* : :: : * . : :
    
```

Abbildung 80: Alignment von GHF4 Enzymen; Mela aus *E. coli*; die Enzyme aus den ORFs RPMI00511, RPMI00720 und RPMI01263 aus *P. miotherma*; AglA aus *T. maritima*. Der Rossmann-Fold-ähnliche Bereich ist grau hinterlegt und die an der Bindung des Mn²⁺-Ion beteiligten Aminosäuren sind blau hinterlegt.

Aus Abbildung 79 lassen sich folgende Koordinationen für das Mn²⁺-Ion ableiten:

1. GlvA aus *B. subtilis*: C2OH, C3OH, His202, NAD⁺, Cys172 und Asp172
2. AglA aus *T. maritima*: C2OH, C3OH, His203, NAD⁺, Cys174 und His175

Aus den Daten läßt sich folgender Mechanismus ableiten (Abbildung 81):

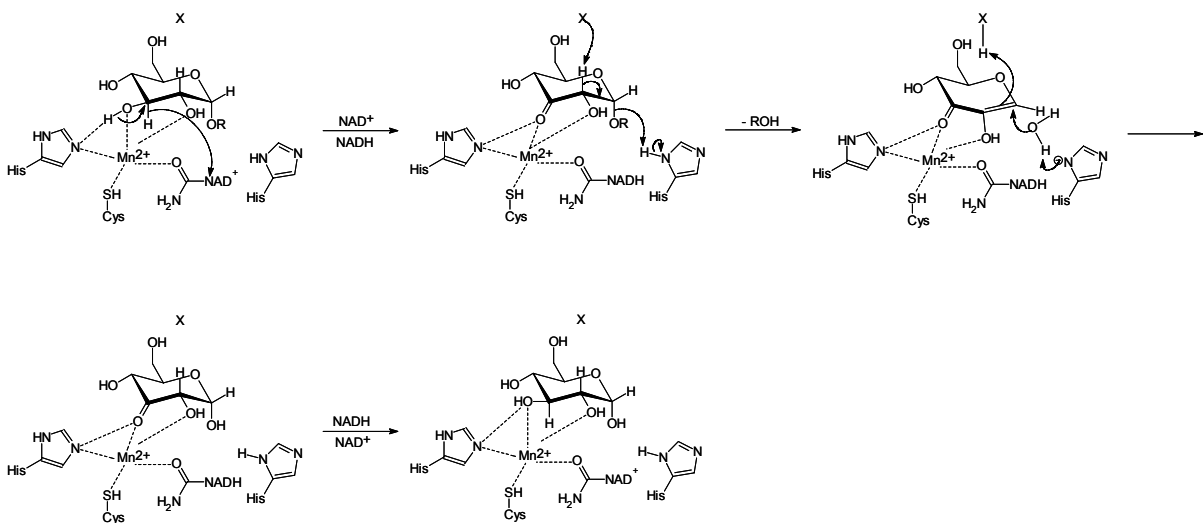


Abbildung 81: Allgemeiner Mechanismus der GHF4 (X steht für eine protonenakzeptierende Aminosäure).

Bei diesem Mechanismus wird das Sauerstoffatom durch NAD^+ an C3 oxidiert. Das Proton an C2 wird durch eine protonenakzeptierende Aminosäure abstrahiert, die im Falle von MelA aus *E. coli* Arginin und im Falle der α -Glukosidasen aus *P. miotherma* Glutamat ist. Hierbei entsteht ein 1,2-ungesättigter Michaelakzeptor und der zweite Zuckerrest wird abgespalten. Histidin koordiniert ein H_2O -Molekül und ein nucleophiler Angriff auf den 1,2-ungesättigten Michaelakzeptor findet statt. Anschließend wird der Sauerstoff an C3 durch NADH wieder reduziert und die Reaktionskaskade ist beendet. Erstaunlicherweise ist dort wo im Mechanismus ein X steht entweder eine saure oder eine basische Aminosäure kodiert (Abbildung 80). Der Mechanismus scheint hierdurch an die verschiedenen pH-Werte der Umgebung angepaßt zu sein. Durch diesen Mechanismus wird auch die Beobachtung aus den NMR-Versuchen gestützt, daß es sich hierbei um eine Bindungsspaltung mit Retention am anomeren Zentrum handelt (4.4.2).

