

Produktion und Aufreinigung von Enzymen aus Essigsäurebakterien für biotechnologische Anwendungen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Maria Meyer

aus

Bonn

Bonn 2014

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier
 2. Gutachterin: apl. Prof. Dr. Christiane Dahl
- Tag der Promotion: 16.06.2014
Erscheinungsjahr: 2014

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Meyer, M., Schweiger, P. & Deppenmeier, U. (2013). Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 3457-3466.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Essigsäurebakterien.....	1
1.2 Biotechnologische Anwendungen und Physiologie von <i>Gluconobacter oxydans</i>	2
1.3 Anwendung und Physiologie von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	3
1.4 Expressionssysteme für Essigsäurebakterien.....	4
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	5
2 Material und Methoden.....	7
2.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme.....	7
2.1.1 Herstellung von γ -Hydroxybutyrat.....	7
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	8
2.2.1 Organismen, Medien und Kulturbedingungen.....	8
2.2.1.1 Organismen.....	8
2.2.1.2 Medien und Kulturbedingungen.....	9
2.2.2 Stammkulturen.....	10
2.2.3 Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern.....	10
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	10
2.3.1 Isolierung von RNA und DNA.....	10
2.3.1.1 Präparation von Plasmiden.....	10
2.3.1.2 Isolierung von chromosomaler DNA.....	11
2.3.1.3 Isolierung von RNA.....	11
2.3.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA.....	11
2.3.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese.....	12
2.3.4 Plasmide und Oligonukleotide.....	12
2.3.4.1 Plasmide.....	12
2.3.4.2 Oligonukleotide.....	14
2.3.5 Polymerase-Kettentreaktion (PCR).....	15
2.3.5.1 PCR zur Amplifizierung von Genen.....	16
2.3.5.2 Kolonie-PCR.....	16
2.3.5.3 RT-qPCR.....	17
2.3.6 Agarosegelelektrophorese.....	19
2.3.7 Restriktionsverdau.....	19
2.3.8 Behandlung von Vektoren mit alkalischer Phosphatase.....	20
2.3.9 Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen.....	20
2.3.10 Ligation.....	20
2.3.11 Sequenzierung.....	21
2.4 Biochemische Methoden.....	21
2.4.1 Herstellung superkompetenter <i>E. coli</i> DH5 α -Zellen.....	21

2.4.2	Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α	22
2.4.3	Elektroporation von <i>G. oxydans</i> Δ hdsR und <i>Ga. diazotrophicus</i>	22
2.4.4	Herstellung ruhender Zellen	24
2.4.5	Produktion und Reinigung von Proteinen	24
2.4.5.1	Homologe Produktion von Proteinen in <i>G. oxydans</i> Δ hdsR und <i>Ga. diazotrophicus</i>	24
2.4.5.2	Zellaufschluss mittels Ultraschall	24
2.4.5.3	Aufreinigung von löslichen Proteinen über Strep-Tactin- Affinitätschromatographie	25
2.4.5.4	Präparation von Membranfraktionen	25
2.4.5.5	Solubilisierung und Aufreinigung von Membranproteinen über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie	25
2.4.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	26
2.4.6.1	Proteinbestimmung nach Bradford	26
2.4.6.2	Biuret-Test	26
2.4.6.3	BCA-Test	27
2.4.6.4	DC Protein Assay Kit	27
2.4.7	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	28
2.4.7.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.4.7.2	Native PAGE	29
2.4.7.3	Silberfärbung	30
2.4.7.4	Berechnung der molekularen und nativen Masse der Proteine	31
2.4.7.5	Western-Blot und Immunodetektion von Proteinen	31
2.4.8	Enzymaktivitätstests	33
2.4.8.1	Bestimmung der Aktivität PQQ-abhängiger Enzyme	33
2.4.8.2	Messung der Aktivität von NAD(P)H-abhängigen Enzymen	34
2.4.8.3	Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums	35
2.4.8.4	Enzymkinetik	35
2.4.8.5	Rekonstitution eines Apoenzyms mit PQQ	36
2.4.8.6	Zugabe von polaren Lipiden zu gereinigten Membranproteinen	36
2.4.9	Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate von ruhenden Zellen und Membranfraktionen	36
2.4.10	Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentrationen in Kulturen	37
2.4.10.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	37
2.4.10.2	Glukosebestimmung	37
2.5	Verwendete Programme und bioinformatische Methoden	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Konstruktion der Expressionsvektoren pBBR1p264-ST und pBBR1p452-ST	41
3.2	Die Succinat-Semialdehyd-Reduktase Gox1801 aus <i>G. oxydans</i>	44
3.2.1	Bioinformatische Analyse des Proteins Gox1801	44
3.2.2	Klonierung des Gens <i>gox1801</i> aus <i>G. oxydans</i>	47
3.2.3	Überproduktion und Aufreinigung des Proteins Gox1801	49
3.2.3.1	SDS-PAGE und Western-Blot des Proteins Gox1801	49
3.2.3.2	Native PAGE des Proteins Gox1801	50
3.2.3.3	Bestimmung des pH-Optimums von Gox1801	51
3.2.3.4	Ermittlung des Temperaturoptimums von Gox1801	51
3.2.3.5	Überprüfung der Aktivität von Gox1801 mit γ -Hydroxybutyrat	52
3.2.3.6	Substratspektrum des Enzyms Gox1801	53
3.2.3.7	Bestimmung der kinetischen Parameter des Enzyms Gox1801	53

3.2.3.8	Aktivität des Enzyms Gox1801 in Abhängigkeit von der Cofaktorkonzentration.....	55
3.2.3.9	RT-qPCR.....	57
3.3	Die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase aus <i>G. oxydans</i>	57
3.3.1	Bioinformatische Analyse der mGDH.....	58
3.3.2	Klonierung des <i>mgdh</i> -Gens (<i>gox0265</i>).....	59
3.3.3	Relative Transkriptabundanz des <i>mgdh</i> -Gens.....	63
3.3.4	Effekte der mGDH-Überproduktion auf die Atmungskette von <i>G. oxydans</i> ...	63
3.3.4.1	Wachstum und Glukonatproduktion von <i>G. oxydans</i> auf D-Glukose.....	63
3.3.4.2	Glukose-Oxidation durch ruhende Zellen von <i>G. oxydans</i>	67
3.3.4.3	Spezifische Aktivität der Membranfraktionen von <i>G. oxydans</i> mit den Substraten Glukose, Ethanol und Mannitol.....	67
3.3.4.4	Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktionen mit Glukose und Ethanol.....	69
3.3.5	Aufreinigung und Charakterisierung der mGDH.....	70
3.3.5.1	SDS-PAGE und Western-Blot der aufgereinigten mGDH.....	70
3.3.5.2	Anreicherung der mGDH.....	71
3.3.5.3	Spezifische Aktivität der gereinigten mGDH.....	72
3.3.5.4	Substratspektrum der mGDH.....	72
3.3.5.5	Kinetische Parameter der mGDH.....	73
3.3.5.6	Aufreinigung der mGDH anhand des Strep-Tags mit verlängerter Linkersequenz (Streplong).....	74
3.3.5.7	Aufreinigung der mGDH mithilfe des doppelten Strep-Tags (One-Strep-Tag).....	74
3.3.5.8	SDS-PAGE der aufgereinigten mGDH mit One-Strep-Tag.....	75
3.3.5.9	Anreicherung der mGDH mit dem One-Strep-Tag.....	75
3.3.5.10	Vergleichende SDS-PAGE und Western-Blot von Elutionsfraktionen aus der mGDH-Aufreinigung mit dem einfachen Strep-Tag und dem One-Strep-Tag.....	76
3.4	Die membrangebundene Dehydrogenase Gox1857 aus <i>G. oxydans</i>	77
3.4.1	Bioinformatische Analyse des Proteins Gox1857.....	77
3.4.2	Klonierung des Gens <i>gox1857</i>	81
3.4.3	Aktivität der Membranfraktionen von <i>G. oxydans</i> mit <i>myo</i> -Inositol und L-Sorboson.....	82
3.4.4	Überproduktion und Aufreinigung des Proteins Gox1857.....	84
3.4.4.1	SDS-PAGE und Western-Blot des Proteins Gox1857.....	84
3.4.4.2	Substratspektrum des Enzyms Gox1857.....	85
3.4.4.3	Rekonstitution des Enzyms Gox1857 mit PQQ.....	86
3.4.4.4	Auswirkungen von Detergenz auf die Oxidation von <i>myo</i> -Inositol.....	86
3.4.4.5	Zugabe des Extrakts von polaren Lipiden aus <i>E. coli</i> zu dem gereinigten Protein Gox1857.....	87
3.5	Analyse der putativen L-Sorboson-Dehydrogenase Gdi_3764 aus <i>Ga. diazotrophicus</i>	87
3.5.1	Bioinformatische Analyse des Proteins Gdi_3764.....	88
3.5.2	Klonierung des Gens <i>gdi_3764</i> aus <i>Ga. diazotrophicus</i>	89
3.5.3	Transkriptabundanz des Gens <i>gdi_3764</i> in <i>Ga. diazotrophicus</i>	91
3.5.4	Überproduktion und Aufreinigung des Proteins Gdi_3764.....	91
3.5.4.1	Aufreinigung des Proteins Gdi_3764.....	92
3.5.4.2	SDS-PAGE und Western-Blot des Proteins Gdi_3764.....	93
3.5.4.3	Aktivitätstest des gereinigten Proteins Gdi_3764 mit L-Sorboson.....	94

4	Diskussion	95
4.1	<i>Gluconobacter oxydans</i> als Organismus der Biotechnologie	95
4.1.1	Biotechnologische Anwendungen von <i>G. oxydans</i>	95
4.1.2	Membrangebundene Dehydrogenasen und PQQ	96
4.1.3	Entwicklung von Expressionssystemen für Essigsäurebakterien.....	97
4.2	Gox1801 – eine Succinat-Semialdehyd-Reduktase aus <i>G. oxydans</i>	99
4.2.1	Aufreinigung und Charakterisierung des Proteins Gox1801	100
4.2.1.1	Vergleich von Gox1801 mit Succinat-Semialdehyd-Reduktasen aus anderen Organismen	101
4.2.1.2	Funktion von Succinat-Semialdehyd-Reduktasen und Gox1801.....	104
4.3	Die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase – das Schlüsselenzym im Glukose-Metabolismus von <i>G. oxydans</i>	106
4.3.1	Solubilisierung und Aufreinigung von Membranproteinen über Affinitätschromatographie.....	106
4.3.2	Wechselwirkung von Affinitätstags und Detergenzien.....	108
4.3.3	Charakteristika der gereinigten mGDH.....	109
4.3.3.1	Vergleich mit mGDHs aus anderen Organismen.....	110
4.3.4	Überexpression des <i>mgdh</i> -Gens in <i>G. oxydans</i> und Auswirkungen auf die Atmungskette	111
4.3.4.1	Auswirkungen der <i>mgdh</i> -Überexpression auf die Glukoseoxidationsraten von ganzen Zellen und Membranfraktionen	112
4.3.4.2	Atmungskette von <i>G. oxydans</i>	114
4.3.5	Produktion von Glukonaten durch <i>G. oxydans</i> und deren Verwendung.....	115
4.4	Gox1857 aus <i>G. oxydans</i> – ein Enzym, das die Produktion von Vitamin C vereinfacht?	116
4.4.1	Überproduktion von Gox1857 in <i>G. oxydans</i>	118
4.4.2	Aufreinigung von Gox1857	120
4.4.3	Auswirkungen des eingesetzten Detergenz und Rekonstitutionsversuche zur Steigerung der Aktivität von Gox1857.....	121
4.5	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> als Organismus der Biotechnologie	123
4.5.1	<i>Ga. diazotrophicus</i> - ein Endophyt, der das Pflanzenwachstum fördert	123
4.5.2	Produktion und Charakterisierung von Proteinen aus <i>Ga. diazotrophicus</i> ...	124
4.5.3	Verwendung von <i>Ga. diazotrophicus</i> und seinen Enzymen	125
4.6	Die putative L-Sorboson-Dehydrogenase Gdi_3764 aus <i>Ga. diazotrophicus</i>	126
4.6.1	Transkriptabundanz des Gens <i>gdi_3764</i> in <i>Ga. diazotrophicus</i>	126
4.6.2	Produktion, Lokalisierung und Aufreinigung des Proteins Gdi_3764.....	127
5	Zusammenfassung.....	131
6	Literaturverzeichnis.....	134
7	Danksagung.....	154
8	Lebenslauf.....	155
9	Publikationsliste	156

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Cef	Cefoxitin
CMC	kritische Mizellenbildungskonzentration
CoA	Coenzym A
Cyt	Cytochrom
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
ddH ₂ O	doppelt-demineralisiertes Wasser
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltosid
dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	et alii/et aliae (und andere)
FAD	Flavinadenindinukleotid
g	Gramm
GABA	γ-Aminobutyrat
GHB	γ-Hydroxybutyrat
h	Stunde

HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-Benzoessäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Kan	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
K_M	Michaelis-Konstante
KP-Puffer	Kaliumphosphatpuffer
L	Liter
LB	Lysogeny Broth
M	molar [mol/L]
Mb	Mega-Basenpaare
mGDH	membrangebundene Glukose-Dehydrogenase
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD _{600 nm}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OG	n-Octyl- β -D-Glukopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PMS	Phenazinmethosulfat
PQQ	Pyrrlochinolinchinon
QH ₂	Ubichinol
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Real-Time quantitative reverse Transkriptions-PCR
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLD	Sorbitol-Dehydrogenase

sp.	Spezies
SSA	Succinat-Semialdehyd
SSAR	Succinat-Semialdehy-Reduktase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
YG	Hefe-Glukose
YM	Hefe-Mannitol

1 Einleitung

1.1 Essigsäurebakterien

Essigsäurebakterien sind obligat aerobe, Gram-negative Stäbchenbakterien, die sich durch die Eigenschaft auszeichnen, eine Vielzahl von Zuckern, Alkoholen und Polyolen unvollständig zu oxidieren (De Ley *et al.*, 1984). Gemeinsam ist den meisten Mitgliedern dieser Familie die Fähigkeit, Ethanol zu Essigsäure umzusetzen und die damit verbundene hohe Toleranz gegenüber Essigsäure und niedrigen pH-Werten (Cleenwerck & De Vos, 2008). Die Familie Acetobacteraceae gehört zur Klasse der α -Proteobakterien und umfasst aktuell 32 Gattungen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>, 7.1.2014). Für die Biotechnologie bedeutend sind überwiegend Vertreter der Gattungen *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* und *Gluconobacter* (Raspor & Goranovič, 2008). Während in der klassischen Herstellung von Speiseessig überwiegend *Acetobacter*-Stämme und einige *Gluconacetobacter*-Stämme verwendet werden (Gullo *et al.*, 2006; Yamada, 2000), werden *Gluconobacter*-Stämme häufiger zur Oxidation von Zuckern bei der Herstellung von Feinchemikalien wie z. B. Glukonat eingesetzt (Gupta *et al.*, 2001). Entscheidend ist, dass die Umsetzung von Substraten durch Essigsäurebakterien nicht nur schnell und fast quantitativ, sondern auch stereo- und regiospezifisch erfolgt. Deshalb werden Essigsäurebakterien in biotechnologischen Prozessen besonders für Schritte eingesetzt, die durch klassische organische Chemie nur schwer durchzuführen sind (Deppenmeier *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2001).

Eine Schlüsselrolle spielen membrangebundene Dehydrogenasen (Pronk *et al.*, 1989), deren aktive Zentren zum Periplasma orientiert sind. Ihre Substrate werden direkt im periplasmatischen Raum oxidiert und die entstandenen Aldehyde, Ketone und organischen Säuren über Porine in das Medium abgegeben (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009). Die Substrate der löslichen, cytoplasmatischen Dehydrogenasen müssen dagegen in die Zellen aufgenommen werden, wo Intermediate phosphoryliert und weiter metabolisiert werden (Deppenmeier *et al.*, 2002). Die cytoplasmatischen Dehydrogenasen tragen zur Synthese von biosynthetischen Vorläufern bei und sichern das Überleben der Zellen in der stationären Wachstumsphase (Matsushita *et al.*, 1994). Im Folgenden werden die Physiologie und

biotechnologischen Anwendungen der in dieser Arbeit verwendeten Essigsäurebakterien *Gluconobacter oxydans* und *Gluconacetobacter diazotrophicus* genauer betrachtet.

1.2 Biotechnologische Anwendungen und Physiologie von *Gluconobacter oxydans*

Gluconobacter oxydans ist sehr gut an das Wachstum in hoch konzentrierten Zuckerlösungen (z. B. bis zu 30 % Glukose) und an niedrige pH-Werte angepasst (Sievers & Swings, 2005), denn seine natürlichen Habitate sind Blüten und Früchte (Gupta *et al.*, 2001). Daneben kann *G. oxydans* durch die Bildung von Fremdaromen die Ungenießbarkeit von Getränken wie Bier, Wein und Limonade verursachen (Battey & Schaffner, 2001). Da bei *G. oxydans* hohe Oxidationsraten mit einer niedrigen Produktion von Biomasse korrelieren, ist der Organismus sehr gut für Anwendungen in der Biotechnologie geeignet (Deppenmeier *et al.*, 2002; Olijve & Kok, 1979). Unter anderem wird *G. oxydans* zur Oxidation von 1-Amino-1-Deoxy-D-Sorbitol zu 6-Amino-6-Deoxy-L-Sorbose in der Produktion des Diabetes-Medikaments Miglitol (Schedel, 2000), zur Oxidation von D-Sorbitol zu L-Sorbose in der Vitamin C-Produktion (Adachi *et al.*, 2003; Reichstein & Grüssner, 1934) und zur Umsetzung von Glycerol zu Dihydroxyaceton, das z. B. Bestandteil von Selbstbräuern ist (Claret *et al.*, 1994; Deppenmeier *et al.*, 2002), eingesetzt. Des Weiteren wird *G. oxydans* zur Herstellung von aliphatischen, aromatischen und Thiocarbonsäuren verwendet, die als Geruchs- und Geschmacksstoffe dienen (Rabenhorst *et al.*, 2001). Außerdem finden Enzyme oder ganze Zellen von *G. oxydans* Verwendung als biologische Elemente in Sensorsystemen zur Detektion von Alkoholen, Zuckern und Polyolen (Macauley *et al.*, 2001).

Das Genom von *G. oxydans* 621H wurde vollständig sequenziert und neben dem 2.702.173 bp umfassenden Chromosom wurden fünf Plasmide mit Größen zwischen 2,7 und 163,1 kb identifiziert (Prust *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu anderen Essigsäurebakterien tritt bei der Gattung *Gluconobacter* kein anaplerotischer Glyoxylatzyklus auf und der Citratzyklus ist aufgrund einer fehlenden Succinat-Dehydrogenase unvollständig (Greenfield & Claus, 1972; Prust *et al.*, 2005). Deshalb sind Arten der *Gluconobacter* nicht befähigt, Acetat oder Laktat vollständig zu Kohlenstoffdioxid umzusetzen (De Ley *et al.*, 1984). Außerdem fehlt *G. oxydans* ein Gen, das für die 6-Phospho-Fruktokinase kodiert, so dass auch der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg nicht funktional ist (Prust *et al.*, 2005). Zucker können im Cytoplasma

unphosphoryliert durch die löslichen Dehydrogenasen zu Zuckersäuren oder Ketozuckersäuren oxidiert, oder nach Phosphorylierung über den Pentosephosphatweg oder Entner-Doudoroff-Weg katabolisiert werden (Richhardt *et al.*, 2013b). Der größte Teil der Zucker und Zuckeralkohole wird jedoch direkt im Periplasma durch die membrangebundenen Dehydrogenasen oxidiert. Dabei werden die Elektronen über Ubichinon vom Q10-Typ (Yamada *et al.*, 1997) an die Atmungskette abgegeben und am Ende über eine Protonen-pumpende bo_3 -Typ Chinoloxidase auf den Endakzeptor Sauerstoff übertragen (Matsushita *et al.*, 1987a). Der Protonengradient wird durch Komplex V der Atmungskette, eine F_1F_0 -Typ ATP-Synthase, zur Generierung von ATP genutzt (Prust *et al.*, 2005). Neben der bo_3 -Typ Chinoloxidase besitzt *G. oxydans* auch eine Zyanid-unempfindliche Chinoloxidase vom *bd*-Typ, die nur bei niedrigen pH-Werten produziert wird und keine Protonen transloziert (Ameyama *et al.*, 1987; Matsushita *et al.*, 1989a). Anstatt einer Protonen-pumpenden NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) weist *G. oxydans* eine aus einer einzelnen Untereinheit bestehende Typ-II NADH-Dehydrogenase auf, die keine Protonen transloziert (Prust *et al.*, 2005). Gene, die Cytochrom *c* und eine Ubichinol-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (bc_1 -Komplex) kodieren, sind vorhanden, wobei die Funktion des Komplexes unklar ist, da keine Gene gefunden wurden, die für eine Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV) kodieren (Prust *et al.*, 2005). Reduziertes Cytochrom *c* kann somit nicht wieder oxidiert werden (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009).

1.3 Anwendung und Physiologie von *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Gluconacetobacter diazotrophicus ist ein Stickstoff-fixierender Endophyt, der erstmals aus Zuckerrohr isoliert wurde und ohne der Pflanze zu schaden im interzellularen Raum der Wurzeln, Stängel und Blätter lebt (Cavalcante & Dobereiner, 1988; James *et al.*, 1994). Das Genom von *Ga. diazotrophicus* Pal5 wurde sequenziert und besteht aus einem 3,9 Mb großen Chromosom sowie zwei Plasmiden mit Größen von 16,6 und 38,8 kb (Bertalan *et al.*, 2009). Neben der Fähigkeit zur Fixierung von molekularem Stickstoff besitzt *Ga. diazotrophicus* weitere Eigenschaften, die das Wachstum der Pflanzen unterstützen (Sevilla *et al.*, 2001). So produziert dieser Organismus Pflanzenhormone (Bastián *et al.*, 1998; Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993) und Bacteriocin, das das Wachstum des Zuckerrohr-pathogenen Bakteriums *Xanthomonas albilineans* inhibiert (Blanco *et al.*, 2005; Piñón *et al.*, 2002). Außerdem fördert

Ga. diazotrophicus die Löslichkeit von Phosphat und Zink-Ionen (Maheshkumar *et al.*, 1999; Saravanan *et al.*, 2007). Aufgrund dieser besonderen Eigenschaften ist *Ga. diazotrophicus* sehr interessant für biotechnologische Anwendungen und könnte z. B. zu einer Verbesserung des Ertrags in der Zuckerrohr-Produktion beitragen (Bertalan *et al.*, 2009). Ähnlich wie *G. oxydans* ist auch *Ga. diazotrophicus* an das Wachstum bei hohen Zuckerkonzentrationen, z. B. bis zu 30 % Saccharose (Li & Macrae, 1991), angepasst und besitzt eine sehr hohe Toleranz gegenüber niedrigen pH-Werten und organischen Säuren. *Ga. diazotrophicus* kann Stickstoff bis zu einem pH-Wert von 2,5 fixieren (Tejera *et al.*, 2003) und die Glukose-Oxidation ist noch weniger empfindlich gegenüber niedrigen pH-Werten als bei *G. oxydans* (Attwood *et al.*, 1991). Durch einen speziellen Citratzyklus, der auch bei *Acetobacter aceti* auftritt und eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegenüber Essigsäure spielt (Mullins *et al.*, 2008), ist der Organismus in der Lage, Acetat oder Laktat vollständig zu Kohlenstoffdioxid umzusetzen (Bertalan *et al.*, 2009). In dem ungewöhnlichen Citratzyklus wird die Succinyl-CoA-Synthetase durch eine Succinyl-CoA-Acetat-CoA-Transferase ersetzt, die Succinyl-CoA und Acetat zu Succinat und Acetyl-CoA umsetzt. Zucker wie Glukose werden primär im Periplasma von *Ga. diazotrophicus* durch membrangebundene Dehydrogenasen oxidiert (Attwood *et al.*, 1991). Nach dem Transport in die Zelle und der Phosphorylierung wird entstandenes Glukonat weiter über den Pentosephosphatweg abgebaut (Luna *et al.*, 2000, 2006). Im ersten Schritt gelangen die Elektronen wie bei *G. oxydans* über Ubichinon vom Typ Q10 in die Atmungskette (Yamada *et al.*, 1997). Als Endoxidasen sind bei *Ga. diazotrophicus* eine Zyanid-sensitive Cytochrom-*bb*-Chinoloxidase und eine Zyanid-resistente Cytochrom-*ba*-Chinoloxidase vertreten (González *et al.*, 2006). Anders als *G. oxydans* besitzt *Ga. diazotrophicus* eine Protonen-pumpende NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase vom Typ I (Bertalan *et al.*, 2009; González *et al.*, 2006).

1.4 Expressionssysteme für Essigsäurebakterien

Anhand von Genomanalysen wurden für *G. oxydans* und *Ga. diazotrophicus* einige bisher nicht-charakterisierte, membrangebundene Dehydrogenasen vorhergesagt, die ein großes Potential für biotechnologische Anwendungen haben könnten. Durch geeignete molekulare Werkzeuge könnte die Charakterisierung dieser Proteine vorangetrieben werden. In der Vergangenheit wurden diverse lösliche Enzyme heterolog in *Escherichia coli* überproduziert (Chen *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2005; Menéndez *et al.*, 2002; Saichana *et al.*, 2007;

Schweiger *et al.*, 2007, 2008, 2010). Doch besonders bei Membranproteinen ist die homologe Produktion von Vorteil, da so die funktionale Integration des Proteins in die Membran besser gewährleistet werden kann. Die heterologe Produktion von Membranproteinen in *E. coli* hat häufig toxische Effekte, was zur Bildung von Einschlusskörperchen und niedrigen Wachstumsraten führt. Außerdem synthetisieren *G. oxydans* und *Ga. diazotrophicus*, im Gegensatz zu *E. coli* (Matsushita *et al.*, 1997), den für viele membrangebundene Dehydrogenasen wichtigen Cofaktor PQQ (Felder *et al.*, 2000; Gómez-Manzo *et al.*, 2008). Momentan existieren verschiedenste Plasmide, die zur Genexpression in Essigsäurebakterien eingesetzt werden (Condon *et al.*, 1991; Fukaya *et al.*, 1985a, b; Merfort *et al.*, 2006a, b; Okumura *et al.*, 1985; Saito *et al.*, 1997; Schleyer *et al.*, 2008; Shinjoh & Hoshino, 1995; Tonouchi *et al.*, 2003, 1994; Trček *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2010). Der Nutzen dieser Plasmide ist jedoch häufig beschränkt. Mit der Entwicklung der auf dem Vektor pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995) basierenden Expressionsvektoren pBBR1p264 und pBBR1p452, die einen konstitutiven starken bzw. moderaten Promotor tragen, wurde bereits ein wichtiger Schritt zur Verbesserung der Expressionssysteme für *G. oxydans* gemacht (Kallnik *et al.*, 2010). Durch die Wahl des Promotors kann hier bestimmt werden, wie stark ein in die Vektoren eingebrachtes Gen exprimiert wird. Während sich ein starker Promotor vor allem für die Überproduktion löslicher Proteine eignet, ist ein moderater Promotor meist besser für die oft schwierige Überproduktion von Membranproteinen geeignet.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Verschiedene membrangebundene Dehydrogenasen, wie z. B. die Aldehyd-Dehydrogenase (Adachi *et al.*, 1980) und die Arabitol-/Sorbitol-/Glycerol-Dehydrogenase (Adachi *et al.*, 2001; Matsushita *et al.*, 2003) aus *G. oxydans* sowie die Alkohol-Dehydrogenase (Gómez-Manzo *et al.*, 2008) und die Aldehyd-Dehydrogenase (Gómez-Manzo *et al.*, 2010a) aus *Ga. diazotrophicus* wurden bereits aus Membranen aufgereinigt und charakterisiert. Die bisher beschriebenen Verfahren zur Aufreinigung von Membranproteinen sind jedoch aufwändig und zeitintensiv. Deshalb sollte in dieser Arbeit, aufbauend auf den für *G. oxydans* zur Verfügung stehenden Expressionsvektoren pBBR1p264 und pBBR1p452, ein System zur Überproduktion und Aufreinigung von Membranproteinen aus Essigsäurebakterien entwickelt werden. Die Aufreinigung der überproduzierten Proteine sollte dabei über einen Affinitätstag erfolgen. Wichtig war in diesem Zusammenhang, dass die Affinitätschromatographie auch bei

dem Einsatz von Detergenzien möglich sein sollte, die zur Solubilisierung der Membranproteine verwendet werden müssen. Zunächst sollte anhand eines löslichen Proteins aus *G. oxydans*, Gox1801, gezeigt werden, dass die Überproduktion und Aufreinigung unter Verwendung des modifizierten Expressionssystems möglich ist. Im Anschluss sollte die Funktion des gereinigten, bisher nicht-charakterisierten Enzyms untersucht werden. Als Modellprotein zur homologen Produktion von Membranproteinen wurde die membrangebundene, PQQ-abhängige Glukose-Dehydrogenase (mGDH) aus *G. oxydans* eingesetzt. Dieses Protein ist das Schlüsselenzym im oxidativen Metabolismus von *G. oxydans* und katalysiert die Oxidation von Glukose zu δ -Glukonolakton, das dann chemisch oder enzymatisch zu Glukonat hydrolysiert wird (Matsushita *et al.*, 1994). Das entsprechende Enzym aus *G. suboxydans* wurde zuvor bereits über konventionelle Säulenchromatographie aufgereinigt und charakterisiert (Ameyama *et al.*, 1981). Neben der Aufreinigung des aktiven Enzyms unter Verwendung eines Affinitätstags sollten die Auswirkungen der mGDH-Überproduktion auf die Atmungskette von *G. oxydans* untersucht werden. Nach erfolgreicher Überproduktion und Aufreinigung des Modell-Membranproteins sollte das Expressionssystem zur Charakterisierung der putativen membrangebundenen Dehydrogenase Gox1857 eingesetzt werden. Dieses Enzym aus *G. oxydans* wurde anhand von Deletionsmutanten als Inositol-Dehydrogenase beschrieben (Hölscher *et al.*, 2007). Patente geben jedoch Hinweise darauf, dass es sich bei dem Enzym um eine L-Sorboson-Dehydrogenase handelt, die L-Sorboson direkt zu L-Ascorbinsäure umsetzen kann (Berry *et al.*, 2010, 2012; Beuzelin-Ollivier *et al.*, 2012). Andere L-Sorboson-Dehydrogenasen setzen L-Sorboson zu 2-Keto-L-Gulonsäure um, aus der chemisch L-Ascorbinsäure hergestellt wird (Saito *et al.*, 1997). Ein Enzym, das die direkte Umsetzung von L-Sorboson zu L-Ascorbinsäure katalysiert, wäre dementsprechend von großer biotechnologischer Bedeutung, da so ein Schritt in der Synthese von Vitamin C eingespart werden könnte. Eine Charakterisierung des gereinigten Enzyms Gox1857 könnte in dieser Arbeit Aufschluss über die tatsächliche Funktion liefern. Um die Anwendung des für *G. oxydans* entwickelten Systems zur Überproduktion und Aufreinigung von Membranproteinen auf andere Essigsäurebakterien zu übertragen, sollte außerdem eine putative membrangebundene L-Sorboson-Dehydrogenase aus *Ga. diazotrophicus* homolog überproduziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), VWR (Darmstadt, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Succinat-Semialdehyd war von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland).

Enzyme wie Restriktionsendonukleasen, alkalische Phosphatase, T4 DNA-Ligase, DNase I, Taq DNA-Polymerase, Phusion DNA-Polymerase und PCR-Reagenzien wurden von Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) bezogen.

2.1.1 Herstellung von γ -Hydroxybutyrat

Geringe Mengen (< 1 g) Natrium- γ -Hydroxybutyrat wurden durch alkalische Hydrolyse von γ -Butyrolacton nach Marvel & Birkhimer (1929) synthetisiert und das Produkt durch Kernspinresonanzspektroskopie (Instrument: Bruker Avance DPX 300, Lösungsmittel: MeOD₄) überprüft:

¹H NMR (300 MHz, MeOD₄, RT) δ 3,57 (2H, t, $J = 6,5$), 2,24 (2H, t, $J = 7,37$), 1,81 (2H, p, $J = 6,9$, $J = 6,78$)

¹³C NMR (75 MHz, MeOD₄, RT) δ 182,7 (C_q), 63,2 (CH₂), 35,9 (CH₂), 30,4 (CH₂)

Zum Vergleich wurde auch eine Analyse des Ausgangsstoffs γ -Butyrolacton durch Kernspinresonanzspektroskopie (Instrument: Bruker Avance DPX 400 bzw. DPX 300, Lösungsmittel: MeOD₄) durchgeführt:

¹H NMR (400 MHz, MeOD₄, RT) δ 4,35 (2H, t, $J = 7,07$), 2,49 (2H, t, $J = 8,17$), 2,25 (2H, m)

¹³C NMR (75 MHz, MeOD₄, RT) δ 180,7 (C_q), 70,2 (CH₂), 28,6 (CH₂), 23,1 (CH₂)

Die Synthese von γ -Hydroxybutyrat wurde durch die Kernspinresonanzspektroskopie validiert. Die ermittelten Daten für γ -Hydroxybutyrat stimmten mit Werten aus der Literatur überein (Smeenk *et al.*, 2012) und die Verschiebungen im ^1H -Spektrum von γ -Hydroxybutyrat und γ -Butyrolacton waren fast identisch mit denen, die von Del Signore *et al.* (2005) für diese Substanzen gezeigt wurden.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Organismen, Medien und Kulturbedingungen

2.2.1.1 Organismen

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 1 beschriebenen Stämme *Gluconobacter oxydans* 621H, *Gluconobacter oxydans* ΔhsdR , *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Escherichia coli* DH5 α und *Escherichia coli* NEB 5-alpha verwendet.

Tabelle 1: Verwendete Organismen

Stamm	Beschreibung	Quelle
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H (DSM 2343)	Wildtyp, Cef^{R}	De Ley <i>et al.</i> (1984)
<i>Gluconobacter oxydans</i> ΔhsdR	ΔhsdR Derivat von <i>G. oxydans</i> 621H (Deletion von <i>gox2567</i>)	Bringer-Meyer, Forschungszentrum Jülich GmbH
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (DSM 5601)	Wildtyp, Cef^{R}	Gillis <i>et al.</i> (1989)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α (DSM 6897)	F^- , <i>supE44</i> , $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$, $\phi 80d$, <i>lacZ</i> Δ M15, <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk⁻mk⁺</i>), <i>thi-1</i> , λ^- , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan (1983)
<i>Escherichia coli</i> NEB 5-alpha	Derivat von <i>E. coli</i> DH5 α <i>fhuA2</i> $\Delta(\text{argF-lacZ})\text{U169}$ <i>phoA</i> <i>glnV44</i> $\phi 80\Delta(\text{lacZ})\text{M15}$ <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland

2.2.1.2 Medien und Kulturbedingungen

Alle aufgeführten Medien wurden zur Sterilisation für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zu dem jeweiligen Medium gegeben.

G. oxydans und *Ga. diazotrophicus* wurden aerob in Hefe-Mannitol-Medium (YM) bei 30 °C und 150 - 200 Upm angezogen. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde dem Medium Cefoxitin in einer Endkonzentration von 50 µg/mL zugegeben. Je nach Volumen erfolgte die Kultivierung in 50 mL Kunststoffröhrchen oder in Schikanekolben.

YM-Medium (Hefe-Mannitol-Medium)

Hefeextrakt	6,0 g
Mannitol	20,0 g
dH ₂ O	auf 1000 mL

Alternativ wurde *G. oxydans* für Wachstumsversuche auch in Hefe-Glukose-Medium (YG) kultiviert.

YG-Medium (Hefe-Glukose-Medium)

Hefeextrakt	6,0 g
D-Glukose	20,0 g
dH ₂ O	auf 1000 mL

E. coli wurde in LB-Medium (Lysogeny Broth) (Miller, 1972) angezogen und aerob bei 37 °C und 150 - 200 Upm inkubiert.

LB-Medium (Lysogeny Broth)

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
dH ₂ O	auf 1000 mL

Zur Selektion und Erhaltung von Plasmiden in *G. oxydans*, *Ga. diazotrophicus* and *E. coli* wurden 50 µg/mL Kanamycin oder 100 µg/mL Ampicillin zu den autoklavierten Medien hinzugefügt.

2.2.2 Stammkulturen

Für Stammkulturen von *G. oxydans* und *Ga. diazotrophicus* wurden 100 µL steriles Dimethylsulfoxid (DMSO) zu 900 µL einer Übernachtskultur gegeben und bei –70 °C gelagert. Stammkulturen von *E. coli* wurden durch Zugabe von 300 µL sterilem 87 % Glycerol zu 600 µL einer Übernachtskultur angelegt und ebenfalls bei –70 °C gelagert.

2.2.3 Bestimmung von Wachstum und Wachstumsparametern

Das Wachstum von Bakterienkulturen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) in 1 mL Kunststoffküvetten mit einem Helios Epsilon Photometer (Thermo Scientific, Waltman, USA) bestimmt. Hierbei diente das entsprechende unbeimpfte Medium als Leerwert. Bei hohen Zelldichten wurden die Proben bis auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,3 verdünnt, da nur in diesem Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und optischer Dichte besteht. Zur Ermittlung der Wachstumsparameter wurden die Messwerte in der exponentiellen Wachstumsphase logarithmiert (\ln) gegen die Zeit aufgetragen und die Steigung der sich daraus ergebenden Geraden stellte die Wachstumsrate μ dar. Die Verdopplungszeit d konnte als $\ln(2)/\mu$ berechnet werden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von RNA und DNA

2.3.1.1 Präparation von Plasmiden

Plasmide wurden aus 2 - 4 mL der entsprechenden *E. coli* Kultur mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Hierbei werden die Zellen durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Plasmid-DNA über eine Silica-Membran aufgereinigt.

2.3.1.2 Isolierung von chromosomaler DNA

Chromosomale DNA aus *G. oxydans* und *Ga. diazotrophicus* wurde mit dem GeneJET Genomic DNA Purification Kit der Firma Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) nach dem Protokoll für Gram-negative Bakterien isoliert.

2.3.1.3 Isolierung von RNA

Um RNasen zu inaktivieren, wurden ddH₂O und alle Verbrauchsmaterialien doppelt autoklaviert. Die RNA-Isolierung erfolgte aus 100 mL Kulturen von *G. oxydans* Δ *hdsR* oder *Ga. diazotrophicus*. Die Zellen wurden bei einer OD_{600 nm} von 0,8 - 1,2 durch Zentrifugation geerntet (6.000 x g, 4 °C, 15 min), das Pellet in 5 mL TRI-Reagenz (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) resuspendiert und in 1 mL Aliquots in 2 mL Mikroreaktionsgefäßen aufgeteilt. Die Aliquots wurden bei –70 °C gelagert oder für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 - 200 µL 1-Bromo-3-chloropropan zu jedem Aliquot gegeben und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Gemisch wurde für 10 Minuten bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert und die klare wässrige (obere) Phase, die die RNA enthielt, in ein neues 1,5 mL Mikroreaktionsgefäß überführt. Pro mL TRI-Reagenz wurden 500 µL Isopropanol zugegeben und für 5 - 10 Sekunden gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation bei –20 °C wurde die RNA durch Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C für 10 Minuten pelletiert. Die Pellets wurden mit 1 mL 75 % Ethanol pro mL TRI-Reagenz gewaschen und dann getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden vereinigt und in insgesamt 90 µL ddH₂O resuspendiert. Um Kontaminationen mit DNA zu entfernen, wurden 10 µL DNase I Puffer und 2 µL RNase-freie DNase I (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) zugegeben und der Ansatz für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nachdem weitere 2 µL DNase I zugegeben wurden, wurde nochmals für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA mit dem SurePrep RNA Cleanup and Concentration Kit von Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

2.3.2 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die Konzentration von isolierter DNA und RNA wurde photometrisch mit einem Jasco V-600 Spectrophotometer (Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) bestimmt (Sambrook & Russel, 2001). Hierzu wurde 1 µL DNA bzw. RNA mit 99 µL ddH₂O verdünnt und in einer 100 µL

Quarzküvette die Absorption bei 260 nm (A_{260}) gegen ddH₂O als Leerwert gemessen. Die Konzentrationen der DNA und RNA wurden wie folgt berechnet:

$$\mu\text{g DNA/mL} = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50$$

$$\mu\text{g RNA/mL} = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

Da Proteine aufgrund ihrer aromatischen Aminosäuren ein Absorptionsmaximum bei 280 nm (A_{280}) aufweisen, zeigt das Verhältnis der A_{260} zur A_{280} Verunreinigungen von DNA oder RNA mit Proteinen an. Bei reiner DNA beträgt dieses Verhältnis 1,8 und bei reiner RNA liegt der Wert bei 2.

2.3.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Die Methode der denaturierenden Agarosegelelektrophorese wurde angewandt, um die Qualität isolierter RNA zu überprüfen. Zur Herstellung der Gele wurde 1 g RNase-freie Agarose in 72 mL ddH₂O gelöst und nach Abkühlen der Lösung auf 60 °C wurden 10 mL 10 x MOPS-Laufpuffer sowie 18 mL 37 % Formaldehyd zugegeben. 1 µL der RNA-Probe wurde mit 4 µL Ladebuffer gemischt und durch Erhitzen auf 65 – 70 °C für 10 Minuten denaturiert. Anschließend wurden die Proben aufgetragen und das Gel in 1 x MOPS-Laufpuffer bei 70 V laufen gelassen. Im Anschluss konnte die RNA mit GelRed visualisiert werden (siehe Abschnitt 2.3.6).