4.5.1. Auftreten eines unbekanntes Produkts bei der AgIA-Reaktion

Nach der Auftrennung von Reaktionsprodukten der AgIA-katalysierten Umsetzung von Substraten, trat auf Dünnschichtchromatogrammen ein Sonderspot auf und lief etwas über dem Glukosespot. Da er nur bei Enzymansätzen auftrat, die unter idealen Bedingungen durchgeführt wurden, ging man zunächst davon aus, es könnte sich um ein Zwischenprodukt der enzymatischen Umsetzung handeln.

SpotX ist nicht, wie zu erst vermutet, ein Zwischenprodukt der enzymatischen Umsetzung vom Substraten in Form eines speziell oxidierten Zuckers, sondern ein Nebenprodukt der stark reduzierenden Reaktionsbedingungen. Aus dem Massen- und dem ^{13}C -NMR-Spektrum konnte folgende Verbindung abgeleitet werden: 2-Hydroxymethyl-6-(2-hydroxypropylsulfanyl)-glukopyranosid. Die Addition von Thiolen ist in der Chemie bisher eher aus radikalischen Reaktionen bekannt.

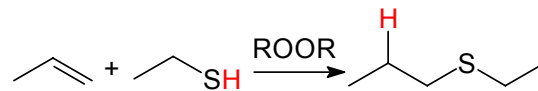


Abbildung 82: Radikalische Addition von Ethanethiol an Propen (K. Peter, C. Vollhardt; Organische Chemie, VCH, S. 497)

Der in Abbildung 81 vorgeschlagene Mechanismus verläuft über einen 1,2-ungesättigten Michael-Akzeptor. Dieser ist für einen nucleophilen Angriff durch Wasser gut zugänglich. Da Schwefel nucleophiler als Wasser ist, kommt es anscheinend zu einer Konkurrenzreaktion und das Reduktionsmittel greift stattdessen am C1 der Glukose an. Es sind sowohl das α -Anomer, als auch das β -Anomer entstanden, wie man dem ^{13}C -NMR-Spektrum entnehmen kann. Die Doppelsignale treten fast im 1:1-Verhältnis auf, was darauf hindeutet, daß die Reaktion nicht mehr enzymgesteuert zu sein scheint und recht unspezifisch verläuft.

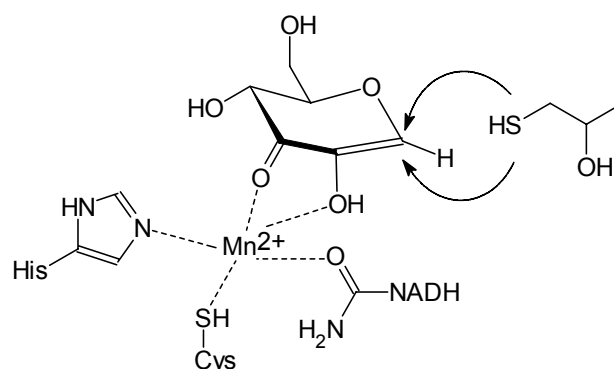


Abbildung 83: Möglicher Schritt der Konkurrenzreaktion.

Zwar lassen sich bei ^{13}C -NMR-Spektren keine genauen Aussagen über die Konzentration der einzelnen Komponenten treffen, da sie sich nicht wie ^1H -NMR-Spektren integrieren lassen. Da sich aber nur eines der beiden Anomere bei dem vorhergesagten Mechanismus hätte bilden sollen, kann man trotzdem aus dem Spektrum ungefähre Aussagen über die Menge der entstandenen Anomere treffen. Das Nebenprodukt 2-Hydroxymethyl-6-(2-hydroxypropylsulfanyl)-glukopyranosid kann nicht direkt in der Enzytasche entstanden sein, da beide Anomere entstanden sind. Es ist zu vermuten, daß es sich hierbei um eine Nebenreaktion der nicht physiologischen Bedingungen durch das DTT handelt. Es liegt in sehr hoher Konzentration im Reaktionsansatz vor und scheint den aus der Enzytasche

herausdiffundierten 1,2-ungesättigte Michaelakzeptor abgefangen zu haben. Der Spot trat nur in geringer Konzentration auf. Durch die hohe Nukleophilie des Schwefels kam es zum Angriff auf die Doppelbindung. Das Reduktionsmittel scheint also nicht in der Enzymtasche zu agieren.

Wie aus den Versuchsbedingungen schon bekannt ist, läuft der enzymatische Umsatz ohne das Reduktionsmittel nicht ab. Dieser Widerspruch lässt sich aus diesen Daten noch nicht genau aufklären.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung von Enzymen der GHF4, einer Gruppe von Enzymen, die NAD^+ -abhängig sind und an ihrem N-Terminus gelegen eine hochkonservierte Sequenz Gly-Xxx-Gly-Ser (GXGS) besitzen. Dieses Motiv hat gewisse Ähnlichkeit mit einem konservierten Sequenzmotiv des Rossmann-Fold, bestehend aus einer alternierenden Abfolge von β -Strängen und α -Helices ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$), die eine konservierte strukturelle Region für die Bindung eines Cofaktors in Proteinen darstellt. Im klassischen Rossmann-Fold Motiv ist eine glycinreiche Sequenz innerhalb des ersten β -Strangs wichtig (GXGXXG), die über eine Schleife den ersten β -Strang mit der folgenden α -Helix verbindet. Diese ist maßgeblich an der NAD^+ -Bindung beteiligt. Neben der Abhängigkeit von NAD^+ benötigen die Enzyme für ihre Funktion zweiwertige Ionen, meist Mn^{2+} -Ionen und stark reduzierende Bedingungen durch Anwesenheit von DTT.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit drei α -Glukosidasen aus *P. miotherma*, einer α -Galaktosidase aus *E. coli* K12 und einer α -Glukosidase aus *T. maritima*.

Frühere Untersuchungen an der α -Galaktosidase MelA aus *E. coli* K12 scheiterten aufgrund ihrer hohen Instabilität. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das MelA-Gen aus chromosomaler DNA kloniert und als Fusion mit einem His Tag produziert. Es erfolgte eine Aufreinigung in nur einem Schritt an einer Protino[®] Ni 2000-Säule. Dabei wurden 5 mg reines MelA mit einer Molekularmasse von 50 kDa mit einer spezifischen α -Galaktosidaseaktivität von 22 U/mg gewonnen. Weiterhin wurde die Aktivität durch Zugabe von Mn^{2+} -Ionen so weit konserviert, daß eine biochemische Charakterisierung vorgenommen werden konnte. Eine optimale Substratumsetzung erfolgte bei pH 7,0 und, unter Verwendung eines Assays in Gegenwart von Mn^{2+} (0,15 mM), NAD^+ (0,5 mM) und DTT (0,25 M), bei einer Temperatur von 37°C. MelA zeigte nur an α -Galaktose-basierten Substraten hydrolytische Aktivität. Das Enzym lag in aktiver Form als Hexamer vor. NMR-Spektroskopische Untersuchungen zum Substratumsatz belegen, daß die Hydrolyse über eine Retention am anomeren Zentrum verläuft. Zusätzliche Untersuchungen durch ESR-Spektroskopie ergaben, daß das Mn^{2+} -Ion eine stark verzerrte oktaedrische Koordinationssphäre im aktiven Zentrum besitzt. Ein Ergebnis zur Kristallisation des Enzyms steht noch aus.

Die α -Glukosidase aus *T. maritima* AgIA ist in Kooperation mit Prof. N. Sträter kristallisiert und anschließend mittels Röntgenbeugung vermessen worden. AgIA ist das erste Enzym, das aus der GHF4 kristallisiert wurde. Im Kristall konnte die NAD⁺-Bindedomäne bestätigt werden. Untersuchungen mit Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie an AgIA ergaben Hinweise auf die Anwesenheit von NADH während des enzymatischen Umsatzes.

Weiterhin wurden drei Gene für GHF4-Enzyme aus *P. miotherma* heterolog in *E. coli* überexprimiert. Die Aufreinigung der drei Enzyme erfolgte in zwei Schritten über eine denaturierende Hitzefällung und anschließend über eine Anionenaustauschchromatographie.