10 x MOPS-Laufpuffer

0,4 M MOPS, pH 7.0	8,371 g
0,1 M Natriumacetat	1,261 g
0,01 M EDTA	0,372 g
ddH ₂ O	auf 100 mL

Ladebuffer

Formamid	95 %
EDTA	18 mM
SDS	0,025 %
Xylencyanol	0,02 %
Bromphenolblau	0,02 %

2.3.4 Plasmide und Oligonukleotide

2.3.4.1 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pBBR1MCS-2	<i>mob, rep, Kan^R, lacZ</i>	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pBBR1p264	pBBR1MCS-2 Derivat mit der Promotorregion des Gens <i>gox0265</i>	Kallnik <i>et al.</i> (2010)
pBBR1p452	pBBR1MCS-2 Derivat mit der Promotorregion des Gens <i>gox0452</i>	Kallnik <i>et al.</i> (2010)
pASK-IBA3plus	C-terminaler Strep-Tag II, <i>Amp^R</i>	IBA GmbH
pASG-IBA103	One-Strep-Tag (auch Twin-Strep-Tag genannt), <i>Amp^R</i>	IBA GmbH
pBBR1p264-ST	pBBR1p264 mit Strep-Tag II aus pASK-IBA3plus	diese Arbeit
pBBR1p452-ST	pBBR1p452 mit Strep-Tag II aus pASK-IBA3plus	diese Arbeit
pBBR1p264-Streplong	pBBR1p264 Derivat mit modifiziertem Strep-Tag (verlängerte Linkersequenz)	Zeiser <i>et al.</i> (2014)
pBBR1p452-Streplong	pBBR1p452 Derivat mit modifiziertem Strep-Tag (verlängerte Linkersequenz)	diese Arbeit
pBBR1p264- <i>gox1801</i> -ST	pBBR1p264-ST Derivat, exprimiert <i>gox1801</i> mit fusioniertem Strep-Tag II	diese Arbeit
pASK3- <i>gox0265</i>	pASK-IBA3plus Derivat mit <i>gox0265</i> und C-terminalem Strep-Tag II	diese Arbeit
pBBR1p452- <i>gox0265</i> -ST	pBBR1p452 Derivat, exprimiert <i>gox0265</i> mit fusioniertem Strep-Tag II	diese Arbeit
pBBR1p452- <i>gox0265</i> -Streplong	pBBR1p452 Derivat, exprimiert <i>gox0265</i> mit fusioniertem Streplong	diese Arbeit
pBBR1p452- <i>gox0265</i> -OneST	pBBR1p452 Derivat, exprimiert <i>gox0265</i> mit fusioniertem One-Strep-Tag	diese Arbeit
pBBR1p452- <i>gox1857</i> -ST	pBBR1p452-ST Derivat, exprimiert <i>gox1857</i> mit fusioniertem Strep-Tag II	diese Arbeit
pBBR1p452- <i>gdi3764</i> -ST	pBBR1p452-ST Derivat, exprimiert <i>gdi_3764</i> mit fusioniertem Strep-Tag II	diese Arbeit
pBBR1p452- <i>gdi3764</i> -OneST	pBBR1p452 Derivat, exprimiert <i>gdi_3764</i> mit fusioniertem One-Strep-Tag	diese Arbeit

2.3.4.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide (Primer) wurden mit dem Programm Primer D'Signer (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland) bzw. Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3>, zuletzt geprüft 30.12.13) erstellt oder manuell entworfen und durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Sequenzen aller zur Klonierung, Sequenzierung und RT-qPCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Sequenzen der zur Klonierung, Sequenzierung und RT-qPCR verwendeten Oligonukleotide. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

Oligonukleotid	Sequenz	Restriktionsschnittstelle
pBBR1-f	ACTCACTATAGGGCGAATTG	
pBBR1-r	CCCAGGCTTTACTTTATG	
Upstrep_f	TTAC <u>CGATCGGTGCGGGCCTCTTC</u>	<i>PvuI</i>
Upstrep_r	GGGCGCGCTACGTACAAGCGCGCA ATTAACCCTC	<i>AscI, SnaBI</i>
Dostrep_f	<u>TACGTAGGCGCGCCCTGGAGCCACCC</u> GCAGTTCGAA	<i>SnaBI, AscI</i>
Dostrep_r	ACT <u>ATTAATCCGATTTAGAGCTTGAC</u> GG	<i>AseI</i>
pASK_f	GAGTTATTTTACCACTCCCT	
pASK_r	CGCAGTAGCGGTAAACG	
upGox452-f	ATAGAGCTCGGCTTCGTGGTGAACGC C	<i>SacI</i>
gox1801ClaI-f	CATGATCGATACGCATCACAAGGAG CCA	<i>ClaI</i>
gox1801SnaBI-r	TCGATACGTATTTATGGGGAAGATTG GC	<i>SnaBI</i>
gox0265-p3_f	ATGGTAGGTCTCAAATGTGATGCATC AGAACAACAGAT	<i>BsaI</i>
gox0265-p3_r	ATGGTAGGTCTCAGCGCTTTTCTGAT CGGGCAGGGCGTAG	<i>BsaI</i>
pASK3EcoRI_f	TGCGAATTCTGATGCATCAGAACAAC AGA	<i>EcoRI</i>
pASK3ST_r	GCTGCTCGAGAGGTCAAGCTTATTA	<i>XhoI</i>
gox0265_f	ACGGAATTCTGATGCATCAGAACA CAGATCCAG	<i>EcoRI</i>

gox0265SnaBI_r	GTACT <u>ACGT</u> ATTTCTGATCGGGCAGG GCGTA	<i>SnaBI</i>
Streplong_r	ATCCTCGAGGTCGACGGTATCG	<i>XhoI</i>
pASG-for	<u>TACGTA</u> AGCGCTTGGAGCCACCCGC	<i>SnaBI</i>
pASG-rev	<u>ATTAAT</u> GGAAGCCGGCGAACGTGG	<i>AseI</i>
gox1857EcoRI-f	GATC <u>GAATTC</u> GTCGCGCCAGACGCCT CC	<i>EcoRI</i>
gox1857SnaBI-r	GTACT <u>ACGT</u> ATTCTTCGGAGGGCAGG GCGT	<i>SnaBI</i>
gdi3764_MfeIf	CATG <u>CAATTG</u> TCAATTCCGGCACCCC GGCT	<i>MfeI</i>
gdi3764_SnaBIr	GTACT <u>ACGT</u> ATTGTCCCTGCGGCATG CCCG	<i>SnaBI</i>
RTgap_f	TCCGACTTCAACCATGACAA	
RTgap_r	GTTGTCGTACCACGAGCAGA	
RTmgdh_f	AGGCATTGACGTCTACACC	
RTmgdh_r	ACGACACGATCCAGGAGTTC	
RT_gdi3764-for2	ATATCCTGGTTCGCGGAATC	
RT_gdi3764-rev2	ATCCGGTCCGGGCTTTTAT	
RT_gdia2968-for	ATCAGGTGGCGTTCAAGGT	
RT_gdia2968-rev	CTTCGTCTTGCCCTTCTGG	
RT-gox1801-for	CATCTTCTGTGTGCCGAATG	
RT-gox1801-rev	GGTATCGAGAACGAGCTTGC	
RT-gox0378-for	AATACCGTCATGAACGCACA	
RT-gox0378-rev	TGGTTACGCTCGGAAAGAAG	

2.3.5 Polymerase-Kettentreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur spezifischen Amplifizierung von Nukleotidsequenzen *in vitro*. Ausgehend von zwei Oligonukleotiden (Primern), die so mit den entgegengesetzten Strängen hybridisieren, dass sie die Zielsequenz flankieren, erfolgt die DNA-Synthese durch eine Polymerase. Ein PCR-Zyklus besteht dabei aus drei Schritten: 1. Hitze-Denaturierung der DNA zu Einzelsträngen, 2. Anlagerung der Primer an ihre komplementären Sequenzen (Annealing), 3. Amplifizierung der DNA-Sequenz ausgehend von den Oligonukleotiden durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (Elongation) (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988).

Die Anlagerungstemperatur der Primer ist abhängig von der Schmelztemperatur und liegt meist 3 – 5 °C unter dieser. Die Elongationszeit hängt von der Geschwindigkeit der verwendeten Polymerase und der Größe der Amplikons ab. Die PCRs wurden auf Eis angesetzt und in einem MyCycler (Bio-Rad, München, Deutschland) oder C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend durch Agarosegelelektrophorese überprüft (siehe Abschnitt 2.3.6).

2.3.5.1 PCR zur Amplifizierung von Genen

Zur Amplifizierung von Genen, die kloniert werden sollten, wurde die Phusion DNA-Polymerase (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet und genomische DNA als Matrize eingesetzt.

	µL/Reaktion	Endkonzentration
DNA-Matrize	0,5	
Vorwärtsprimer (10 µM)	1	0,5 µM
Rückwärtsprimer (10 µM)	1	0,5 µM
dNTPs (25 mM)	0,2	250 µM
5 x HF Puffer	4,0	1 x
Phusion DNA-Polymerase	0,25	0,5 U
ddH ₂ O	13,05	
Gesamt	20 µL	

PCR-Bedingungen:

Anfangsdenaturierung	98 °C	10 min
Denaturierung	98 °C	10 s
Annealing	X °C	15 - 30 s
Elongation	72 °C	15 - 30 s/kb, Wiederholung ab Denaturierung 33 x
Endelongation	72 °C	5 min
Lagerung	4 °C	

2.3.5.2 Kolonie-PCR

Um nach einer Klonierung Zellen zu identifizieren, die ein Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment enthielten, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Die Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und in 10 µL sterilem ddH₂O

resuspendiert. 5 μL dieser Zellsuspension wurden als Matrize in der PCR eingesetzt, zu den restlichen 5 μL wurden 70 μL Medium mit entsprechendem Antibiotikum gegeben und bei 4 °C gelagert. Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

	$\mu\text{L}/\text{Reaktion}$	Endkonzentration
DNA-Matrize	5,0	
Vorwärtsprimer (10 μM)	0,5	0,25 μM
Rückwärtsprimer (10 μM)	0,5	0,25 μM
dNTPs (25 mM)	0,16	200 μM
10 x Dream Taq Green Puffer	2,0	1 x
DMSO 100 %	1,0	5 %
Dream Taq DNA-Polymerase	0,25	1,25 U
ddH ₂ O	10,59	
Gesamt	20 μL	

PCR-Bedingungen:

Anfangsdenaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung	95 °C	45 s
Annealing	X °C	45 s
Elongation	72 °C	1 min/kb, Wiederholung ab Denaturierung 33 x
Endelongation	72 °C	10 min
Lagerung	4 °C	

2.3.5.3 RT-qPCR

Die RT-qPCR (Real-Time quantitative reverse Transkriptions-PCR) wurde eingesetzt, um die relative Menge der mRNA eines Zielgens in einer Präparation von Gesamt-RNA im Vergleich zu einem Referenzgen zu bestimmen. Dazu wurden der iCycler (Bio-Rad, München, Deutschland) und das SYBR Green RT-PCR Kit nach Angaben des Herstellers (Quiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die eingesetzten Primer wurden mit dem Programm Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>, zuletzt geprüft 22.12.13) generiert und die entsprechenden Amplikons waren 100 – 150 bp lang. Als konstitutiv exprimiertes Referenzgen diente entweder das Gen für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase oder das Gen für das ribosomale Protein L23. Als Kontrolle für die Reinheit der RNA wurden für jede Probe auch Reaktionen ohne reverse Transkriptase angesetzt. Das PCR-Programm

beinhaltete einen Schritt für die reverse Transkription der mRNA in cDNA am Anfang, sowie am Ende einen Schritt, in dem die PCR-Produkte anhand einer Schmelzkurve überprüft wurden. Die Reaktionen wurden in speziell für die quantitative PCR geeigneten 96-well-Platten wie folgt angesetzt:

1. Master-Mix:

	μL/Reaktion
2 x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	12,25
QuantiTect RT Mix	0,25
Gesamt	12,5

2. Primer-Mix

	μL/Reaktion
Vorwärtsprimer (5 pmol/μL)	5
Rückwärtsprimer (5 pmol/μL)	5
Gesamt	10

3. RNA

In jeden Ansatz wurden 2,5 μL RNA mit einer Konzentration von 100 ng/μL gegeben.

RT-qPCR Programm:

Schritt	Zeit	Temperatur	
Reverse Transkription	30 min	50 °C	
Aktivierung der Polymerase	15 min	95 °C	
Denaturierung	15 s	94 °C	x 35
Annealing	30 s	50 – 55 °C	
Elongation	30 s	72 °C	
Schmelzkurve	10 s/°C	35 °C → 95 °C	x 61

Mit der iCycler-Software wurde für jede Reaktion der Cp-Wert (Crossing Point) ermittelt. Dieser gibt den PCR-Zyklus an, in dem das Fluoreszenzsignal der Probe einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Im Folgenden wurde der ΔCp-Wert als Differenz des Cp-Werts des Zielgens und des Referenzgens berechnet ($\Delta C_p = C_{p\text{Zielgen}} - C_{p\text{Referenzgen}}$). Anhand des

ΔC_p -Wertes wurde dann die relative Transkriptabundanz des Zielgens im Vergleich zu dem Referenzgen als $2^{-\Delta C_p}$ bestimmt.

2.3.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Agarosegele von 1 – 3 % wurden mit 1 x TAE-Puffer (Sambrook *et al.*, 1989) angesetzt. Die Proben wurden, sofern nicht bereits im PCR-Ansatz vorhanden (Dream Taq Green Puffer), vor dem Beladen der Geltaschen mit 6 x Glycerin-Ladepuffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Eine DNA-Leiter (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) ermöglichte das Abschätzen der Fragmentgrößen. Je nach Größe des Gels wurde eine Spannung von 70 - 120 V angelegt, sodass die negativ geladene DNA in Richtung Anode lief. Im Anschluss wurden die Nukleinsäuren durch eine Inkubation der Gele in GelRed-Lösung (3 x in Wasser, Biotium, VWR Darmstadt) angefärbt und unter UV-Licht visualisiert (INTAS Gel Imager, INTAS GmbH Digital Imaging and Microscopy, Göttingen, Deutschland).

50 x TAE-Puffer

Tris Base	242 g	2 M
EDTA 0,5 M, pH 8	100 mL	50 mM
Essigsäure (100 %)	57,1 mL	1 M

2.3.7 Restriktionsverdau

Eine sequenzspezifische Spaltung von zirkulärer (Plasmide) und linearer (PCR-Produkte) DNA erfolgte durch Restriktionsendonukleasen in 20 μ L oder 50 μ L Ansätzen. Das Puffersystem, die Inkubationstemperatur sowie die einzusetzende Enzymmenge wurden hierbei entsprechend den Angaben des Herstellers (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) für das jeweilige Restriktionsenzym bzw. die Kombination von zwei Restriktionsenzymen gewählt. Nach einer Inkubationsdauer von 1 - 4 Stunden wurden die Restriktionsenzyme bei 65 - 80 °C für 10 Minuten inaktiviert. Im Anschluss wurden die Restriktionsansätze durch Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.3.6) überprüft.

2.3.8 Behandlung von Vektoren mit alkalischer Phosphatase

Die Re-Ligation eines Vektors nach dem Schneiden mit Restriktionsenzymen kann durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase verhindert werden. Diese entfernt die 5'-Phosphatenden, sodass der Vektor im Anschluss nicht mehr mit sich selbst, sondern nur noch mit einem Fragment, dessen Phosphatenden intakt sind, ligiert werden kann (Sambrook *et al.*, 1989). Nach dem Restriktionsverdau wurden hierzu 0,5 Units FastAP (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) zu den Ansätzen gegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

2.3.9 Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen

PCR-Produkte, die mit Restriktionsendonukleasen behandelt werden sollten, sowie Restriktionsverdau, die in einer Ligation eingesetzt werden sollten, wurden mit dem GeneJET PCR Purification Kit von Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Bei Bedarf wurden auch einzelne DNA-Banden aus Agarosegelen ausgeschnitten und mit dem GeneJET Gel Extraction Kit von Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland) aufgereinigt.

2.3.10 Ligation

Mit Restriktionsendonukleasen geschnittene Vektoren und identisch behandelte DNA-Fragmente (Inserts) wurden mit der T4 Ligase (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) für eine Stunde bei Raumtemperatur ligiert. Die Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden in doppelsträngiger DNA. Ein 20 µL Ansatz enthielt die folgenden Komponenten:

	µL/Ansatz
Insert	15 µL
Vektor	2 µL
PEG 4000	0,5 µL
T4 Ligase Puffer	2 µL
T4 Ligase (5 U/µL)	1 µL
<hr/> Gesamt	<hr/> 20 µL

2.3.11 Sequenzierung

Sequenzierungen wurde von der StarSEQ GmbH (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden die Primer pBBR1-f und pBBR1-r (für Derivate von pBBR1-p264 und pBBR1p452) oder pBBR1-f und pASK-r (für Derivate von pBBR1p264-ST und pBBR1p542-ST) verwendet. Die Ansätze enthielten folgende Komponenten:

	µL/Ansatz
DNA	1
Primer (10 µM)	1
ddH ₂ O oder 10 mM Tris-HCl pH 7,5	5
<hr/>	
Gesamt	7 µL

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium, South Brisbane, Australia).

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Herstellung superkompetenter *E. coli* DH5α-Zellen

250 mL SOB-Medium wurden mit 5 mL einer *E. coli* DH5α Vorkultur angeimpft und die Kultur bei 18 °C bis zu einer OD_{600 nm} von 0,4 – 0,6 angezogen. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 2.450 x g und 4 °C geerntet. Die Zellen wurden in 80 mL gekühltem Transformationspuffer resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 10 Minuten bei 2.450 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in 15 - 20 mL Transformationspuffer resuspendiert und steriles DMSO in einer Endkonzentration von 7 % zugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation auf Eis wurden 200 µL Aliquots in auf – 70 °C vorgekühlten 1,5 mL Mikroreaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 70 °C gelagert.

SOB-Medium (Super Optimal Broth)

Hefeextrakt	5,0 g
Trypton	20,0 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
dH ₂ O	auf 990 mL

Nach dem Autoklavieren wurden 10 mL steril filtriertes 1 M MgCl₂ oder MgSO₄ zugegeben.

Transformationspuffer

PIPES	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
MnCl ₂	55 mM

Der pH wurde mit KOH auf 6,7 eingestellt.

MnCl₂ wurde steril filtriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.4.2 Transformation von *E. coli* DH5 α

Für die Transformation wurden 200 μ L kompetente *E. coli* DH5 α auf Eis aufgetaut und mit 10 - 20 μ L ligiertem Vektor gemischt. Nach 30 – 60 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42 °C unterzogen und dann für zwei Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden 500 μ L SOC-Medium zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden 100 μ L der Suspension auf LB-Agar mit selektivem Antibiotikum ausplattiert. Die restlichen Zellen wurden pelletiert (2 min, 8.000 Upm in einer Tischzentrifuge), in 100 μ L Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert.

Kompetente *E. coli* NEB 5-alpha (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) wurden nach dem Protokoll des Herstellers transformiert und dann eingesetzt, wenn eine sehr hohe Transformationseffizienz erforderlich war.

SOC-Medium (Super Optimal Broth with Catabolite Repression)

1 M steril filtrierte Glukose	0,2 mL
SOB-Medium	9,8 mL

2.4.3 Elektroporation von *G. oxydans* Δ hsdR und *Ga. diazotrophicus*

Die Elektrotransformation von *G. oxydans* Δ hsdR und *Ga. diazotrophicus* wurde nach der modifizierten Methode von Mostafa *et al.* (2002) durchgeführt. Bei dem Stamm *G. oxydans* Δ hsdR handelt es sich um ein Derivat von *G. oxydans* 621H, in dem das hsdR Gen (*gox2567*),

das für ein putatives Typ I Restriktionsenzym kodiert, deletiert wurde. Der Stamm wurde speziell für die Elektroporation entwickelt, um zu verhindern, dass eingebrachte Plasmide zerstört werden. In *E. coli* ist das Restriktionsenzym Teil eines Typ I Restriktions-Modifikationssystems, das durch die Gene *hsdR*, *hsdM* und *hsdS* kodiert wird und sowohl endonukleolytische als auch methylierende Aktivitäten besitzt (Yuan & Hamilton, 1984). Da für *Ga. diazotrophicus* kein äquivalenter Stamm zur Verfügung stand, wurde in diesem Fall der Wildtyp verwendet. Für die Elektroporation wurden 50 mL EP-Medium 3 – 5 %-ig mit einer Vorkultur von *G. oxydans* Δ *hsdR* oder *Ga. diazotrophicus* angeimpft und bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,8 - 0,9 angezogen. Pro Elektroporationsansatz wurden 2 x 2 mL Kultur in 2 mL Mikroreaktionsgefäßen geerntet (8.000 Upm, 4 °C, 5 min) und im Folgenden auf Eis gearbeitet. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 mL sterilem, vorgekühltem 1 mM HEPES gewaschen und dann jeweils 2 Pellets in 40 μ L 1 mM HEPES vereinigt. Nach Zugabe von 10 μ L sterilem, gekühltem 75 % Glycerol wurden die Zellen mit 2 μ L Plasmid gemischt und in gekühlte, sterile Elektroporationsküvetten mit einer Elektrodendistanz von 1 mm überführt (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland). In einem MicroPulser von Bio-Rad (München, Deutschland) wurden die Zellen einem elektrischen Impuls von 2,2 kV für 4 - 5 Millisekunden ausgesetzt und dann mit 800 μ L EP-Medium ohne Antibiotikum zur Regeneration in ein steriles 15 mL Kunststoffröhrchen überführt. Nach Regeneration der Zellen über Nacht bei 30 °C auf einem Rundschüttler wurden 100 μ L der Suspension, sowie die abzentrifugierten und in 100 μ L Medium resuspendierten restlichen Zellen auf YM-Agar mit selektivem Antibiotikum ausplattiert.

EP-Medium (Elektroporationsmedium)

8,0 % Mannitol	80 g
1,5 % Hefeextrakt	15 g
0,25 % $MgSO_4 \times 7 H_2O$	2,5 g
0,05 % Glycerol	0,5 g
0,15 % $CaCl_2$	1,5 g
dH ₂ O	auf 1000 mL

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6 eingestellt. $MgSO_4$ und $CaCl_2$ wurden 100-fach konzentriert angesetzt, steril filtriert und nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.4.4 Herstellung ruhender Zellen

Für die Herstellung von ruhenden Zellen wurde eine 100 mL *G. oxydans* Kultur in YM-Medium bis zur späten exponentiellen Phase angezogen ($OD_{600\text{ nm}} = 0,8 - 1,2$). Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet ($5.000 \times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 20 min) und zweimal mit 20 mL 40 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6 oder 7) gewaschen. Dabei wurde auf Eis und mit vorgekühltem Puffer gearbeitet. Am Ende wurde das Zellpellet in 10 mL des Puffers resuspendiert. Sollte die Aktivität der ruhenden Zellen anhand der künstlichen Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP gemessen werden, so mussten die Zellen mit Toluol behandelt werden, um einen effektiven Transport der Elektronenakzeptoren über die äußere Membran in das Periplasma zu ermöglichen (Park *et al.*, 1994). Dazu wurden die ruhenden Zellen für 10 Minuten in Puffer mit 10 % Toluol auf Eis unter leichtem Schütteln inkubiert und dann zweimal mit Puffer gewaschen, um das Toluol zu entfernen.