Das von ORF RPMI00511 kodierte Enzym konnte nicht weiter charakterisiert werden, da es anscheinend inaktiv in reiner Form vorlag.

Das in ORF RPMI00720 kodierte Enzym zeigte in reiner Form Aktivität sowohl an künstlichen α -Galaktosesubstraten (spezifische Aktivität 0,7 U/mg) als auch an α -Glukosesubstraten (spezifische Aktivität von 1,16 U/mg). Das Enzym besitzt keine hohe Spezifität in Bezug auf das C4 des Substrates. Eine optimale Substratumsetzung erfolgte bei pH 7,0 und, unter Verwendung eines Assays in Gegenwart von Mn²⁺ (0,6 mM), NAD⁺ (2,7 mM) und DTT (0,25 M), bei einer Temperatur von 60°C.

Das von ORF RPMI01263 kodierte Enzym zeigte in reiner Form Aktivität sowohl an künstlichen α -Galaktose-basierten Substraten (spezifische Aktivität von 1,9 U/mg) als auch an α -Glukosesubstraten (spezifische Aktivität von 2,50 U/mg). Das Enzym besitzt keine hohe Spezifität in Bezug auf das C4 des Substrates. Eine optimale Substratumsetzung erfolgte bei pH 7,0 und, unter Verwendung eines Assays in Gegenwart von Mn²⁺ (0,6 mM), NAD⁺ (0,9 mM) und DTT (0,25 M), bei einer Temperatur von 60°C. Untersuchungen durch ESR-Spektroskopie ergaben, daß das Mn²⁺-Ion eine stark verzerrte oktaedrische Koordinationssphäre im aktiven Zentrum besitzt.

Durch die Kombination von Kristallisationsdaten, ESR- und NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnte der vorgeschlagene Mechanismus der GHF4 weiter verfeinert und allgemein dargestellt werden.

Weiterhin konnte ein Nebenprodukt der enzymatischen Umsetzung aufgereinigt und anschließend dessen chemische Struktur aufgeklärt werden.

6. Literatur

Andrade, C. (1996)

Production and characterization of extremely thermostable xylanolytic and amylolytic enzymes from the hyperthermophilic archaeon *P. abyssi*
Ph. D. Thesis Technische Universität Hamburg-Harburg

Andrade, M.M.C., Pereira, N., Antranikian, G. (1999)

Extremely thermophilic microorganism and their polymerhydrolytic enzymes
Revista de Microbiologia 30: 287-298.

Bragger, J. M.; Daniel, R. M.; Coolbear, T.; Morgan, H. W. (1989)

Very stable enzymes from extremely thermophilic archaeobacteria and eubacteria.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 31:556-561.

Becker P, Abu-Reesh I, Markossian S, Antranikian G, Märkl H. (1997)

Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil.
Appl Microbiol Biotechnol;48:184–90.

Bertoldo C., Antranikian G. (2001)

Amylolytic enzymes from hyperthermophiles,
Methods Enzymol. 330:269-89

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979)

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
Nucleic Acid Res. 7, 1513-1518

Bradford, M.M. (1976)

A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding

Anal. Biochem. 72: 248-254

Brown, D.H. & Brown, B.I. (1966)

Enzymes of glycogen debranching: amylo-1,6-glucosidase (I) and oligo 1,4→1,4-glucoantransferase (II)

Methods Enzymol. 8: 515-524

Brown, S. H.; Kelly, R. M. (1993)

Characterization of Amylolytic Enzymes, Having Both α -1,4 and α -1,6 Hydrolytic Activity, from the Thermophilic Archaea *Pyrococcus furiosus* and

Thermococcus litoralis. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(8): 2614-2621.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987)

XL1-Blue: a high efficiency plasmid DNA transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection

Bio Techniques 5: 376-379

Burstein, C., Kepes, A., (1971)

The α -galactosidase from *Escherichia coli* K12.