2.4.5 Produktion und Reinigung von Proteinen

2.4.5.1 Homologe Produktion von Proteinen in *G. oxydans* Δ hsdR und *Ga. diazotrophicus*

Zur homologen Expression von Genen in *G. oxydans* Δ hsdR und *Ga. diazotrophicus* wurden Plasmide verwendet, die auf den Vektoren pBBR1p264 und pBBR1p452 mit einem konstitutiven starken bzw. moderaten Promotor basierten (Kallnik *et al.*, 2010). Zur Ermöglichung der Aufreinigung von produzierten Proteinen über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie enthielten die Vektoren neben der Sequenz des zu exprimierenden Gens auch die Sequenz für einen C-terminalen Strep-Tag. Die Expressionsvektoren wurden durch Elektroporation in *G. oxydans* Δ hsdR und *Ga. diazotrophicus* eingebracht. Entsprechende Kulturen wurden in 400 – 500 mL YM-Medium mit Antibiotikum angezogen und bis zur späten exponentiellen Phase ($OD_{600\text{ nm}} = 0,8 - 1,2$) inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet ($6.000 \times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 15 min) und von diesem Zeitpunkt an immer auf Eis gekühlt.

2.4.5.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die geernteten Zellen wurden in 10 mL Puffer W (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8 zur Aufreinigung von löslichen Proteinen) oder 40 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 (zur Präparation von Membranfraktionen) resuspendiert. Nach Zugabe von 5 μL Protease-Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und einer Spatelspitze Lysozym (Serva,

Heidelberg, Deutschland) wurden die Zellen für 15 Minuten bei 50 % Amplitude durch Ultraschall (Branson Sonifier Cell Disruptor mit einem Branson Ultra Sonics Konverter, Danbury, USA) unter Kühlung (Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württ, Deutschland) aufgeschlossen. Anschließend wurde das Lysat abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 12.000 x g für die Aufreinigung von löslichen Proteinen bzw. 1.300 x g für die Präparation von Membranen).

2.4.5.3 Aufreinigung von löslichen Proteinen über Strep-Tactin-

Affinitätschromatographie

Für die Isolierung von rekombinanten Strep-Tag-Fusionsproteinen aus dem Zelllysate wurde eine Polypropylensäule (Quiagen, Hilden, Deutschland) mit Strep-Tactin Sepharose der Firma IBA GmbH (Göttingen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers vorbereitet und eingesetzt (1 mL Säulenbettvolumen). Dabei bindet der Strep-Tag hochselektiv an das Strep-Tactin des Säulenmaterials. Alle Schritte wurden bei 4 °C mit vorgekühlten Puffern durchgeführt. Das abzentrifugierte Zelllysate wurde auf die Säule gegeben und das gebundene Protein anschließend mit 3 x 3 Säulenbettvolumen Puffer W (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 6 x 0,5 Säulenbettvolumen Puffer E (Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin). Durch das im Elutionspuffer vorhandene Desthiobiotin wurde der Strep-Tag von den Bindestellen am Strep-Tactin verdrängt und das Fusionsprotein so eluiert. Die Regenerierung der Säule erfolgte mit Puffer R (Puffer W mit 1 mM HABA). Das darin enthaltene HABA verdrängte wiederum das Desthiobiotin und konnte anschließend mit Puffer W von der Säule gewaschen werden.

2.4.5.4 Präparation von Membranfraktionen

Die Präparation der Membranfraktion erfolgte durch Ultrazentrifugation des Zellextraktes bei 100.000 x g und 4 °C für 60 Minuten. Das entstandene Pellet wurde mit Puffer W (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 8) oder 40 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 gewaschen und anschließend in 1 mL des Puffers resuspendiert.

2.4.5.5 Solubilisierung und Aufreinigung von Membranproteinen über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Die Solubilisierung von Proteinen aus einer Membranpräparation erfolgte in insgesamt 10 mL Puffer W mit 1 % des jeweils verwendeten Detergenz. Die Ansätze wurden 1 – 4 Stunden

unter leichtem Rühren auf Eis inkubiert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Morgen wurde erneut für ca. 30 Minuten auf Eis gerührt und anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch Ultrazentrifugation abgetrennt (100.000 x g, 4 °C, 60 min). Der Überstand enthielt das zu isolierende Strep-Tag-Fusionsprotein und wurde für eine Stunde mit 2 mL 50 % Strep-Tactin Sepharose (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland) unter leichtem Rühren auf Eis inkubiert. So sollte die Bindung des Strep-Tags an das Säulenmaterial verbessert werden. Im Anschluss konnte die Aufreinigung wie für lösliche Proteine beschrieben (siehe Abschnitt 2.4.5.3) durchgeführt werden. Dabei enthielten alle Puffer 0,1 % des Detergenz, um ein Präzipitieren des solubilisierten Proteins auf der Säule zu verhindern.

2.4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.4.6.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration in Membran- und Proteinfractionen ohne Detergenz wurde mit dem Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) bestimmt. Dieser Nachweis basiert auf dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250, dessen Absorptionsmaximum sich bei der Bindung an Proteine von 465 nm auf 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). Es wurden jeweils 20 µL Probe (bei Bedarf verdünnt) mit 980 µL Bradford-Reagenz gemischt und für 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm in 1 mL Kunststoffküvetten mit einem Helios Epsilon Photometer (Thermo Scientific, Waltman, USA) gegen einen Leerwert (Bradford-Reagenz mit 20 µL Puffer) gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration anhand der Absorption diente eine Standardkurve mit Rinderserumalbumin (BSA), das dazu in Konzentrationen zwischen 0 und 1 mg/mL eingesetzt wurde. Grundsätzlich wurden für alle Proben Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.4.6.2 Biuret-Test

Die Bestimmung des Proteingehalts ruhender Zellen erfolgte in einem modifizierten Biuret-Test (Gornall *et al.*, 1949; Schmidt *et al.*, 1963). Diese Methode basiert darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren und dabei violette Komplexe entstehen. Für den Test wurden 50 - 100 µL der ruhenden Zellen eingesetzt und das Volumen mit dH_2O auf 400 µL aufgefüllt. Zu jeder Probe wurden 40 µL der Lösung A zugegeben und die Ansätze dann für 20 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Ansätze auf Eis abgekühlt, 160 µL

der Lösung B zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Vor dem Messen der Absorption bei 546 nm mit einem Helios Epsilon Photometer (Thermo Scientific, Waltman, USA) wurden die Proben abzentrifugiert (4.000 x g, RT, 20 min). Als Leerwert diente ein Ansatz, in den Puffer anstatt der Zellsuspension gegeben wurde. Es wurden Doppelbestimmungen angesetzt und zur Berechnung der Proteinkonzentration diente eine Standardkurve mit BSA, das in Konzentrationen zwischen 0 und 2 mg/mL eingesetzt wurde.

Lösung A

NaOH 16 g
dH₂O auf 100 mL

Lösung B

NaOH (als erstes gelöst) 0,4 g
KNa-Tartrat x 7 H₂O 0,5 g
CuSO₄ x 5 H₂O 0,1 g
KJ 0,25 g
dH₂O auf 40 mL

2.4.6.3 BCA-Test

Bei einem BCA-Test handelt es sich um einen modifizierten Biuret-Test, bei dem die Sensitivität durch die Bildung tiefvioletter Komplexe aus einwertigen Kupferionen und Bicinchoninsäure (BCA) erhöht wird. Die Proteinbestimmung erfolgte in diesem Fall in Mikrotiterplatten unter Verwendung des BCA Protein Assay Kits der Firma Novagen (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Der Vorteil dieses Tests ist die erhöhte Sensitivität und die Kompatibilität der Reaktion mit verschiedenen Detergenzien. Für die Bestimmung des Proteingehalts wurden jeweils 20 - 25 µL der Probe eingesetzt und 200 µL des BCA-Reagenzes zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wurde in einem Nano Quant infinite M200 Plattenlesegerät (Tecan, Crailsheim, Deutschland) die Absorption bei 550 nm gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Standardkurve mit BSA in Konzentrationen zwischen 0 und 250 µg/mL angelegt, wobei für alle Proben Doppelbestimmungen erfolgten.

2.4.6.4 DC Protein Assay Kit

Das DC Protein Assay Kit der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) wurde zur kolorimetrischen Bestimmung der Proteinkonzentration in detergenzhaltigen Proben eingesetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Angaben des Herstellers in Mikrotiterplatten. Zu jeweils 20 µL der Probe wurden 10 µL des Reagenzes A' sowie 80 µL des Reagenzes B gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend

wurde die Absorption bei 750 nm mit einem Nano Quant infinite M200 Plattenlesegerät (Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und zur Berechnung der Proteinkonzentration diente eine Standardkurve mit BSA (0 – 500 µg/mL).

2.4.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

2.4.7.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (1970) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Acrylamidkonzentration in dem Sammelgel betrug dabei 5 % (w/v) und die Konzentration in dem Trenngel variierte je nach Größe des zu analysierenden Proteins zwischen 10 und 12,5 % (w/v). Für die Elektrophorese wurden vertikale Mini-Gelkammern der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben 1:1 mit Ladepuffer gemischt und für 10 Minuten bei 90 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 1 x Elektrodenpuffer bei 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wurde auf jedes Gel ein Größenstandard (PageRuler Unstained Protein Ladder oder PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) aufgetragen. Die Proteine wurden nach der Elektrophorese durch eine Silberfärbung visualisiert oder die Gele in einem Western-Blot weiter verwendet.

Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele:

	10 % Trenngel	12,5 % Trenngel	5 % Sammelgel
Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 40)	1,5 mL	2 mL	250 µL
Trennpuffer	1,2 mL	1,2 mL	-
Sammelpuffer	-	-	400 µL
SDS (0,5 %)	1,2 mL	1,2 mL	400 µL
ddH ₂ O	2,1 mL	1,6 mL	950 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL
APS (10 %)	30 µL	30 µL	30 µL

Trennpuffer

Tris Base 22,77 g
 ddH₂O auf 100 mL
 Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt.

Sammelpuffer

Tris Base 7,57 g
 ddH₂O auf 100 mL
 Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,8 eingestellt.

0,5 % SDS-Lösung

SDS 0,5 g
 ddH₂O auf 100 mL

10 % APS-Lösung

APS 0,1 g
 ddH₂O auf 1 mL

1x Elektrodenpuffer

Tris Base 3,0 g
 Glycin 14,4 g
 SDS 1,0 g
 dH₂O auf 1000 mL
 Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,3 eingestellt.

Ladepuffer

Sammelpuffer 2,0 mL
 1 % Bromphenolblau in Ethanol 0,1 mL
 2-Mercaptoethanol 0,5 mL
 Glycerin 5,0 mL
 ddH₂O auf 10 mL

2.4.7.2 Native PAGE

Bei der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese werden die Proteine nicht denaturiert, so dass oligomere Proteinformen nachgewiesen werden können. Die Proteine werden dabei nach Größe und Ladung aufgetrennt. Es wurden Gele mit einem Gradienten von 4 – 20 % (Mini-Protean Precast Gels TGX 4 - 20 %; Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Zur Bestimmung der nativen Masse der Proteine diente ein Größenstandard von GE Healthcare (Amersham High Molecular Weight Calibration Kit For Native Electrophoresis), der vor der Verwendung 1:50 mit Elektrodenpuffer verdünnt wurde. Die Proben und der Größenstandard wurden vor dem Auftragen 1:1 mit Glycerol-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde in 1 x Elektrodenpuffer ohne SDS bei 20 mA auf Eis für ca. 2,5 Stunden durchgeführt. Die Visualisierung der Proteine erfolgte anschließend durch eine Silberfärbung.

1 x Elektrodenpuffer

Tris Base	1,2 g
Glycin	5,76 g
ddH ₂ O	auf 1000 mL

Der pH sollte ohne Titrieren bei 8,3 - 8,5 liegen.

Glycerol-Ladepuffer

Glycerin	5 mL
1 % Bromphenolblau in Ethanol	0,5 mL
Elektrodenpuffer	auf 10 mL

2.4.7.3 Silberfärbung

Die Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 20 Minuten in Fixierlösung inkubiert, wodurch die Proteine im Gel präzipitierten. Es folgten 10 Minuten Inkubation in 50 % (v/v) Methanol und ein Waschschriff von 10 Minuten mit ddH₂O um die Essigsäure aus der Fixierlösung zu entfernen. Zur Erhöhung der Sensitivität und des Kontrasts bei der Färbung wurden die Gele anschließend für eine Minute in Thiosulfatlösung inkubiert und zur Entfernung von überschüssigem Thiosulfat danach zweimal für eine Minute mit ddH₂O gewaschen. Die Inkubation in der Imprägnierlösung erfolgte für 20 Minuten lichtgeschützt bei 4 °C. Dabei lagerten sich die Silberionen aus der Imprägnierlösung an die negativ geladenen Seitenketten der Proteine an. Bei der darauf folgenden Inkubation in Entwicklerlösung wurden die Silberionen durch Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert, wodurch die Proteine angefärbt wurden. Die Dokumentation erfolgte durch Einscannen der Polyacrylamidgele nach verschiedenen Färbungszeiten. Alle Lösungen wurden vor der Verwendung frisch angesetzt:

Fixierlösung

Methanol	500 mL
Essigsäure (100 %)	120 mL
Formaldehyd (37 %)	0,5 mL
ddH ₂ O	auf 1000 mL

50 % Methanol

Methanol	25 mL
ddH ₂ O	auf 50 mL

0,02 % Thiosulfatlösung

Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,01 g
ddH ₂ O	auf 50 mL

Imprägnierlösung

AgNO ₃	0,05 g
ddH ₂ O	auf 50 mL

Entwicklerlösung

Na ₂ CO ₃	1,5 g
Formaldehyd (37 %)	0,05 mL
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,004 g
ddH ₂ O	auf 50 mL

2.4.7.4 Berechnung der molekularen und nativen Masse der Proteine

Zur Bestimmung der molekularen und nativen Masse der Proteine wurden die Wanderungsstrecke der Proteine im Gel so wie die Wanderungsstrecke der Laufmittelfont ermittelt und daraus der Retentionsfaktor berechnet ($R_f = [\text{Wanderungsstrecke des Proteins}]/[\text{Wanderungsstrecke der Laufmittelfront}]$). Durch das Auftragen der R_f -Werte der Standardproteine des jeweils verwendeten Größenstandards gegen den dekadischen Logarithmus des Molekulargewichts ergab sich eine Standardgerade, anhand deren Gleichung ($y = m * x + b$) das Molekulargewicht des Proteins in einer Probe berechnet werden konnte ($MW = 10^x$; $x = [y - b]/m$).

2.4.7.5 Western-Blot und Immunodetektion von Proteinen

Die Western-Blot-Analyse von Proteinen, die in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte nach der modifizierten Methode von Towbin *et al.* (1979). Die Proteine wurden dabei elektrophoretisch unter Verwendung eines Mini-Semidry-Blotgeräts (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) auf eine Nitrozellulosemembran (4,5 µM; Bio-Rad, München, Deutschland) übertragen. Alle Komponenten des Western-Blots wurden in Towbinpuffer getränkt und der Blot anschließend wie folgt zusammengesetzt: drei Whatman-Filterpapiere, gefolgt von der Nitrocellulosemembran, dem SDS-Gel und wiederum drei Whatman-Filterpapieren. Der Transfer der Proteine fand bei 15 Volt je nach Größe der Proteine für 30 - 45 Minuten statt.

Towbinpuffer

Tris Base	1,52 g
Glycin	7,2 g
Methanol	100 mL
dH ₂ O	auf 500 mL

Der pH-Wert sollte ohne Titrieren bei etwa 8,3 liegen.

Für die anschließende Immunodetektion der Proteine auf der Membran wurden mit Meerrettichperoxidase konjugierte monoklonale Antikörper gegen den Strep-Tag nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers verwendet (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland). Die Membran wurde nach dem Transfer der Proteine für mindestens eine Stunde in Blockierlösung bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert und dann dreimal mit 20 mL PBS-Tween-Puffer gewaschen (jeder Schritt: 5 min bei RT unter leichtem Schütteln). Anschließend wurde die Membran für mindestens eine Stunde in 20 mL PBS-Tween-Puffer mit 5 µL des Strep-Tactin-Merrettichperoxidase-Konjugats (entspricht einer Verdünnung von 1:4.000) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal mit 20 mL PBS-Tween-Puffer und zweimal mit 20 mL PBS-Puffer gewaschen (jeder Schritt: 1 min bei RT unter leichtem Schütteln). Für die Detektion der Proteine wurde die Membran in 20 mL PBS-Puffer überführt und 200 µL Chloronaphthollösung sowie 20 µL Wasserstoffperoxidlösung zugegeben. Die chromogene Reaktion erfolgte unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur. Zur Dokumentation wurde die Membran eingescannt sowie anschließend getrocknet und lichtgeschützt gelagert.

PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	0,256 g
KH ₂ PO ₄	0,2g
dH ₂ O	auf 1 L

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

PBS-Blockierlösung

PBS-Puffer mit 0,5 % (v/v) Tween 20 und 5 % (w/v) Milchpulver

PBS-Tween-Puffer

PBS-Puffer mit 0,1 % (v/v) Tween 20

Chloronaphthollösung

3 % (w/v) 4-Chloro-1-Naphthol in Methanol

Wasserstoffperoxidlösung

30 % (v/v) H₂O₂

2.4.8 Enzymaktivitätstests

2.4.8.1 Bestimmung der Aktivität PQQ-abhängiger Enzyme

Die Aktivität PQQ-abhängiger Dehydrogenasen wurde mithilfe der artifiziellen Elektronenakzeptoren Phenazinmethosulfat (PMS) und 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP) bestimmt. Die Reduktion des Endakzeptors DCPIP wurde photometrisch mit einem Jasco V-600 Spektrophotometer (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) verfolgt. Die Temperatur wurde dabei mit einem Jasco ETC-717 Peltier-Thermostat konstant gehalten. Für die Auswertung der Daten wurde die Spectra Manager III Software verwendet. Das Absorptionsspektrum von DCPIP ist pH-abhängig. Bei einem pH-Wert von 5 liegt das Absorptionsmaximum von DCPIP bei 520 nm, während es bei einem pH-Wert von 6 - 8,75 bei 600 nm liegt. Folgende Extinktionskoeffizienten für DCPIP wurden zur Berechnung der Aktivität verwendet: $\epsilon = 10,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei pH 5, $\epsilon = 17,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei pH 6, $\epsilon = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei pH 7 und $\epsilon = 23 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei pH 8,75 (Armstrong, 1964; Hölscher *et al.*, 2007). Die Reaktionsansätze mit einem Endvolumen von 1 mL enthielten Puffer (50 mM Natriumacetat-Kaliumphosphat-Puffer pH 5/ 40 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6 - 7/ 167 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,75), 0,67 mM PMS, 0,1 mM DCPIP, 10 – 60 mM Substrat und gereinigtes Enzym, Membranfraktionen oder ruhende Zellen. Die durch Membranen oder ruhende Zellen verursachte Trübung in den Ansätzen war geringer als 0,2 und wurde durch Anpassung der Basislinie korrigiert. Standardmäßig wurden die Tests in 1 mL Kunststoffküvetten bei 25 °C durchgeführt und die Reaktionen durch die Zugabe von Substrat oder Enzym gestartet. Eine Unit wurde definiert als die Menge Enzym, die 1 μmol Substrat pro Minute umsetzt, und die Volumenaktivität mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes wie folgt berechnet:

$$U/mL = \frac{\Delta E/\text{min} * V}{d * \epsilon * v}$$

mit $\Delta E/\text{min}$ = Änderung der Extinktion pro min

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

ϵ = Extinktionskoeffizient [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

V = Gesamtvolumen des Testansatzes [mL]

v = eingesetztes Volumen des Enzyms [mL]

Um die spezifische Aktivität [U/mg] zu erhalten, wurde die Volumenaktivität durch die Enzymkonzentration dividiert.

Die Messung der Aktivität mit dem Substrat L-Sorbose erfolgte, aufgrund der starken Reaktivität dieses Substrats mit DCPIP, mit dem artifziellen Elektronenakzeptor Ferricyanid in einer Endkonzentration von 1 mM (Messung bei 420 nm, $\epsilon = 1,04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei pH 7, $\epsilon = 1,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei pH 8). Da ein Molekül Ferricyanid im Gegensatz zu DCPIP nur ein Elektron aufnimmt, bei der Oxidation eines Substratmoleküls durch die Dehydrogenasen jedoch zwei Elektronen frei werden, wurde $\Delta E/\text{min}$ in diesem Fall zur Berechnung der Aktivität durch zwei dividiert.

2.4.8.2 Messung der Aktivität von NAD(P)H-abhängigen Enzymen

Um die Aktivität von NAD(P)H-abhängigen Enzymen zu bestimmen, wurde die Änderung der Absorption von NAD(P)H bei 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mit einem Jasco V-600 Spektrophotometer (Jasco, Gross-Umstadt, Germany) verfolgt. Dabei wurde die Temperatur mithilfe eines Jasco ETC-717 Peltier-Thermostats konstant auf 25 oder 30 °C gehalten und die Daten wurden mithilfe der Spectra Manager III Software ausgewertet. Die Reaktionsansätze mit einem Endvolumen von 1 mL enthielten 40 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5), 125 μM NAD(P)H bzw. NAD(P)^+ , 10 mM Substrat und Enzym. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von Substrat oder Enzym gestartet. Die Berechnung der Aktivität erfolgte analog zu der für PQQ-abhängige Enzyme (siehe Abschnitt 2.4.8.1).