Biochim. Biophys. Acta 230, 52-63

Cowan D. (1996)

The Outer Reaches of Life

TIBTECH 13: 177

Crabb, WB., Mitchinson, C. (1996)

Enzymes involved in the processing of starch to sugars

TIBTECH 15: 349-352

Daniel, R. M., Dines, M., Petach, H. H. (1996)

Stability and folding of dihydrofolate reductase from the hyperthermophilic bacterium

T. maritima

Biochem. J. 317: 1-11

Davey, M.E., Wood, W.A., Key, R., Nakamura, K., Stahl, D.A. (1993)

Isolation of three Species of *Geotoga* and *Petrotoga*: Two New Genera, Representing a New Lineage in the Bacterial Line of Descent Distantly Related to the "Thermotogales" System. *Appl. Microbiol.* 16: 191-200

Eichler, J. (2001)

Biotechnological uses of archaeal extremozymes

Biotechnology Advances 19: 261-278

Ferreira-Filho, E. X. (1994)

The xylan-daggrading enzyme system

Brazilian J. Med. Res. 27: 1093-1109

Friebolin, H.

Ein- und Zweidimensionale NMR-Spektroskopie,

2. Aufl., VCH, Weinheim **1992**

Gebler, J., Gilkes, N. R., Claeysens, M. (1992)

Stereoselective Hydrolysis Catalysed by Related β -1,4-Glucanases and β -1,4-xylanases

J Biol Chem. ;267(18):12559-12561.

Grote, R., Antranikian, G. (2001)

Extremophile Biotechnologie – Life Science für eine bessere Zukunft

Hamburg Aktuell, Mensch & Technik, Ausgabe II/2001

Günther, H.

NMR-Spektroskopie, 2. Aufl.,

G. ThiemeVerlag, Stuttgart **1983**

Hall, T.A., 1999

Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor for Windows 95/98/NT

Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98

Hanahan, D. (1983)

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids

J. Mol. Biol. 166: 557-580

Henrissat B., (1991)

A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities.

Biochem. J. 280:309-316.

Henrissat B., Bairoch A. (1993)

New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino- acid sequence similarities.

Biochem. J. 293:781-788.

Henrissat B., Bairoch A. (1996)

Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases.

Biochem. J. 316:695-696.

Henrissat B., Davies G. (1995)

Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases.

Structure 3:853-859.

Huber, R., Langworthy, T.A., König, H., Thomm, M., Woese, C.R., Sleytr, U.B., Stetter, K.O., (1986)

Thermotoga maritima sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C

Arch. Microbiol. 144: 324-333

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

High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids

Gene 96: 23-28

Janecek, Š., (1997)

α-Amylase family: Molecular biology and evolution.

Prog. Biophys. Molec. Biol. **67**, 67-97

Jaenicke, R. and Böhm, G. (1998)

The stability of proteins in extreme environments

Curr. Opin. Struct. Biol. 8: 738-748

Krahe, M., Antranician, G., Märkl, H. (1996)

Fermentation of extremophilic microorganisms

FEMS Microbiol. Rev.: 18: 271-85

Laemmli, U. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Nature 227: 680-685

Lien T., Madsen M., Rainey F.A., Birkeland N.K. (1998)

Petrotoga mobilis sp. nov., from a North Sea oil-production well

Int. J. Syst. Bacteriol. (Pt 3):1007-13

L'Haridon, S., Miroshnichenko, M.L., Hippe, H., Fardeau, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Stackebrandt, E., Jeanthon, C. (2002)

Petrotoga olearia sp. Nov. and *Petrotoga sibirica* sp. Nov., two thermophilic bacteria isolated from a continental petroleum reservoir in Western Siberia

*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*52(Pt 5):1715-22

Mirando-Tello, E., Fardeau, M-L., Thomas, P., Ramirez, F.

Petrotoga mexicana sp. Nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico.

*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*54:169-174.

Lodge JA, Maier T, Liebl W, Hoffmann V, Sträter N.(2003)

Crystal structure of *Thermotoga maritima* alpha-glucosidase AglA defines a new clan of NAD⁺-dependent glycosidases.

J. Biol. Chem. ;278(21):19151-8.

Lundberg KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. (1991)

High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*.

Gene;108:1–6.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2001)

Brock Mikrobiologie

Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin

Nagao, Y., Nakada, T., Imoto, M., Shimamoto, T., Sakai, S., Tsuda, M., Tsuchiya, T. (1988)

Purification and analysis of the structure of alpha-galactosidase from *Escherichia coli*.

Biochem Biophys Res Commun. Feb 29;151(1):236-41.

Niehaus F, Bertoldo C, Kahler M, Antranikian G. (1999)

Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application,

Appl Microbiol Biotechnol. **51**(6): 711-29

Nissen, A. N.; Anker, L.; Munk, N.; Lange, N. K. (1992)

Xylanases for the Pulp and Paper Industry. In: Visser J, Beldman G, Kusters - van Someren MA, Voragen AGJ (eds) Xylan and Xylanases, *Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p.325-337.*

Raasch, C. (2001)

Molekulare, biochemische und strukturelle Untersuchungen von amylolytischen Enzymen von *Thermotoga maritima* MSB8
Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August Universität München

Raasch C, Armbrecht M, Streit W, Hocker B, Strater N, Liebl W. (2002)

Identification of residues important for NAD⁺ binding by the *Thermotoga maritima* alpha-glucosidase AgIA, a member of glycoside hydrolase family 4.
FEBS Lett.;517(1-3):267-71.

Raasch C, Streit W, Schanzer J, Bibel M, Gossler U, Liebl W. (2000)

Thermotoga maritima AgIA, an extremely thermostable NAD⁺-, Mn²⁺-, and thiol-dependent alpha-glucosidase.
Extremophiles. (4):189-200.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)

Molecular cloning: a laboratory manual.
2nd Edition Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schlegel, H.G. (1992)

Allgemeine Mikrobiologie
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart

Selig, M., Xavier, K.B., Santos, H., Schönheit, P. (1997)

Comparative analysis of the Emden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*

Arch. Microbiol. 167: 217-232

Shyamala S. Rajan, Xiaojing Yang, Frank Collart, Vivian L.Y. Yip, Stephen G. Withers, Annabelle Varrot, John Thompson, Gideon J. Davies, and Wayne F. Anderson¹ (2004)

Novel Catalytic Mechanism of Glycoside Hydrolysis Based on the Structure of an NAD⁺/Mn²⁺-Dependent Phospho- α -Glucosidase from *Bacillus subtilis*

Structure, Vol. 12, 1619–1629,

Sterner R., Liebl W. (2001)

Thermophilic Adaptation of Proteins

Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 36 (1): 39-106 (2001)

Stetter, K.O. (1996)

Hyperthermophilic procaryotes

FEMS Microbiol. Rev. 18: 149-158

Suzuki, Y., Yonezawa, K., Hattori, M., Takii, Y., (1992),

Assignment of *Bacillus thermoamyloliquefaciens* KP1071 α -glucosidase I to an exo- α -1,4-glucosidase, and its striking similarity to bacillary oligo-1,6-glucosidases in Nterminal sequence and in structural parameters calculated from the amino acid composition.

Eur. J. Biochem. **205**, 249-256

Takagi M, Nishioka M, Kakihara H, Kitabayashi M, Inoue H, Kawakami B, Oka M, Imanaka T. (1997)

Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR.

Appl Environ Microbiol;63:4504–10.

Tamai E, Shimamoto T, Tsuda M, Mizushima T, Tsuchiya T. (1998)

Conversion of temperature-sensitive to -resistant gene expression due to mutations in the promoter region of the melibiose operon in *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem.;273(27):16860-4.

Thompson J, Ruvinov SB, Freedberg DI, Hall BG. (1999)

Cellobiose-6-phosphate hydrolase (Celf) of *Escherichia coli*: characterization and assignment to the unusual family 4 of glycosylhydrolases.

J. Bacteriol. ;181(23):7339-45.

Widdel, F., Pfennig, N. (1984)

Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria.