2.4.8.3 Bestimmung des pH- und Temperaturoptimums

Der optimale pH-Wert für ein Enzym wurde mit dem jeweiligen Standard-Aktivitätstest bestimmt, wobei der pH-Wert des Puffers variiert wurde. In einem pH-Bereich von 5 – 5,5 wurde 50 mM Natriumacetatpuffer verwendet und bei pH-Werten von 6 – 8 wurde 40 mM Kaliumphosphatpuffer eingesetzt. Um mögliche Effekte der unterschiedlichen Puffer auszuschließen, wurde zudem McIlvaine-Puffer (McIlvaine, 1921) und die modifizierte Methode von Salusjärvi *et al.* (2004) angewandt. Letzteres Puffersystem bestand aus Natriumacetat (pH 4,5 – 6,5), Kaliumphosphat (pH 6,5 - 8,0) und Tris-HCl (pH 8,0 – 10) in einer Endkonzentration von jeweils 50 mM. Die Kombination der drei Pufferlösungen ergab einen pH-Wert von 7. Durch das Einstellen des pH-Werts mit Salzsäure, beziehungsweise Natronlauge, konnten aus diesem Ausgangspuffer verschiedene Puffer mit pH-Werten zwischen 5 und 10 hergestellt werden. Für die Bestimmung des Temperaturoptimums eines Enzyms wurde der Standard-Enzymtest bei Temperaturen zwischen 20 und 60 °C durchgeführt.

2.4.8.4 Enzymkinetik

Die Enzymtests für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden bei 25 oder 30 °C unter optimalen pH-Bedingungen durchgeführt. Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante (K_M) für ein bestimmtes Substrat wurde die Substratkonzentration bei konstanter Cofaktorkonzentration variiert. Die Ermittlung des K_M -Werts für den jeweiligen Cofaktor erfolgte durch Variation von dessen Konzentration bei konstanter Substratkonzentration (Michaelis & Menten, 1913). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) und die K_M -Werte wurden durch nicht-lineare Regression der Michaelis-Menten-Daten unter Verwendung des Programms GraphPad Prism bestimmt. Außerdem erfolgte eine lineare Regression (Lineweaver-Burk-Auftragung) der Michaels-Menten-Daten. Anhand der sich daraus ergebenden Geradengleichung ($y = m * x + b$) konnten die kinetischen Parameter ebenfalls berechnet werden. ($K_M = m/b$, $V_{max} = 1/b$).

Der K_M -Wert gibt die Substrat- bzw. Cofaktorkonzentration an, bei der ein Enzym die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit ($1/2 V_{max}$) erreicht. Je höher die Wechselzahl k_{cat} und je niedriger der K_M -Wert eines Enzyms ist, desto größer ist die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M). Die Wechselzahl k_{cat} berechnet sich dabei aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit dividiert durch die Molmenge des Enzyms pro Milligramm ($k_{cat} = V_{max}/[\text{mol/mg Enzym}]$).

2.4.8.5 Rekonstitution eines Apoenzyms mit PQQ

Um PQQ-abhängige Enzyme von der inaktiven Apoform in die Holoform umzusetzen, wurden sie mit dem Cofaktor PQQ rekonstituiert. Dazu wurde jeweils die adäquate Proteinmenge für einen Aktivitätstest in 1 mL Puffer mit 16,5 μM PQQ und 20 mM CaCl_2 oder MgSO_4 für 10 Minuten auf Eis oder bei Raumtemperatur inkubiert (Hölscher *et al.*, 2007). Anschließend erfolgte die Messung der spezifischen Aktivität des rekonstituierten Enzyms unter Verwendung der artifiziellen Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP (siehe Abschnitt 2.4.8.1)

2.4.8.6 Zugabe von polaren Lipiden zu gereinigten Membranproteinen

Um zu überprüfen, ob die Zugabe von polaren Lipiden einen positiven Einfluss auf die Aktivität gereinigter Membranproteine hat, wurde der Extrakt von polaren Lipiden aus *E. coli* (Avanti Polar Lipids Inc.; Bezug über Otto Nordwald, Hamburg, Deutschland) verwendet. Der Lipidextrakt lag gelöst in Chloroform mit einer Konzentration von 25 mg/mL vor. Es wurden 1 – 10 μL dieser Lösung, entsprechend 25 – 250 μg der Lipide, zu jeweils 10 μL Chloroform in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und das Chloroform anschließend in einem Vakuum-Konzentrator (Speed Vac) entfernt. Der getrocknete Lipidextrakt wurde durch die Zugabe des zu testenden Membranproteins, das in Puffer vorlag, resuspendiert und der Ansatz für einige Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität des Proteins getestet.

2.4.9 Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate von ruhenden Zellen und Membranfraktionen

Die Sauerstoffverbrauchsrate von ruhenden Zellen und Membranfraktionen wurde mit einer Sauerstoffelektrode gemessen, die an einen elektrochemischen Prozessor 2000 angeschlossen war (Rank Brothers LTD, Cambridge, England, UK). Die Temperatur wurde dabei durch ein Wasserbad konstant auf 25 °C gehalten. Die Kalibrierung der Sauerstoffelektrode erfolgte durch die Zugabe von Natriumdithionit zu mit Sauerstoff gesättigtem Puffer (maximale negative Ausgangsspannung) bis zur vollständigen Reduktion (minimale negative Ausgangsspannung). Die maximale negative Ausgangsspannung wurde dem Sauerstoffgehalt einer gesättigten wässrigen Lösung bei 25 °C (8,11 mg/L) gleichgesetzt und die minimale negative Ausgangsspannung wurde einem Sauerstoffgehalt von null gleichgesetzt. Die Ansätze enthielten Membranfraktionen oder ruhende Zellen, 60 mM Substrat und

40 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6 oder 7), der auf 3 mL zugegeben wurde. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe des Substrats gestartet und die Abnahme der Ausgangsspannung über die Zeit verfolgt.

2.4.10 Bestimmung von Substrat- und Produktkonzentrationen in Kulturen

2.4.10.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Konzentrationen von Glukonat, 2-Keto-D-Glukonat und 5-Keto-D-Glukonat in dem Medium von in YG angezogenen *G. oxydans* Kulturen wurden mittels HPLC bestimmt. Dazu wurde jeweils 1 mL der Kultur abzentrifugiert (8.000 x g, 5 min), der Überstand durch eine 0,45- μ m Membran filtriert und anschließend in der HPLC eingesetzt. Es wurde das HPLC-System der Firma Knauer (Berlin, Deutschland) mit einer Aminex-HPX87H-Säule (300 x 7,8 mm; Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Als mobile Phase diente 5 mM Schwefelsäure mit einer Fließrate von 0,3 mL min⁻¹. Die Säulentemperatur betrug 65 °C. Die Detektion von Glukonat, 2-Keto-D-Glukonat und 5-Keto-D-Glukonat erfolgte bei 210 nm in einem UV-Detektor (Miller *et al.*, 1987). Zur Auswertung der Daten wurde die Software ChromGate Client, Version 3.1.7, eingesetzt. Die Konzentration der Glukonate wurde durch den Vergleich mit entsprechenden Kalibriergeraden käuflicher Standards (1 - 150 mM für Glukonat, 1 – 50 mM für 2-Keto-D-Glukonat und 5-Keto-D-Glukonat) bestimmt.

2.4.10.2 Glukosebestimmung

Für die Bestimmung des Glukosegehalts in dem Überstand von in YG-Medium angezogenen *G. oxydans* Kulturen wurde ein D-Glukose/D-Fruktose UV-Testkit (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Reaktionen wurden in 1 mL Kunststoffküvetten angesetzt und das Testvolumen dabei auf ein Drittel der in dem Kit angegebenen Menge reduziert.

2.5 Verwendete Programme und bioinformatische

Methoden

Zum Abgleich von Gen- und Proteinsequenzen mit anderen veröffentlichten Sequenzen wurden verschiedene NCBI BLAST-Programme (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1997) verwendet. Die Proteindatenbanken wurden über die Internetseiten von NCBI (National Center for Biotechnology Information) und KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.genome.jp/kegg/>) abgerufen. Das theoretische Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt von Proteinen wurde mit einem speziellen ExPASy Tool (http://web.expasy.org/compute_pi/) bestimmt. Zur Vorhersage von Transmembranhelices wurden das Bioinformatikprogramm Phobius (<http://phobius.sbc.su.se>) und der TMHMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) verwendet. Die Vorhersage von Signalpeptiden erfolgte über den SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Petersen *et al.*, 2011). Daneben wurde die Vorhersage von Sekundärstrukturen auch mit Psipred durchgeführt (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) (Buchan *et al.*, 2013; Jones, 1999). Wichtige Proteindomänen wurden über die entsprechenden Tools von NCBI, InterPro und Pfam 27.0 identifiziert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>; <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>; <http://pfam.sanger.ac.uk/>) (Hunter *et al.*, 2012; Marchler-Bauer & Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009, 2011; Punta *et al.*, 2012). Zur Modellierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen wurde das Programm Cn3D 4.3 verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) (Wang *et al.*, 2000).

Die Arbeit wurde mit Microsoft Office 2003 angefertigt. Die Verwaltung und das Zitieren von Literaturquellen erfolgten unter Verwendung von Zotero (Roy Rosenzweig Center for History and New Media, Fairfax, Virginia, USA). Für die Bildbearbeitung wurden die Programme Photoshop 5.5 (Adobe Systems, San Jose, USA) und GIMP 2 (The GIMP Team, <http://www.gimp.org>) eingesetzt. DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm Chromas Lite (Technelysium, South Brisbane, Australien) ausgewertet und exportiert. Für die Simulation von Klonierungen und die Erstellung von Vektorkarten wurde das Programm Clone Manager 9 (Scientific and Educational Software, Cary, North Carolina, USA) verwendet und zur Darstellung von Strukturformeln diente das Programm ChemDraw Ultra 11.0 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Die lineare und nicht-lineare Regression von

Michaelis-Menten Daten zur Ermittlung der kinetischen Parameter von Enzymen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA).

3 Ergebnisse

Essigsäurebakterien zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, Zucker, Alkohole und Polyole unvollständig sowie stereo- und regioselektiv zu oxidieren (De Ley *et al.*, 1984). Diese Eigenschaft macht Essigsäurebakterien zu wichtigen Organismen in der Biotechnologie. Die Schlüsselenzyme sind dabei membrangebundene Dehydrogenasen (Pronk *et al.*, 1989), deren aktive Zentren zum Periplasma orientiert sind. Die Substrate dieser Enzyme werden direkt im periplasmatischen Raum oxidiert und die entstandenen Produkte über Porine in das Medium abgegeben (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009). Einige membrangebundene Dehydrogenasen wurden aus den in dieser Arbeit verwendeten Essigsäurebakterien *Gluconobacter oxydans* und *Gluconacetobacter diazotrophicus* bereits isoliert und charakterisiert. Anhand von Genomanalysen wurden für diese Organismen jedoch auch putative membrangebundene Dehydrogenasen vorhergesagt, deren Funktion bisher noch nicht geklärt wurde. Die Aufreinigung und Charakterisierung dieser Dehydrogenasen stellt einen wichtiger Schritt dar, um das biotechnologische Potential der Organismengruppe voll ausnutzen zu können. Dazu werden geeignete Systeme benötigt, die die homologe Überproduktion und Aufreinigung von Membranproteinen aus Essigsäurebakterien erleichtern. In der Vergangenheit wurden verschiedene Expressionsvektoren für Essigsäurebakterien verwendet, deren Nutzen allerdings häufig eingeschränkt ist. Mit den von Kallnik *et al.* (2010) entwickelten Vektoren pBBR1p264 und pBBR1p452, die einen konstitutiven starken bzw. moderaten Promotor enthalten, stand bereits ein verbessertes Expressionssystem für *G. oxydans* zur Verfügung. In dieser Arbeit sollten die Vektoren durch die Integration der Sequenz für einen C-terminalen Strep-Tag optimiert werden. Es wurde geplant, Gene in diese Vektoren einzubringen und als Strep-Tag-Fusionsproteine zu exprimieren. Diese sollten dann über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Eignung der mit Strep-Tags versehen Vektoren für die Produktion und Aufreinigung von Proteinen aus *G. oxydans* sollte zunächst anhand des löslichen Proteins Gox1801 überprüft werden. Im Folgenden sollte die PQQ-abhängige Glukose-Dehydrogenase (mGDH) aus *G. oxydans* als Modellprotein für membrangebundene Dehydrogenasen eingesetzt werden. Neben der Aufreinigung des aktiven Enzyms unter Verwendung eines Strep-Tags und der Optimierung des Aufreinigungsprozesses durch die Modifikation des Affinitätstags, sollten auch die Auswirkungen der mGDH-Überproduktion auf die Atmungskette überprüft werden. Im

nächsten Schritt sollte das Expressionssystem für die Produktion und Aufreinigung von Gox1857, einer bisher noch nicht eingehend charakterisierten membrangebundenen Dehydrogenase aus *G. oxydans*, genutzt werden. Im letzten Schritt galt es, das in *G. oxydans* funktionale Expressionssystem auf andere Essigsäurebakterien zu übertragen. Dazu sollte die putative membrangebundene L-Sorbose-Dehydrogenase Gdi_3764 aus *Ga. diazotrophicus* homolog überproduziert werden.

3.1 Konstruktion der Expressionsvektoren pBBR1p264-ST und pBBR1p452-ST

In die zur Verfügung stehenden Expressionsvektoren pBBR1p264 und pBBR1p452, mit einem starken bzw. moderaten Promotor (Kallnik *et al.*, 2010), wurde die Sequenz für einen C-terminalen Strep-Tag II integriert, um die homologe Produktion und Aufreinigung von Proteinen aus *G. oxydans* über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Für die Konstruktion des Überexpressionsvektors pBBR1p264-ST wurde die 773 bp umfassende Promotorregion aus Vektor pBBR1p264 anhand der Primer Upstrep_f und Upstrep_r amplifiziert (Abb. 1 A). Parallel dazu, wurde die Strep-Tag-Sequenz aus dem Vektor pASK-IBA3plus (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland) unter Verwendung der Primer Dostrep_f und Dostrep_r amplifiziert. Die Größe dieses Amplikons betrug 293 bp (Abb. 1 A). Während der Primer Upstrep_f eine *PvuI*-Restriktionsschnittstelle und der Primer Dostrep_r eine *AscI*- sowie zusätzlich eine *SnaBI*-Schnittstelle beinhaltete, enthielten die Primer Upstrep_r und Dostrep_f Überhänge, die eine Fusions-PCR der beiden DNA-Fragmente erlaubten. Durch die Fusions-PCR entstand ein DNA-Fragment von 1051 bp. (Abb. 1 B). Dieses wurde anschließend über die *PvuI*- und *AscI*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995) integriert, der bereits zuvor die Basis für die Konstruktion der oben genannten Ausgangsvektoren bildete. Der neue Expressionsvektor pBBR1p264-ST enthielt den starken Promotor p264, eine Strep-Tag-Sequenz und verschiedene Restriktionsschnittstellen für das Einbringen von Genen stromabwärts der Promotorregion sowie die Restriktionsschnittstellen für *SnaBI* und *AscI* stromaufwärts der Strep-Tag-Sequenz im Rahmen des Leserasters (Abb. 3 A). Letztere Restriktionsschnittstellen bieten Vorteile gegenüber anderen Restriktionsschnittstellen und sind deshalb besonders gut für die Klonierung geeignet. Bei *SnaBI* handelt es sich um ein Enzym, das glatte Enden liefert (Blunt-End-Cutter), die mit den Enden, die durch andere Blunt-End-Cutter entstehen,

kompatibel sind. *AscI* ist ein Restriktionsenzym mit einer acht Basen umfassenden Erkennungssequenz (Rare-Cutter), die selten in Genen gefunden wird. So ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass das Restriktionsenzym auch in einem zu klonierenden Gen schneidet.

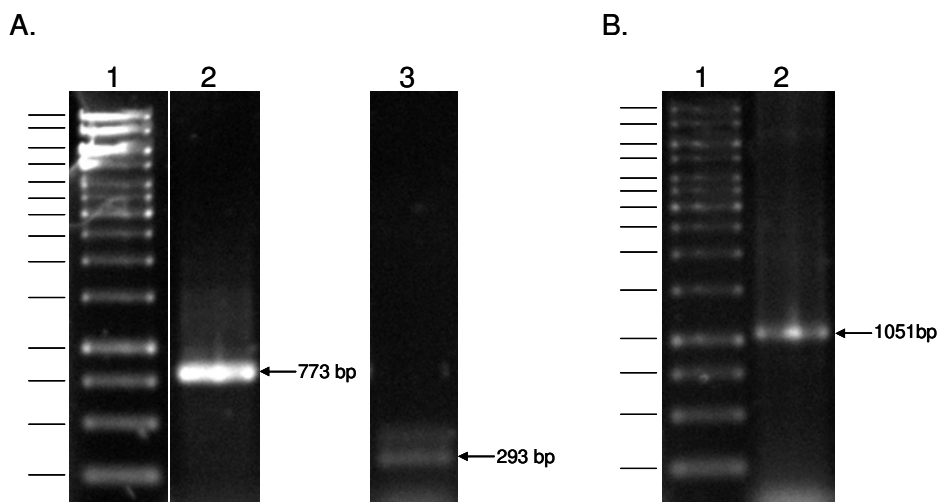


Abb. 1: Darstellung der PCR-Produkte, die für die Konstruktion des Vektors pBBR1p264-ST verwendet wurden. (A) Produkte aus der PCR zur Amplifizierung der Promotorregion p264 und der Strep-Tag II-Sequenz. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, von oben: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250 bp); Spur 2: amplifizierte Promotorregion p264; Spur 3: amplifizierte Strep-Tag-II-Sequenz. (B) Produkt aus der PCR zur Fusion des DNA-Fragments, das die Promotorregion p264 enthielt, mit dem Strep-Tag-Fragment. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); Spur 2: Produkt der Fusions-PCR.

Der Vektor pBBR1p452-ST, der den moderaten Promotor trug, wurde durch einen Austausch der Promotorregion in dem Vektor pBBR1p264-ST hergestellt (Abb. 3 B). Dazu wurde der Vektor pBBR1p452-Streplong (siehe Abschnitt 3.3.2, Abb. 17) mit den Restriktionsenzymen *PvuI* und *SnaBI* behandelt, das 677 bp umfassende Fragment mit der Promotorregion p452 aus einem Agarosegel aufgereinigt (Abb. 2 A) und in den gleich behandelten Vektor pBBR1p264-ST eingebracht. Die Größe des Vektor-Fragments ohne die Promotorregion betrug 4944 bp (Abb. 2 A). Nach der Transformation von *E. coli* DH5 α mit den ligierten Vektoren wurden jeweils Kolonie-PCRs durchgeführt. Zur Identifizierung von Kolonien, die Vektor pBBR1p264-ST enthielten, wurden die Primer Upstrep_f und Dostrep_r verwendet. Das erwartete PCR-Produkt umfasste 1051 bp. Kolonien, die Vektor pBBR1p452-ST trugen, wurden unter Verwendung der Primer upGox452-f und pASK-r identifiziert. Die Größe des korrekten PCR-Produkts betrug 636 bp (Abb. 2 B). Die Plasmide wurden isoliert und in

einem Kontroll-Restriktionsverdau überprüft. Anschließend wurde durch eine Sequenzierung mit den Primern pBBR1-f und pASK-r sichergestellt, dass die Basensequenz korrekt war.

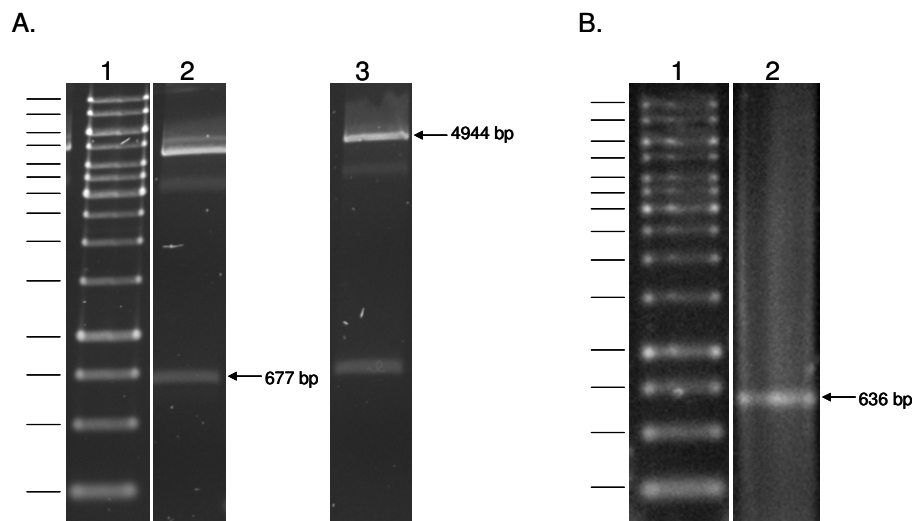


Abb. 2: Darstellung der DNA-Fragmente, die zur Konstruktion des Vektors pBBR1p452-ST eingesetzt wurden, und des Produkts aus der PCR zur Identifizierung von Kolonien, die diesen Vektor trugen. (A) Restriktionsverdaue der Vektoren pBBR1p452-Streplong und pBBR1p264-ST. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, von oben: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250 bp); Spur 2: DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdau von Vektor pBBR1p452-Streplong mit *PvuI* und *SnaBI*; Spur 3: DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdau von Vektor pBBR1p264-ST mit *PvuI* und *SnaBI*. (B) Produkt aus der Kolonie-PCR zur Identifizierung von Kolonien, die Vektor pBBR1p452-ST trugen. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); Spur 2: Produkt der Kolonie-PCR.