Bergey's manual of systematic bacteriology, 1: 663-679

Richard Wolfenden, Xiangdong Lu, and Gregory Young (1998)

Spontaneous Hydrolysis of Glycosides

J. Am. Chem. Soc., 120, 6814-6815

7. Anhang

0,05M Zn(OAc) ₂ 5%Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 5%Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 5%Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Zn(OAc) ₂ 5%Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 5%Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 5%Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Zn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Zn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Zn(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Zn(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 10%Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Zn(OAc) ₂ 15%Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Zn(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5

0,05M Mn(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Mn(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Mn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Mn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Mn(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Mn(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Mn(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Mn(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5

0,05M Ca(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Ca(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Ca(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Ca(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 7,5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Ca(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Ca(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 10% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Ca(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Ca(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 15% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5

8% PEG 3350 5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	8% PEG 4000 0,2M Zn(OAc) ₂ 0,1M NaCacodylat pH6,5	8% PEG 8000 5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	8% PEG 3350 5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	8% PEG 4000 0,2M Zn(OAc) ₂ 0,1M Hepes pH7,5	8% PEG 8000 5% MpD 0,1M Hepes pH7,5
10% PEG 3350 5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	10% PEG 4000 5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	10% PEG 8000 0,1M NaCacodylat pH6,5	10% PEG 3350 5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	10% PEG 4000 5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	10% PEG 8000 0,1M Hepes pH7,5
14% PEG 3350 0,1M Zn(OAc) ₂ 0,1M NaCacodylat pH6,5	14% PEG 4000 2% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	14% PEG 8000 5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	14% PEG 3350 0,1M Zn(OAc) ₂ 0,1M Hepes pH7,5	14% PEG 4000 2% MPD 0,1M Hepes pH7,5	14% PEG 8000 5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5
18% PEG 3350 1% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	18% PEG 4000 0,05M Zn(OAc) ₂ 0,1M NaCacodylat pH6,5	18% PEG 8000 0,1M NaCacodylat pH6,5	18% PEG 3350 1% MPD 0,1M Hepes pH7,5	18% PEG 4000 0,05M Zn(OAc) ₂ 0,1M Hepes pH7,5	18% PEG 8000 0,1M Hepes pH7,5

8% PEG 3350 0,05M Ca(OAc) ₂ 0,1M NaCacodylat pH6,5	8% PEG 4000 0,05M Mn(OAc) ₂ 0,1M NaCacodylat pH6,5	8% PEG 8000 0,05M NaKTartrate 0,1M NaCacodylat pH6,5	8% PEG 3350 0,05M Ca(OAc) ₂ 0,1M Hepes pH7,5	8% PEG 4000 0,05M Mn(OAc) ₂ 0,1M Hepes pH7,5	8% PEG 8000 0,05M NaKTartrate 0,1M Hepes pH7,5
10% PEG 3350 0,1M Ca(OAc) ₂ 0,1M NaCacodylat pH6,5	10% PEG 4000 0,1M Mn(OAc) ₂ 0,1M NaCacodylat pH6,5	10% PEG 8000 0,1M NaKTartrate 0,1M NaCacodylat pH6,5	10% PEG 3350 0,1M Ca(OAc) ₂ 0,1M Hepes pH7,5	10% PEG 4000 0,1M Mn(OAc) ₂ 0,1M Hepes pH7,5	10% PEG 8000 0,1M NaKTartrate 0,1M Hepes pH7,5
14% PEG 3350 0,15M Ca(OAc) ₂ 0,1M NaCacodylat pH6,5	14% PEG 4000 0,15M Mn(OAc) ₂ 0,1M NaCacodylat pH6,5	14% PEG 8000 0,15M NaKTartrate 0,1M NaCacodylat pH6,5	14% PEG 3350 0,15M Ca(OAc) ₂ 0,1M Hepes pH7,5	14% PEG 4000 0,15M Mn(OAc) ₂ 0,1M Hepes pH7,5	14% PEG 8000 0,15M NaKTartrate 0,1M Hepes pH7,5
18% PEG 3350 0,2M Ca(OAc) ₂ 0,1M NaCacodylat pH6,5	18% PEG 4000 0,2M Mn(OAc) ₂ 0,1M NaCacodylat pH6,5	18% PEG 8000 0,2M NaKTartrate 0,1M NaCacodylat pH6,5	18% PEG 3350 0,2M Ca(OAc) ₂ 0,1M Hepes pH7,5	18% PEG 4000 0,2M Mn(OAc) ₂ 0,1M Hepes pH7,5	18% PEG 8000 0,2M NaKTartrate 0,1M Hepes pH7,5

0,05M Zn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Zn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Zn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Zn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Zn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Zn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Zn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Zn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Zn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M Hepes pH7,5

0,05M Ca(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Ca(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Ca(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Ca(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Ca(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Ca(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Ca(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Ca(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Ca(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Ca(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M Hepes pH7,5

0,05M Mn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Mn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 5% MPD 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Mn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Mn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 7,5% MPD 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Mn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Mn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 10% MPD 0,1M Hepes pH7,5
0,05M Mn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,05M Mn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Mn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M Hepes pH7,5	0,2M Mn(OAc) ₂ 15% MPD 0,1M Hepes pH7,5

0,1M Zn(OAc) ₂ 1% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 2% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 3% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 4% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 6% Isopropanol 0,1M Hepes pH7,5
0,1M Zn(OAc) ₂ 1% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 2% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 3% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 4% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 5% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5	0,1M Zn(OAc) ₂ 6% Isopropanol 0,1M NaCacodylat pH6,5

Danksagungen

Herrn Prof. Wolfgang Liebl sei für die Bereitstellung des Themas, seinem Interesse am Fortgang der Arbeit und seiner kompetenten Betreuung herzlich gedankt.

Herrn Prof. Gerhard Gottschalk danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Markus Rudolph danke ich für die freundliche Hilfe bei den Fluoreszenzspektren und den Kristallisationsversuchen.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Franc Meyer und insbesondere an Frau Dr. A. Claudia Stückl für die Versuche am ESR. Unmögliches wurde sofort erledigt und manchmal kleine Wunder vollbracht.

Ein großer Dank geht an alle meine Kollegen: Ute Ludwig, Mechthild Bömeke, Elke Heinz, Prof. Dr. Wolfgang Streit, Ole Fütterer, Carsten Raasch, Mladen Tzvetkov, Christel Schmeißer, Sonja Voget, Meike Ballschmiter, Angel Angelov, Julia Busse, Steve Klopffleisch, Krasimira Ivanova, Inga Schulte, Alexandra Uesbeck, Monika Nöller, Susan Brandenburg, Christian Elend, Jörg Kleine, Anika Appelles, Monika Nöller, Katrin Grage, Jessica Jabin, Sabrina Koßmehl, Christina Schipper, Jörn Voß, Susanne Keese, Marta Brewinska, usw..... (Bitte nicht schlagen, falls ich jemanden vergessen habe!).

Für die sehr schnelle und gründliche Korrektur meiner Arbeit danke ich Sonja Voget, Christel Schmeißer und Angel Angelov.

Ein weiterer Dank geht an Martin Mollenhauer für die Unterstützung bei den „Petrotoga´s“.

Ein riesiger Dank geht an meine Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht und mich in jeder Form voll unterstützt haben.

Der größte Dank geht an Boris Müller! Danke, daß du mich in der ganzen Zeit voll unterstützt und ertragen hast. Es war bestimmt nicht immer einfach. DANKE!

Lebenslauf

Persönliche Angaben:	<i>Familienstand: ledig</i> <i>Staatsangehörigkeit: deutsch</i> <i>Geburtstag: 28.09.1972</i> <i>Geburtsort: Celle</i> <i>Eltern: Helga Hoffmann (geb. Gast), Ewald Hoffmann</i>
Schule	1979 – 1983 Grundschule Wietze 1983 – 1985 Orientierungsstufe Winsen / Aller 1985 – 1992 Hermann-Billing-Gymnasium Celle 19.05.1992 Abitur am Hermann-Billing-Gymnasium Celle
Ersatzdienst	01.08.1992 – 31.10.1993 Zivildienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe Celle
Studium	22.09.1993 Immatrikulation an der Georg-August-Universität Göttingen 11.02.1998 Diplomvorprüfung in Chemie 06.07.2001 Diplomprüfung in Chemie 01.10.2001 – 06.05.2005 Promotion am Institut für Mikrobiologie und Genetik in Göttingen
Sprachkenntnisse	Englisch, Französisch