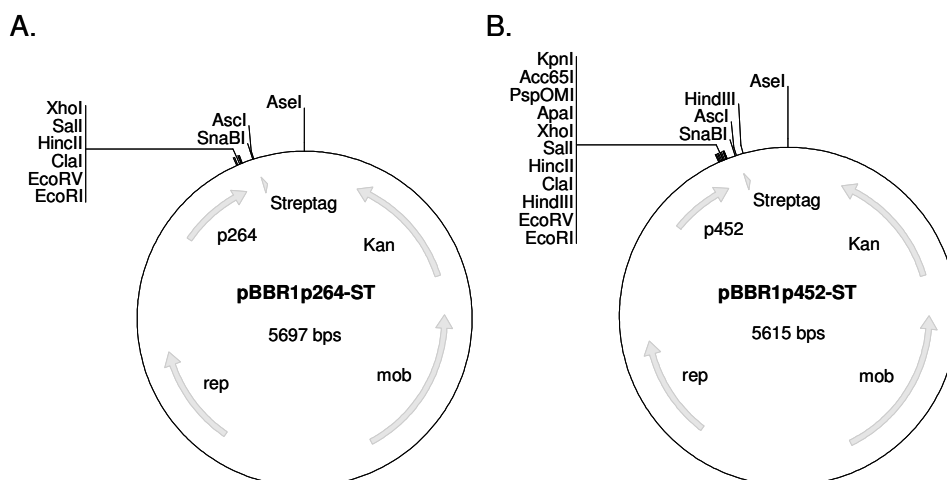


Abb. 3: Darstellung der Expressionsvektoren mit integriertem Strep-Tag II. (A) pBBR1p264-ST; (B) pBBR1p452-ST. Mit rep: Replikationsursprung; Kan: Kanamycinresistenzkassette, mob: Mobilisierungsgen; Streptag: Sequenz für den Strep-Tag II; p264: Promotorregion des Gens *gox0264*; p452: Promotorregion des Gens *gox0452*.

3.2 Die Succinat-Semialdehyd-Reduktase Gox1801 aus *G. oxydans*

Eine bioinformatische Analyse der Proteinsequenz von Gox1801 ergab, dass es sich bei dem Enzym vermutlich um eine NAD(P)H-abhängige γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase oder Succinat-Semialdehyd-Reduktase handelt. Dies sollte in dieser Arbeit experimentell überprüft werden. Für die Überproduktion des Proteins in *G. oxydans* wurde der Expressionsvektor pBBR1p264-ST mit dem starken Promotor gewählt. Es war davon auszugehen, dass Gox1801 ohne Probleme in großen Mengen überproduziert werden konnte, da es sich um ein lösliches Protein handelt. Das Strep-Tag-Fusionsprotein wurde über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aus dem Zellysate isoliert und das gereinigte Enzym im Anschluss charakterisiert.

3.2.1 Bioinformatische Analyse des Proteins Gox1801

Das Gen *gox1801* aus *G. oxydans* 621H kodiert ein 290 Aminosäuren umfassendes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 30,2 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 5,61. Über eine Datenbankanalyse mit InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>, 10.12.13) (Hunter *et al.*, 2012) wurde für das Protein Gox1801 eine NAD(P)-Bindedomäne identifiziert, wie sie auch in der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase vertreten ist (IPR006115). Charakteristisch für diese Domänen ist die Rossmann-Faltung, bei der sechs parallele β -Faltblätter über α -Helices miteinander verbunden sind (Rossmann *et al.*, 1974). Zusätzlich wurde auch eine multi-helikale C-terminale Domäne detektiert, die der der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase ähnlich ist. Eine Datenbankanalyse mittels Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>, 11.12.13) (Punta *et al.*, 2012) zeigte für Gox1801 zusätzlich eine NAD(P)-Bindestelle an, die aus einer NADP-abhängigen 3-Hydroxyisobutyrate-Dehydrogenase von *Thermus thermophilus* bekannt ist (Lokanath *et al.*, 2005). Weder mit dem TMHMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>, 10.12.13) noch mit dem Bioinformatikprogramm Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>, 10.12.13) wurden Transmembrandomänen oder ein Signalpeptid für das Protein Gox1801 vorhergesagt. Auch über den SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, 10.12.13) (Petersen *et al.*, 2011) wurde kein Signalpeptid identifiziert. Folglich muss es sich bei Gox1801 um ein cytoplasmatisches Enzym handeln. Die mit Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>,

10.12.13) (Buchan *et al.*, 2013; Jones, 1999) bestimmte Sekundärstruktur des Proteins ist in Abb. 4 dargestellt. In der vorhergesagten Sekundärstruktur liegen überwiegend α -Helices mit Längen von 4 – 29 Aminosäuren und wenig ausgeprägt β -Faltblätter vor. Für die mit InterPro identifizierte NAD(P)-Bindestelle von Gox1801 sind die an der Rossmann-Faltung beteiligten β -Faltblätter und α -Helices (Aminosäuren 5 – 158) zu erkennen. Auch eine multihelikale C-terminale Domäne wurde mit Psipred angezeigt. Dagegen konnten für die zweite NAD(P)-Bindedomäne, die über Pfam ermittelt wurde (Aminosäuren 161 – 277), keine β -Faltblatt-Strukturen identifiziert werden. Da diese jedoch für eine Rossmann-Faltung notwendig sind, ist unklar, ob Gox1801 tatsächlich eine zweite NAD(P)-Bindedomäne besitzt.

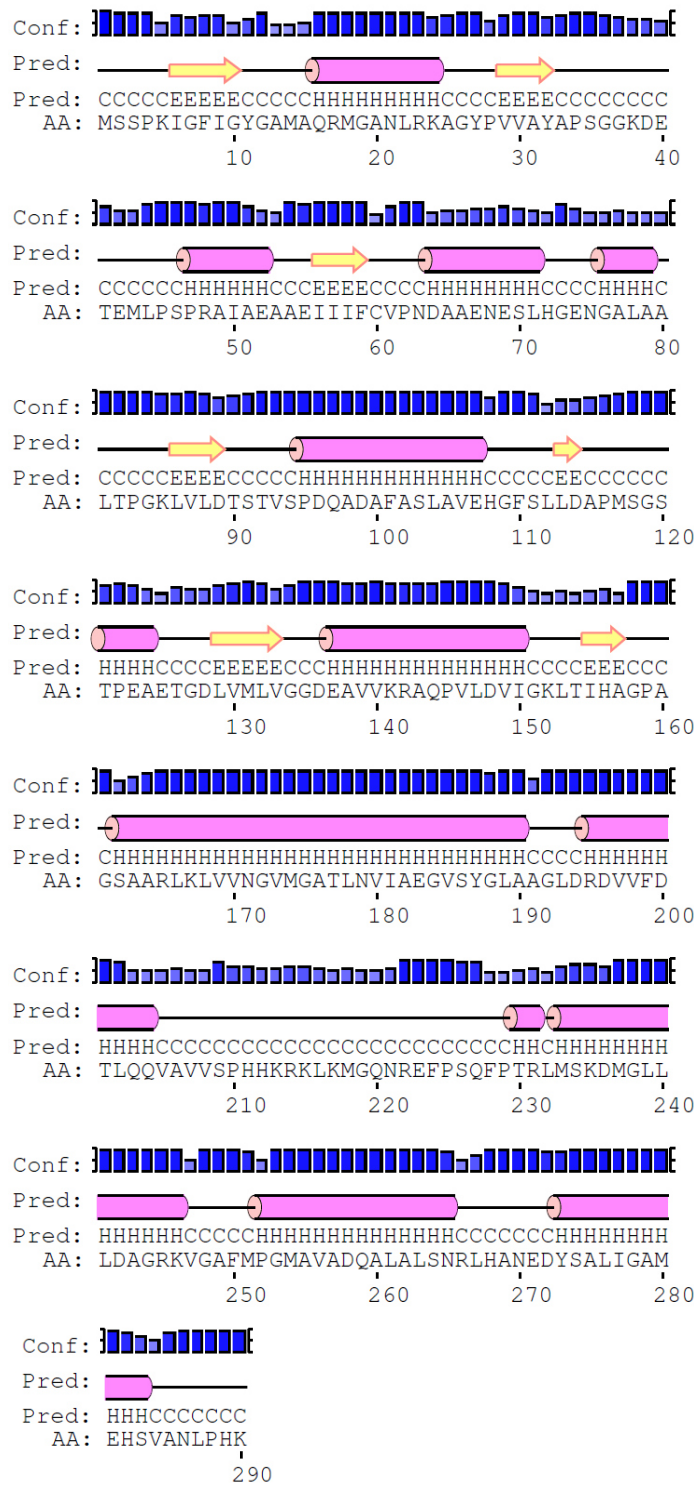


Abb. 4: Sekundärstruktur des Proteins Gox1801. Rosafarbene Röhren: α -Helices; Gelbe Pfeile: β -Stränge; Schwarze Linien: Windungen; Conf: Konfidenz der Vorhersage; Pred: vorhergesagte Sekundärstruktur; AA: Aminosäuresequenz. Die Abbildung wurde mit der Psipred Webseite erstellt.

Die Suche in der nicht redundanten BLAST-Datenbank von NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 10.12.13) (Altschul *et al.*, 1997) zeigte hohe Homologien von Gox1801 zu putativen Oxidoreduktasen und Dehydrogenasen an. Dazu

gehörten eine Oxidoreduktase aus *Gluconobacter thailandicus* (WP_007282488; 80 % Identität, 100 % Sequenzabdeckung), eine Oxidoreduktase aus *Gluconobacter oxydans* H24 (YP_006982810.1; 80 % Identität, 100 % Sequenzabdeckung), eine 3-Hydroxy-Isobutyrat-Dehydrogenase aus *Gluconobacter morbifer* (WP_008850661; 80 % Identität, 100 % Sequenzabdeckung) und eine β -Hydroxysäure-Dehydrogenase aus *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465 (GAD11205; 80 % Identität, 98 % Sequenzabdeckung). Da diese Proteine jedoch nicht biochemisch charakterisiert sind, wurde auch eine BLAST-Analyse unter Verwendung der UniProtKB/Swissprot-Datenbank durchgeführt. Diese ergab, dass Gox1801 geringere Homologien zu Proteinen aus Pro- und Eukaryoten, wie der 2-(Hydroxymethyl)Glutarat-Dehydrogenase aus *Eubacterium barkeri* (Q0QLF5; 33 % Identität, 96 % Sequenzabdeckung), der Glyoxylat/Succinat-Semialdehyd-Reduktase 1 bzw. γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana* (Q9LSV0; 30 % Identität, 96 % Sequenzabdeckung) und der 2-Hydroxy-3-Oxopropionate-Reduktase bzw. Tartronat-Semialdehyd-Reduktase aus *Escherichia coli* K-12 (P77161; 31 % Identität, 95 % Sequenzabdeckung) aufweist. Bei der BLAST-Suche nach Proteinen mit bereits bekannter Struktur wurden außerdem geringe Homologien von Gox1801 zu den γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen aus *Geobacter sulfurreducens* (3PDU_A; 33 % Identität, 94 % Sequenzabdeckung) und *Geobacter metallireducens* (3PEF_A; 33 % Identität, 96 % Sequenzabdeckung) (Zhang *et al.*, 2011) sowie einer β -Hydroxysäure-Dehydrogenase aus *Eubacterium barkeri* (3CKY_A; 33 % Identität, 96 % Sequenzabdeckung), die in die Nikotinat-Fermentation involviert ist (Reitz *et al.*, 2008), festgestellt.

3.2.2 Klonierung des Gens *gox1801* aus *G. oxydans*

Das Gen *gox1801* wurde, inklusive der stromaufwärts gelegenen Ribosomenbindestelle, mit den Primern *gox1801*ClaI-f und *gox1801*SanBI-r in einer PCR aus genomischer DNA von *G. oxydans* 621H amplifiziert. Das 914 bp umfassende Amplikon (Abb. 5 A) wurde anschließend über die angefügten Restriktionsschnittstellen für *ClaI* und *SnaBI* in den Expressionsvektor pBBR1p264-ST eingebracht, so dass der Vektor pBBR1p264-*gox1081*-ST entstand (Abb. 6). Zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien, die das Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment trugen, wurde eine Kolonie-PCR mit den Primern pBBR1-f und pASK-r durchgeführt. Die erwartete Größe des PCR-Produkts betrug 1562 bp (Abb. 5 B). Das isolierte Plasmid wurde in einem Kontroll-Restriktionsverdau überprüft und anschließend wurde durch eine Sequenzierung mit den Primern pBBR1-f und pASK-r sichergestellt, dass die Basensequenz korrekt war. Für die homologe Überexpression wurde der Vektor

pBBR1p452-*gox1801*-ST durch Elektroporation in den Stamm *G. oxydans* Δ hsdR eingebracht.

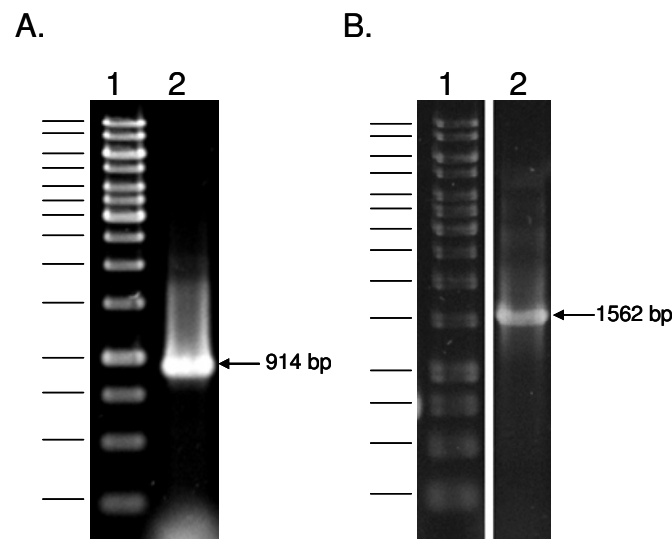


Abb. 5: Herstellung des Vektors pBBR1p264-*gox1801*-ST. (A) Amplifizierung des Gens *gox1801*. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, von oben: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250 bp); Spur 2: Produkt der PCR zur Amplifizierung des Gens *gox1801*. (B) Produkt aus der PCR zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien, die das Plasmid mit dem Gen *gox1801* trugen. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); Spur 2: Produkt der Kolonie-PCR.

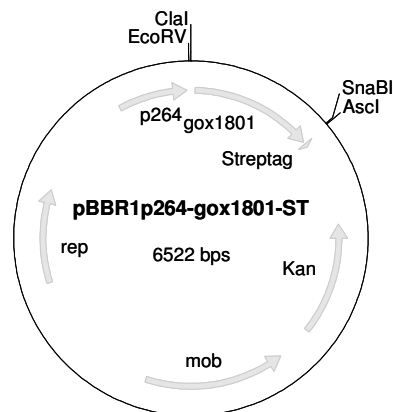


Abb. 6: Darstellung des Vektors pBBR1p264-*gox1801*-ST. Mit rep: Replikationsursprung; p264: Promotorregion des Gens *gox0264*; *gox1801*: Gen *gox1801*; Kan: Kanamycinresistenzkassette, mob: Mobilisierungsgen; Streptag: Sequenz für den Strep-Tag II.

3.2.3 Überproduktion und Aufreinigung des Proteins Gox1801

Kulturen von *G. oxydans* Δ *hsdR* mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox1801*-ST wurden in 500 mL YM-Medium bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,8 – 1,2 angezogen, geerntet und anschließend mittels Ultraschall lysiert. Das Strep-Tag-Fusionsprotein wurde aus dem klaren Lysat über eine Strep-Tactin-Säule aufgereinigt. Die Proteinkonzentrationen in den einzelnen Elutionsfraktionen wurden mit dem Bradford-Reagenz bestimmt. Dabei wurden Konzentrationen von bis zu 0,34 mg/mL ermittelt. Die Gesamtausbeute an Protein lag, je nach Präparation, zwischen 0,38 und 0,57 mg aus 500 mL Kultur. Es zeigte sich, dass das Enzym bevorzugt Succinat-Semialdehyd umsetzte. Die spezifische Aktivität des aufgereinigten Proteins Gox1801, gemessen in Ansätzen mit 10 mM Succinat-Semialdehyd als Substrat und 125 μ M NADH als Elektronendonator in 1 mL 40 mM KP-Puffer pH 6,5 bei 30 °C, betrug 225 ± 36 U/mg. Mit NADPH als Elektronendonator zeigte das Enzym Gox1801 eine ähnliche spezifische Aktivität von 230 ± 19 U/mg. Dementsprechend waren sowohl NADH als auch NADPH geeignete Elektronendonoren für Gox1801.

3.2.3.1 SDS-PAGE und Western-Blot des Proteins Gox1801

Die Elutionsfraktionen aus der Aufreinigung von Gox1801 wurden in einer SDS-PAGE und einem Western-Blot analysiert. Dabei war in dem mit Silber gefärbten SDS-Gel eine einzelne deutliche Bande, für die anhand des Größenstandards ein Molekulargewicht von 32 kDa ermittelt wurde, zu erkennen (Abb. 7 A). Dies entsprach dem theoretischen Molekulargewicht des Proteins mit dem angefügten Strep-Tag II von 31,7 kDa. Auch auf dem Western-Blot konnte über das Strep-Tactin-Meerrettichperoxidase-Konjugat eine entsprechende Bande detektiert werden (Abb. 7 B)

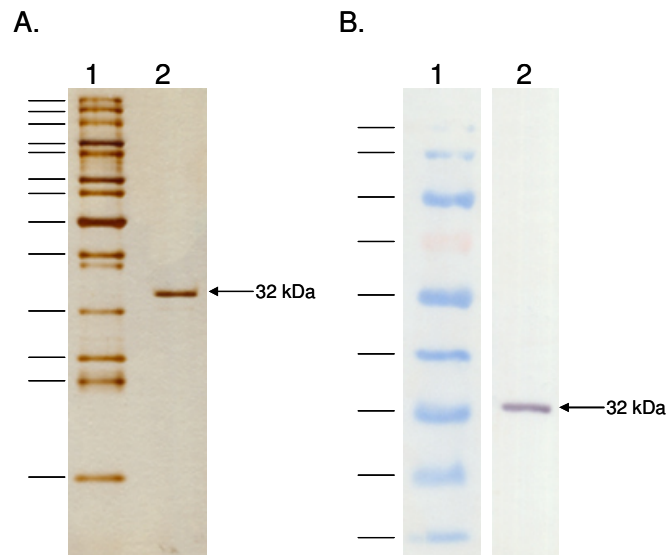


Abb. 7: SDS-PAGE und Western-Blot des Proteins Gox1801. (A) SDS-PAGE. Spur 1: PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, von oben: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 kDa); Spur 2: gereinigtes rekombinantes Protein Gox1801. (B) Western-Blot. Spur 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, von oben: 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17 kDa); Spur 2: Protein Gox1801.

3.2.3.2 Native PAGE des Proteins Gox1801

Das gereinigte Protein Gox1801 wurde zusätzlich in einer nativen PAGE untersucht (Abb. 8). Die entsprechende Proteinbande wurde in diesem Fall bei einer Größe von 133,6 kDa detektiert, was darauf schließen ließ, dass Gox1801 in nativer Form als Tetramer vorliegt.

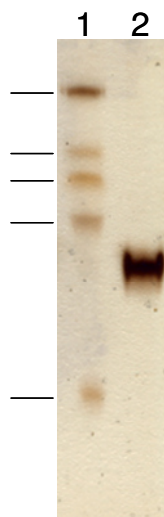


Abb. 8: Native PAGE des Proteins Gox1801. Spur 1: Größenstandard (High Molecular Weight Calibration Kit for Native Electrophoresis, GE Healthcare, von oben: 669, 440, 232, 140, 66 kDa); Spur 2: gereinigtes Protein Gox1801.

3.2.3.3 Bestimmung des pH-Optimums von Gox1801

Der optimale pH-Wert für die Reduktion von Succinat-Semialdehyd durch das Enzym Gox1801 wurde mit 125 μM NADH als Elektronendonator und 10 mM Succinat-Semialdehyd bei 25 °C in 1 mL Puffer bestimmt. Dabei wurde 50 mM Na-Acetat Puffer pH 5 - 5,5 oder 40 mM KP-Puffer pH 6 – 8 eingesetzt. Da die Aktivität des Enzyms in McIlvaine-Puffer (McIlvaine, 1921) und dem modifizierten Puffer nach Salusjärvi (2004) stark reduziert war, wurden diese Puffer nicht für die Bestimmung des pH-Optimums verwendet. Die spezifische Aktivität von Gox1801 in Abhängigkeit von dem pH-Wert ist beispielhaft für eine Enzympräparation in (Abb. 9) dargestellt. Für andere Enzympräparationen war das Ergebnis vergleichbar. Der optimale pH-Wert des Enzyms Gox1801 für die Reduktion von Succinat-Semialdehyd lag bei 6,5.

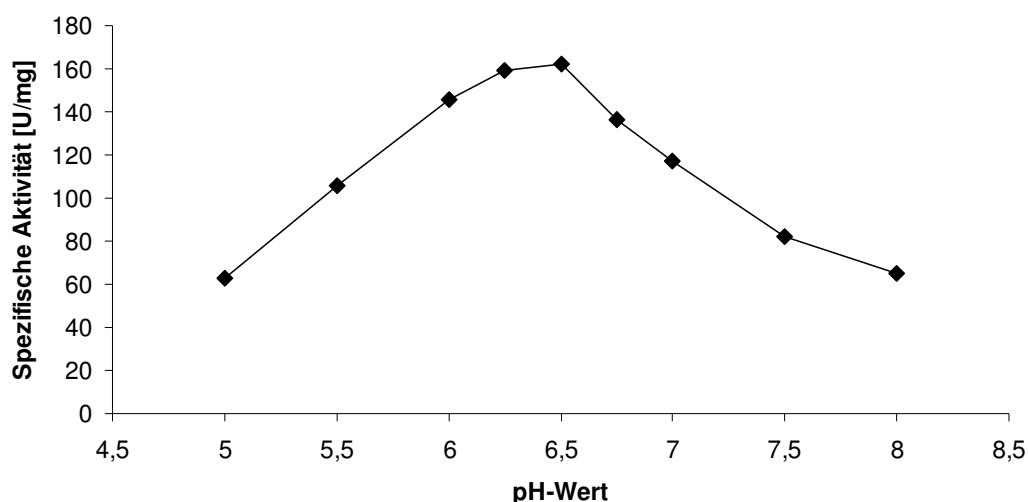


Abb. 9: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des Enzyms Gox1801 von dem pH-Wert beispielhaft dargestellt für eine Enzympräparation. Die spezifische Aktivität wurde bei 25 °C mit 10 mM Succinat-Semialdehyd und 125 μM NADH gemessen.

3.2.3.4 Ermittlung des Temperaturoptimums von Gox1801

Um die optimale Temperatur für die durch Gox1801 katalysierte Reduktion von Succinat-Semialdehyd zu bestimmen, wurde die spezifische Aktivität des Enzyms mit 125 μM NADH und 10 mM Succinat-Semialdehyd in 1 mL 40 mM KP-Puffer pH 6,5 bei Temperaturen von 20 bis 60 °C ermittelt. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des Enzyms von der Temperatur ist in Abb. 10 beispielhaft für eine Enzympräparation dargestellt. Mit anderen Enzympräparationen wurde mit steigender Temperatur ein vergleichbarer Verlauf der spezifischen Aktivität des Enzyms festgestellt. Die höchste spezifische Aktivität von

Gox1801 wurde bei einer Temperatur von 30 °C gemessen. Dies entspricht der optimalen Wachstumstemperatur des Organismus *G. oxydans*, aus dem das Enzym isoliert wurde.

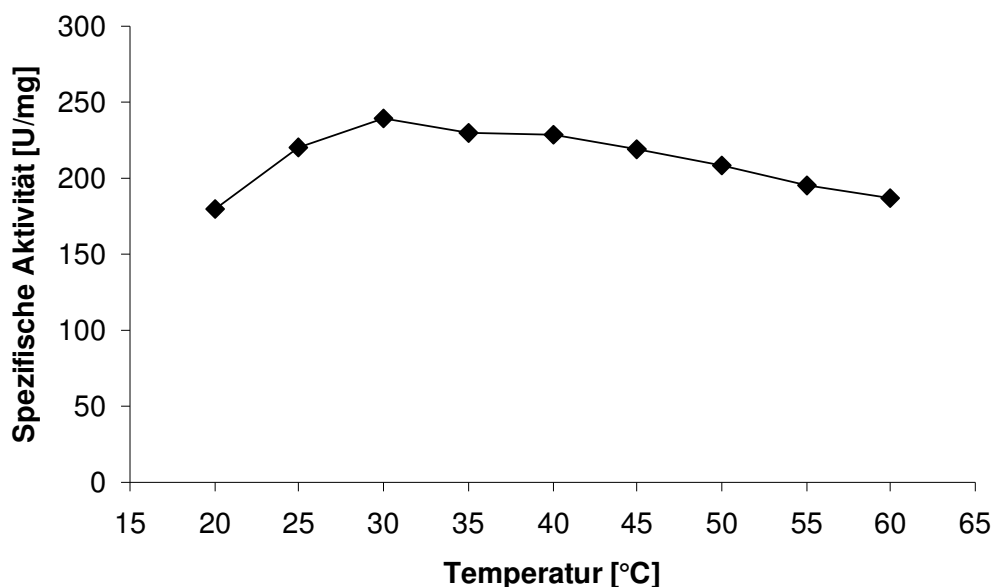


Abb. 10: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des Enzyms Gox1801 von der Temperatur beispielhaft dargestellt für eine Enzympräparation. Die spezifische Aktivität wurde mit 10 mM Succinat-Semialdehyd und 125 μ M NADH bei einem pH-Wert von 6,5 gemessen.

3.2.3.5 Überprüfung der Aktivität von Gox1801 mit γ -Hydroxybutyrat

Durch die von Gox1801 katalysierte NADH- bzw. NADPH-abhängige Reduktion von Succinat-Semialdehyd entsteht das Produkt γ -Hydroxybutyrat. Es sollte überprüft werden, ob das Enzym auch die Rückreaktion, also die NAD^+ - bzw. NADP^+ -abhängige Oxidation von γ -Hydroxybutyrat zu Succinat-Semialdehyd katalysiert. Die Aktivität des Enzyms wurde mit 10 - 200 mM γ -Hydroxybutyrat und 125 - 250 μ M NAD^+ oder NADP^+ bei 30 °C in 1 mL Puffer bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen. Es wurden 40 mM KP-Puffer (pH 6 - 7), 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8 - 9) oder 100 mM Natriumcarbonat-Puffer (pH 9,5 - 10) eingesetzt. Doch auch bei dem optimalen pH-Wert von 9 für diese Reaktion war die spezifische Aktivität, gemessen mit 125 μ M NAD^+ und 100 mM γ -Hydroxybutyrat, mit $4 \pm 0,5$ U/mg sehr gering. Eine Überprüfung des Reaktionsgleichgewichts mit äquimolaren Mengen von NADH und Succinat-Semialdehyd (jeweils 250 μ M) bei pH 6,5 und 30 °C zeigte, dass das Succinat-Semialdehyd vollständig zu γ -Hydroxybutyrat umgesetzt wurde, ohne dass eine Rückreaktion zu beobachten war. Somit war davon auszugehen, dass die Reduktion von Succinat-Semialdehyd zu γ -Hydroxybutyrat durch das Enzym Gox1801 stark favorisiert wurde.

3.2.3.6 Substratspektrum des Enzyms Gox1801

Die Reduktion bzw. Oxidation von weiteren Substraten durch das Enzym Gox1801 wurde in 40 mM KP-Puffer pH 6,5 mit 10 mM Substrat und 125 μ M NADH bzw. NAD⁺ getestet. Dabei wurden geringe Aktivitäten mit Glyoxal, Phenylglyoxal und Methylglyoxal festgestellt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Substratspektrum von Gox1801.

Substrat	Aktivität [%] ^a
Succinat-Semialdehyd	100
Glyoxal	3,3
Phenylglyoxal	1,5
Methylglyoxal	1,4

^aDie Oxidation der Substrate durch das Enzym Gox1801 wurde bei einem pH-Wert von 6,5 in 40 mM KP-Puffer mit 10 mM Substrat und 125 μ M NADH gemessen. Die Aktivitäten sind als Prozentanteil bezogen auf die Aktivität mit Succinat-Semialdehyd (225 U/mg) angegeben. Eine Unit wurde definiert als die Menge Enzym, die die Umsetzung von 1,0 μ mol Substrat pro Minute katalysiert.

Mit den Substraten α - und β -Hydroxybutyrat, 2-Keto-D-Glukose, α -Ketoglutarat, Natriumpyruvat, Ethylacetoacetat, Formaldehyd, Butyraldehyd, Benzaldehyd, Glycoaldehyd, *o*-, *p*- und *m*-Tolualdehyd, Propionaldehyd, Salicylaldehyd, Glutaraldehyd, 2- und 3-Methylbenzaldehyd, Phenylacetaldehyd, Cinnamaldehyd, Hydrocinnamaldehyd, Hexylaldehyd, Heptylaldehyd, Octylaldehyd, Nonylaldehyd, Decylaldehyd, Undecylaldehyd, und Dodecylaldehyd konnte keine Aktivität von Gox1801 festgestellt werden.

3.2.3.7 Bestimmung der kinetischen Parameter des Enzyms Gox1801

Die kinetischen Parameter des Enzyms Gox1801 für die Umsetzung von Succinat-Semialdehyd wurden in 40 mM KP-Puffer pH 6,5 bei 30 °C bestimmt. Die Ansätze enthielten 0,05 - 15 mM Substrat sowie 125 μ M NADH. Alle Reaktionen wurden durch die Zugabe des Enzyms gestartet. Die spezifische Aktivität des Enzyms Gox1801 in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Auftragung) ist beispielhaft für eine Enzympräparation in Abb. 11 dargestellt. Die Ermittlung der kinetischen Parameter erfolgte durch nicht-lineare Regression der Michaelis-Menten-Daten unter Verwendung des

Programms GraphPad Prism. Als Mittelwert für drei unabhängige Enzympräparationen wurde eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{\max}) von 298 ± 40 U/mg und eine Michaelis-Konstante (K_M) von $5,1 \pm 0,6$ mM bestimmt. Die katalytische Effizienz, k_{cat}/K_M , betrug $3,1 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

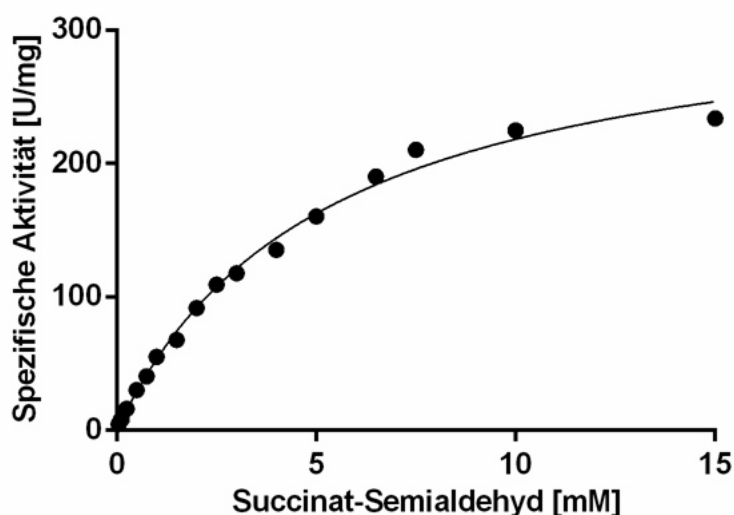


Abb. 11: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des Enzyms Gox1801 von der Substratkonzentration (Michaelis-Menten-Auftragung) beispielhaft für eine Enzympräparation. Die Messungen wurden mit Succinat-Semialdehyd als Substrat und $125 \mu\text{M}$ NADH als Cofaktor bei einem pH-Wert von 6,5 und 30°C durchgeführt. Die nicht-lineare Regression der Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism.

Zusätzlich wurde auch eine lineare Regression (Lineweaver-Burk-Auftragung) der Michaelis-Menten-Daten mit GraphPad Prism durchgeführt (Abb. 12). Die darüber ermittelten kinetischen Parameter waren mit denen, die anhand der nicht-linearen Regression bestimmt wurden, vergleichbar.

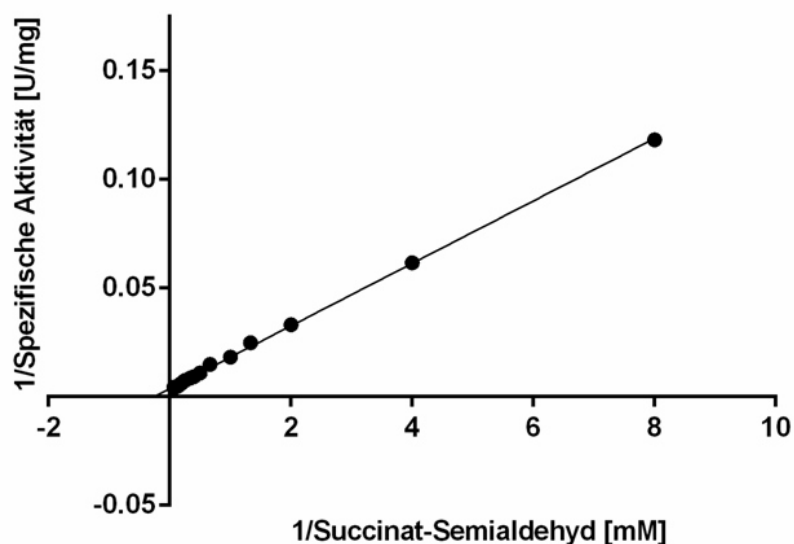


Abb. 12: Lineweaver-Burk-Auftragung der Michaelis-Menten-Daten für das Enzym Gox1801 mit dem Substrat Succinat-Semialdehyd beispielhaft dargestellt für eine Enzympräparation. Die Messungen wurden mit 125 μM NADH als Cofaktor bei 30 °C und einem pH-Wert von 6,5 durchgeführt. Zur Erstellung der Graphik wurde das Programm GraphPad Prism verwendet.

3.2.3.8 Aktivität des Enzyms Gox1801 in Abhängigkeit von der Cofaktorkonzentration

Der Einfluss der vorliegenden Konzentration der Cofaktoren NADH und NADPH auf die Aktivität von Gox1801 wurde ebenfalls untersucht. Für beide Elektronendonoren wurden die kinetischen Parameter K_M und V_{\max} bestimmt. Dazu wurde die spezifische Aktivität des Enzyms in Reaktionsansätzen mit 10 mM Succinat-Semialdehyd in 1 mL 40 mM KP-Puffer pH 6,5 bei 30 °C mit variierenden Konzentrationen von NADH und NADPH (5 – 250 μM) ermittelt. Die nicht-lineare und lineare Regression der Daten erfolgte jeweils mit dem Programm GraphPad Prism (Abb. 13 und Abb. 14).

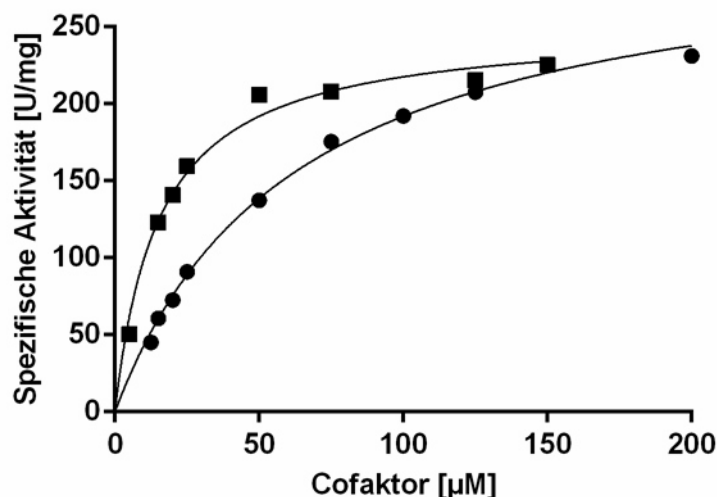


Abb. 13: Einfluss der Cofaktorkonzentration auf die spezifische Aktivität des Enzyms Gox1801 (Michaelis-Menten-Auftragung). Die Messungen wurden mit 10 mM Succinat-Semialdehyd als Substrat bei 30 °C und einem pH-Wert von 6,5 durchgeführt. Die Graphik wurde mit dem Programm GraphPad Prism erstellt. Es sind jeweils beispielhaft die Daten für eine Enzympräparation gezeigt. (●) NADH; (■) NADPH.

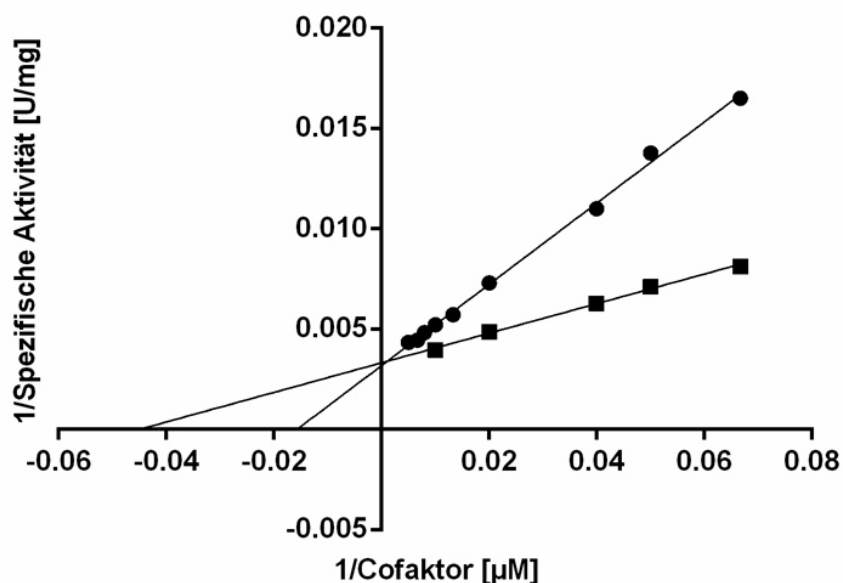


Abb. 14: Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des Enzyms Gox1801 von der Konzentration der Cofaktoren NADH und NADPH dargestellt in der Lineweaver-Burk-Auftragung jeweils beispielhaft für eine Enzympräparation. Die Erstellung der Graphik erfolgte unter Verwendung des Programms GraphPad Prism. (●) NADH; (■) NADPH.

Anhand der nicht-linearen Regression wurde für NADH ein K_M -Wert von $59 \pm 5,5 \mu\text{M}$ und ein V_{max} -Wert von $307 \pm 7 \text{ U/mg}$ ermittelt. Für NADPH ergab sich ein K_M von $13 \pm 4 \mu\text{M}$ und ein V_{max} von $265 \pm 20 \text{ U/mg}$. Über die lineare Regression wurden vergleichbare kinetische Parameter für die Cofaktoren bestimmt.

3.2.3.9 RT-qPCR

Um festzustellen, ob das Protein Gox1801 eine wichtige Funktion in *G. oxydans* besitzt, wurde die Expression des Gens *gox1801* in dem Wildtyp-Stamm überprüft. Dazu wurde die Transkriptabundanz des Gens *gox1801* im Vergleich zum Expressionslevel eines Referenzgens in dem Kontrollstamm *G. oxydans* Δ *hsdR*, der lediglich das leere Plasmid pBBR1p452 trug, bestimmt. Das verwendete Referenzgen *gox0378* kodierte das ribosomale Protein L23, das in die Translation involviert ist und dementsprechend konstitutiv mit hohen Raten exprimiert wird. Aus dem *G. oxydans*-Stamm wurde die Gesamt-RNA isoliert und in einer RT-qPCR der Quantifikationszyklus (Cp) für die beiden Gene bestimmt. Daraus wurde ein Differenzwert (Δ Cp) und basierend darauf die Expressionsrate des Gens *gox1801* im Vergleich zu dem Referenzgen *gox0378* berechnet. Es zeigte sich, dass das Gen *gox1801* 31-fach höher exprimiert wurde als das Referenzgen. Da das Gen stark exprimiert wurde, muss das Protein Gox1801 eine bedeutende Funktion in *G. oxydans* haben.

3.3 Die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase aus *G. oxydans*

Die PQQ-abhängige membrangebundene Glukose-Dehydrogenase (mGDH) wurde als Modell zur Entwicklung eines Überproduktions- und Aufreinigungssystems für Membranproteine aus *G. oxydans* ausgewählt. Die mGDH spielt die Schlüsselrolle im oxidativen Glukose-Metabolismus von *G. oxydans* und katalysiert den ersten Schritt in der Produktion von Ketoglukonaten über Glukonat. Das entsprechende Enzym aus *G. suboxydans* wurde bereits auf konventionellem Weg über Säulenchromatographie, nach Solubilisierung der Membranfraktion mit dem Detergenz Triton X-100, isoliert und charakterisiert (Ameyama *et al.*, 1981). In dieser Arbeit wurde das entsprechende Protein aus *G. oxydans* durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dazu wurde das Gen *gox0265*, das die mGDH kodiert, zusammen mit der Sequenz für einen Strep-Tag II in den Überexpressionsvektor pBBR1p452, der einen Promotor moderater Stärke besitzt (Kallnik *et al.*, 2010), eingebracht und als Strep-Tag-Fusionsprotein überexprimiert. Zusätzlich zu dem einfachen Strep-Tag II wurden auch zwei Strep-Tag-Varianten, die die Bindung des Fusionsproteins an die Säulenmatrix während der Affinitätschromatographie verbessern sollten, getestet. Die erste Variante zeichnete sich durch eine verlängerte Verbindungssequenz (Linker) zwischen dem Protein und dem Strep-Tag aus (Streplong). Dieser Tag wurde bereits

erfolgreich für die Aufreinigung eines löslichen, periplasmatischen Enzyms aus *Sphingomonas wittichii* eingesetzt (Zeiser *et al.*, 2014). Es wurde vermutet, dass die verlängerte Linkersequenz bei der Aufreinigung von Membranproteinen, die unter Verwendung eines Detergenz solubilisiert wurden, von Vorteil ist. Der Affinitätstag könnte so weiter aus den vorliegenden Mizellen herausragen und entsprechend besser an die Strep-Tactin-Matrix binden. Die zweite Strep-Tag-Variante enthielt eine doppelte Strep-Tag-Sequenz (One-Strep-Tag/Twin-Strep-Tag) und stammte aus dem Vektor pASG-IBA103 (IBA GmbH, Göttingen). Die Aminosäuresequenzen der drei verschiedenen Strep-Tags sind in Abb. 15 dargestellt.

Strep-Tag II	SA- WSHPQFEK
Strep-Tag-long	YVGAPGGGSA- WSHPQFEK
One-Strep-Tag	YVSA- WSHPQFEKGGGGSGGGSSGSSAWSH QFEK

Abb. 15: Vergleich der Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Strep-Tag-Varianten. Fett: die aus acht Aminosäuren bestehende Sequenz des einfachen Strep-Tags.

Neben der Aufreinigung der mGDH wurden die Auswirkungen der mGDH-Überproduktion auf die Atmungskette von *G. oxydans* an ganzen Zellen sowie an Membranfraktionen untersucht. Außerdem wurde die Glukonatproduktion in Kulturen des Überexpressionsstamms im Vergleich zu einem Kontrollstamm verfolgt.

3.3.1 Bioinformatische Analyse der mGDH

Die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621H wird durch das Gen *gox0265* kodiert, das 2427 Basenpaare umfasst. Das dementsprechend aus 808 Aminosäuren bestehende Protein besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 87 kDa sowie einen isoelektrischen Punkt von 5,56. Mit dem Bioinformatikprogramm Phobius (<http://phobius.sbc.su.se>, 30.11.13) wurden für das Protein fünf N-terminale Transmembranhelices und eine große periplasmatische Domäne (Aminosäuren 138 – 808) vorhergesagt. Der TMHMM Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>, 30.11.13) lieferte ein ähnliches Ergebnis. Eine NCBI Datenbanksuche nach konservierten Domänen (NCBI Conserved Domain Search, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, 10.12.13) (Marchler-Bauer & Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009, 2011) ergab, dass das Protein zu den membrangebundenen PQQ-abhängigen Dehydrogenasen aus der

Glukose/Quinat/Shikimat-Familie und der Unterfamilie der membrangebundenen PQQ-abhängigen Glukose-Dehydrogenasen gehört. In der konservierten Domäne der PQQ-abhängigen Glukose-Dehydrogenase wurden 10 von 10 Aminosäureresten, die das putative aktive Zentrum ausmachen (Bindestellen für Calcium und PQQ), und 48 von 48 Aminosäuren, die für das konservierte Tryptophan Docking Motiv charakteristisch sind (Keitel *et al.*, 2000), detektiert.

3.3.2 Klonierung des *mgdh*-Gens (*gox0265*)

Die erste Klonierung des Gens *gox0265* erfolgte vor der Konstruktion der Expressionsvektoren pBBR1p264-ST und pBBR1p452-ST mit dem integrierten Strep-Tag. Deshalb war ein zusätzlicher Klonierungsschritt notwendig, um das Gen mit der Sequenz für einen Strep-Tag II zu fusionieren. Das Gen *gox0265* wurde, inklusive 32 Basenpaaren der stromaufwärts liegenden Region (5'-UTR), amplifiziert. Somit enthielt das amplifizierte DNA-Produkt von 2491 bp (Abb. 16 A) auch die natürliche, zu dem *mgdh*-Gen gehörige Ribosomenbindestelle. Als Matrize für die PCR diente genomische DNA des Wildtyp-Stamms *G. oxydans* 621H. Durch die verwendeten Oligonukleotide *gox0265*-p3_f und *gox0265*-p3_r wurden an beiden Enden *Bsa*I-Restriktionsschnittstellen angefügt, über die das Amplikon in den Vektor pASK-IBA3plus (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland) eingebracht werden konnte. Da sich auch eine *Bsa*I-Schnittstelle in dem Gen selbst befindet, mussten die beiden entstandenen Genfragmente zuvor re-ligiert werden. Mit den Primern pASK3EcoRI_f und pASK3ST_r wurde das Gen *gox0265* im Anschluss, einschließlich der C-terminalen Strep-Tag-Sequenz, aus dem entstandenen Konstrukt pASK3-*gox0265* amplifiziert. Das 2520 bp umfassende Amplikon (Abb. 16 B) konnte anschließend über die angefügten *Eco*RI- und *Xho*I-Restriktionsschnittstellen in den Expressionsvektor pBBR1p452 eingebracht werden (Abb. 19 A). *E. coli*-Kolonien, die einen Vektor mit dem Gen *gox0265* trugen, wurden in einer Kolonie-PCR mit den Primern pBBR1-f und pASK-r identifiziert. Die Größe des zu erwartenden PCR-Produkts betrug 3107 bp (Abb. 16 C).

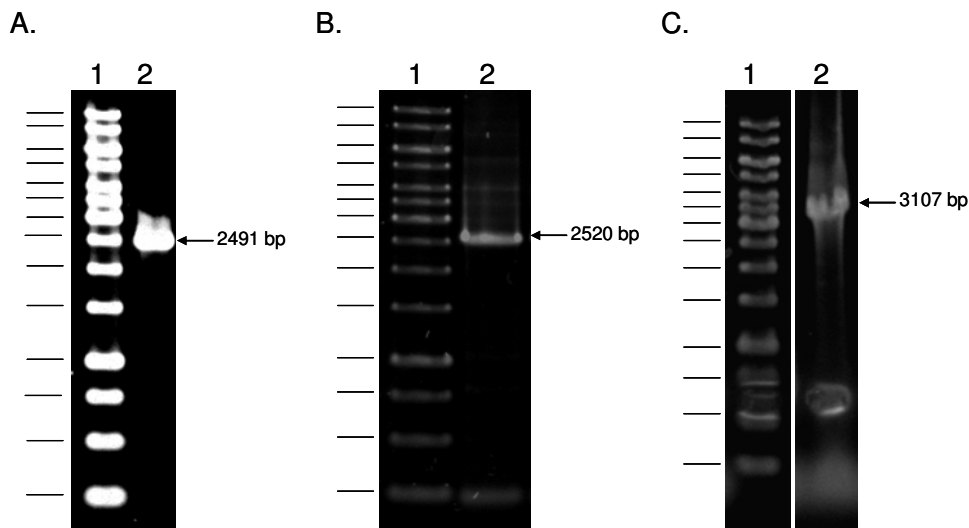


Abb. 16: Klonierung des Gens *gox0265*. (A) Produkt aus der PCR zur Amplifizierung des Gens *gox0265*. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, von oben: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250 bp); Spur 2: PCR-Produkt. (B) Produkt aus der PCR zur Amplifizierung des Gens *gox0265* zusammen mit der Strep-Tag II-Sequenz aus Vektor pASK-IBA3plus. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); Spur 2: PCR-Produkt. (C) Produkt der PCR zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien, die den Vektor pBBR1p452 mit dem Gen *gox0265* inklusive der Strep-Tag-Sequenz trugen. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); Spur 2: Produkt der Kolonie-PCR.

Des Weiteren wurde Gen *gox0265* auch in den Vektor pBBR1p452-Streplong, der die Sequenz für einen Strep-Tag mit einer verlängerten Verbindungssequenz (Linker) zwischen Protein und Strep-Tag enthielt, eingebracht (Abb. 17). Um dieses Plasmid zu erhalten, wurde die Promotorregion p264 in dem Vektor pBBR1p264-Streplong (Zeiser *et al.*, 2014) gegen die Promotorregion p452 aus dem Vektor pBBR1p452 ausgetauscht. Diese wurde unter Verwendung der Primer Upstrep_f und Strep-long_r amplifiziert und das 623 bp umfassende DNA-Fragment (Abb. 18 A) anschließend über die angefügten *PvuI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pBBR1p264-Streplong eingebracht.

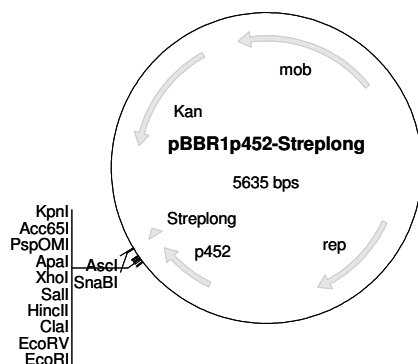


Abb. 17: Vektorkarte des Plasmids pBBR1p452-Streplong. Mit rep: Replikationsursprung; Kan: Kanamycinresistenzkassette; mob: Mobilisierungsgen; Streplong: Sequenz für einen Strep-Tag mit verlängerter Linkersequenz; p452: Promotorregion des Gens *gox0452*.

Das Gen *gox0265* wurde darauf in einer PCR mit den Primern *gox0265_f* und *gox0265SnaBI_r*, inklusive der stromaufwärts gelegenen Ribosomenbindestelle, amplifiziert und das Amplikon von 2475 bp über die angefügten *EcoRI*- sowie *SnaBI*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pBBR1p452-Streplong kloniert. Zur Identifizierung von Kolonien, die das Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment trugen, wurde eine PCR mit den Primern pBBR1-f und pASK-r durchgeführt. Die Größe des mit diesen Primern erwarteten PCR-Produkts betrug 3036 bp (Abb. 18 B). Der entstandene Vektor pBBR1p452-*gox0265*-Streplong (Abb. 19 B) wurde im Folgenden auch als Grundlage zur Herstellung des Vektors pBBR1p452-*gox0265*-OneST (Abb. 19 C) eingesetzt, der die Sequenz für den doppelten Strep-Tag aus Vektor pASG-IBA103 (IBA GmbH, Göttingen, Deutschland) enthielt. Dazu wurde die One-Strep-Tag-Sequenz unter Verwendung der Primer pASG-for und pASG-rev amplifiziert und dann die Streplong-Sequenz in dem Ausgangsvektor über die *SnaBI*- und *AseI*-Restriktionsschnittstellen gegen die amplifizierte One-Strep-Tag-Sequenz ausgetauscht. Dieses DNA-Fragment umfasste 340 bp (Abb. 18 C). In der darauf folgenden Kolonie-PCR wurden ebenfalls die Primer pASG-for und pASG-rev verwendet.

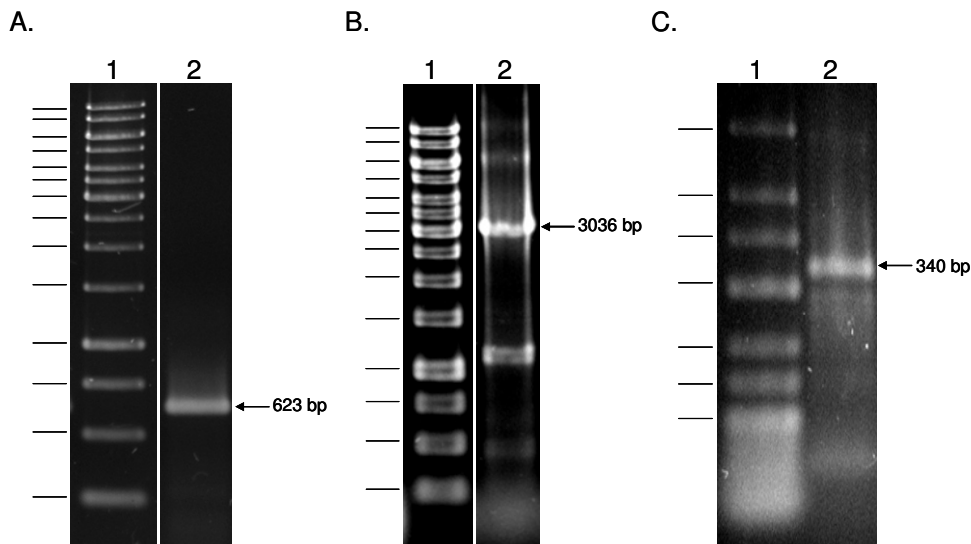


Abb. 18: Konstruktion der Vektoren pBBR1p452-Streplong, pBBR1p452-*gox0265*-Streplong und pBBR1p452-*gox0265*-OneST. (A) Produkt der PCR zur Amplifizierung der Promotorregion p452. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, von oben: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250 bp); Spur 2: amplifizierte Promotorregion. (B) Produkt der Kolonie-PCR zur Identifizierung von Kolonien, die den Vektor pBBR1p452-*gox0265*-Streplong trugen. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); Spur 2: Produkt aus der Kolonie-PCR. (C) Produkt der PCR zur Amplifizierung der One-Strep-Tag-Sequenz. Spur 1: GeneRuler Low-Range DNA Ladder (Thermo Scientific, von oben: 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100 bp); Spur 2: amplifizierte One-Strep-Tag-Sequenz.

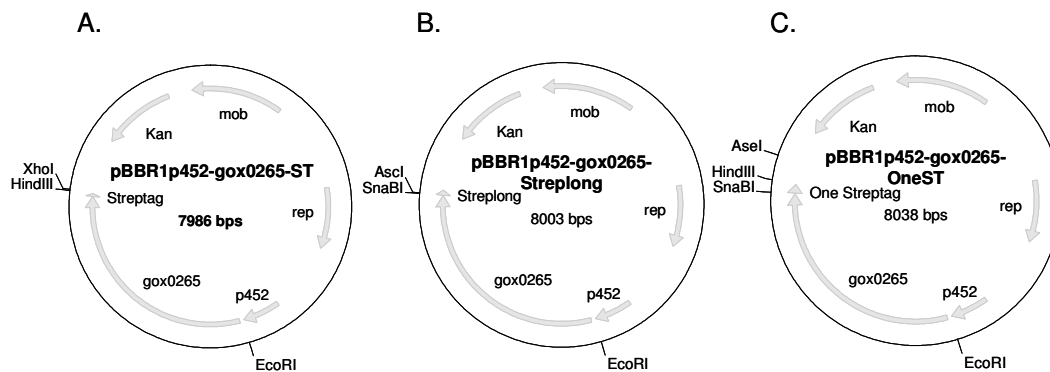


Abb. 19: Darstellung der drei Vektoren, die für die Überproduktion der mGDH (Protein Gox0265) verwendet wurden. (A) pBBR1p452-*gox0265*-ST; (B) pBBR1p452-*gox0265*-Streplong; (C) pBBR1p452-*gox0265*-OneST. Mit rep: Replikationsursprung; Kan: Kanamycinresistenzkassette; mob: Mobilisierungsgen; Streptag: Sequenz für den Strep-Tag II; Streplong: Sequenz für den Strep-Tag mit verlängerter Linkersequenz; One Streptag: Sequenz für den One-Strep-Tag; p452: Promotorregion des Gens *gox0452*.

Nach der Klonierung wurden die isolierten Vektoren zuerst in einem Restriktionsverdau und anschließend durch Sequenzierung mit den Primern pBBR1-f und pASK-r überprüft. Für die

homologe Expression wurden die Plasmide durch Elektroporation in *G. oxydans* Δ hsdR eingebracht.

3.3.3 Relative Transkriptabundanz des *mgdh*-Gens

Um die Plasmid-basierte Expression des *mgdh*-Gens zu validieren, wurde die Gesamt-RNA aus dem Stamm *G. oxydans* Δ hsdR mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-ST, sowie aus einem Kontrollstamm, der das Plasmid pBBR1p452 enthielt, isoliert und eine RT-qPCR durchgeführt. Dabei wurde jeweils das konstitutiv exprimierte *gapdh*-Gen (*gox0508*), das die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodiert, als Referenz für die Bestimmung der relativen *mgdh*-Expressionsrate verwendet. Für beide Gene wurde in der RT-qPCR der Quantifikationszyklus (Cp) bestimmt, in dem das Fluoreszenzsignal der Probe einen festgelegten Schwellenwert überschritt. Aus der Differenz der Cp-Werte (Δ Cp) wurde anschließend die relative Transkriptionsrate des *mgdh*-Gens im Vergleich zu dem Referenzgen ($2^{-\Delta$ Cp}) bestimmt. Es zeigte sich, dass die relative Transkriptabundanz des *mgdh*-Gens in dem Stamm, der das Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-ST trug, im Vergleich zu dem Kontrollstamm mit dem leeren Vektor neunfach erhöht war (Tabelle 5). Aufgrund dieser Überexpression des Plasmid-kodierten *mgdh*-Gens in *G. oxydans* war davon auszugehen, dass sich der Organismus für die Überproduktion der mGDH als Modell für membrangebundene PQQ-abhängige Dehydrogenasen eignet.

Tabelle 5: Analyse der Transkriptabundanz des *mgdh*-Gens.

<i>G. oxydans</i> Δ hsdR mit dem Plasmid	Cp (<i>gapdh</i>)	Cp (<i>mgdh</i>)	Δ Cp (<i>mgdh</i> - <i>gapdh</i>)	$2^{-\Delta$ Cp (Verhältnis <i>mgdh</i> / <i>gapdh</i>)
pBBR1p452- <i>gox0265</i> -ST	21,5 \pm 0,3	17,6 \pm 0,1	- 3,9	14,9
pBBR1p452	20,8 \pm 0,1	20,1 \pm 0,1	- 0,7	1,6

3.3.4 Effekte der mGDH-Überproduktion auf die Atmungskette von *G. oxydans*

3.3.4.1 Wachstum und Glukonatproduktion von *G. oxydans* auf D-Glukose

Kulturen des Stamms *G. oxydans* Δ hsdR mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-ST und des Kontrollstamms *G. oxydans* Δ hsdR mit dem Plasmid pBBR1p452 wurden in 50 – 100 mL YG-Medium angezogen und zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums Proben

entnommen. Anhand dieser wurden die $OD_{600\text{ nm}}$, der pH-Wert, und der Glukose- sowie Glukonatgehalt bestimmt. Zellzählungen mithilfe einer Thomakammer ergaben, dass die Zellzahlen in dem Überexpressions- und Kontrollstamm bei gleicher optischer Dichte äquivalent waren (etwa 1×10^9 Zellen/mL bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 1). Zudem konnte im Lichtmikroskop kein Unterschied in der Zellform und -größe beobachtet werden. Somit war die optische Dichte geeignet, um das Wachstum der beiden Stämme zu vergleichen. Die Verdopplungszeit des mGDH-Überproduktionsstamms war mit $2,5 \pm 0,2$ Stunden etwas höher als die des Kontrollstamms mit einer Verdopplungszeit von $2,2 \pm 0,2$ Stunden. Konstante Wachstumsraten in der exponentiellen Wachstumsphase zeigten, dass die Anzahl an lebensfähigen Zellen sowohl hoch als auch konstant war und dass die Überproduktion der mGDH nicht zum Zelltod führte. Die optische Dichte des Überexpressions- und Kontrollstamms erreichte unter den gegebenen Wachstumsbedingungen jeweils einen Wert von $0,6 \pm 0,1$ (Abb. 20). Auch die Änderung des pH-Werts verlief bei beiden Stämmen vergleichbar. Der pH-Wert sank von 4,8 nach dem Animpfen der Kulturen bis zu dem Beginn der stationären Phase auf 3,2.

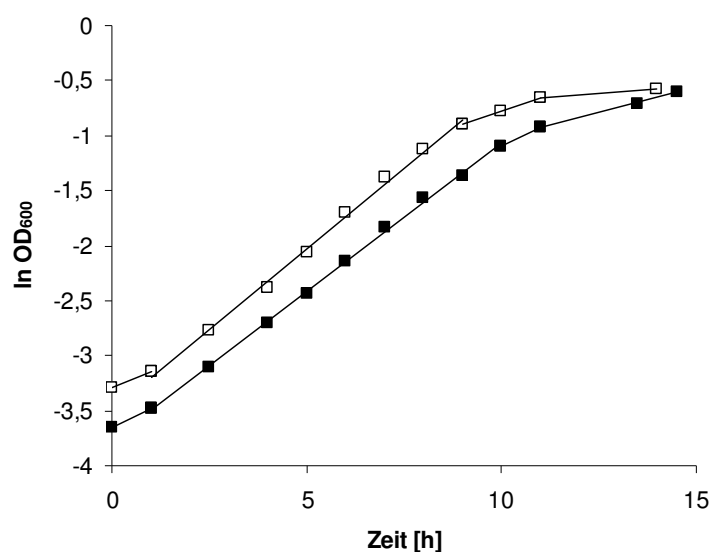


Abb. 20: Beispielhafte Wachstumskurven für *G. oxydans* $\Delta hsdR$ mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-ST und den Kontrollstamm *G. oxydans* $\Delta hsdR$ mit dem Plasmid pBBR1p452. (■) mGDH-Überproduktionsstamm; (□) Kontrollstamm.

Der Gehalt an Glukonat, 2-Keto-D-Glukonat und 5-Keto-D-Glukonat in den Proben wurde nach Abzentrifugieren der Zellen durch eine HPLC-Analyse des gefilterten Mediums bestimmt. Die Auftrennung erfolgte über eine Aminex HPX878 Säule (Bio-Rad) unter Verwendung von 5 mM Schwefelsäure als mobile Phase bei 65 °C und einer Flussrate von

0,3 mL/min. Zur Detektion der Glukonate bei 210 nm diente ein UV-Detektor und die Konzentrationen von Glukonat, 2-Keto-D-Glukonat und 5-Keto-D-Glukonat in den Proben wurde anhand von Kalibrierkurven der käuflichen Standards ermittelt. Die Retentionszeiten betragen 15,81 Minuten für 2-Keto-D-Glukonat, 16,39 Minuten für 5-Keto-D-Glukonat und 17,65 Minuten für Glukonat. Die Glukosekonzentration in den Proben wurde im Anschluss enzymatisch mit einem D-Glukose/D-Fruktose UV-Testkit (R-Biopharm AG, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Um trotz der leicht unterschiedlichen Verdopplungszeiten des mGDH-Überproduktions- und des Kontrollstamms einen Vergleich zu ermöglichen, wurden die Glukonat- und Ketoglukonatproduktion, sowie der Glukoseverbrauch über die optische Dichte normalisiert. Die Ergebnisse für jeweils zwei unabhängige Kulturen sind in Abb. 21 und Abb. 22 dargestellt.

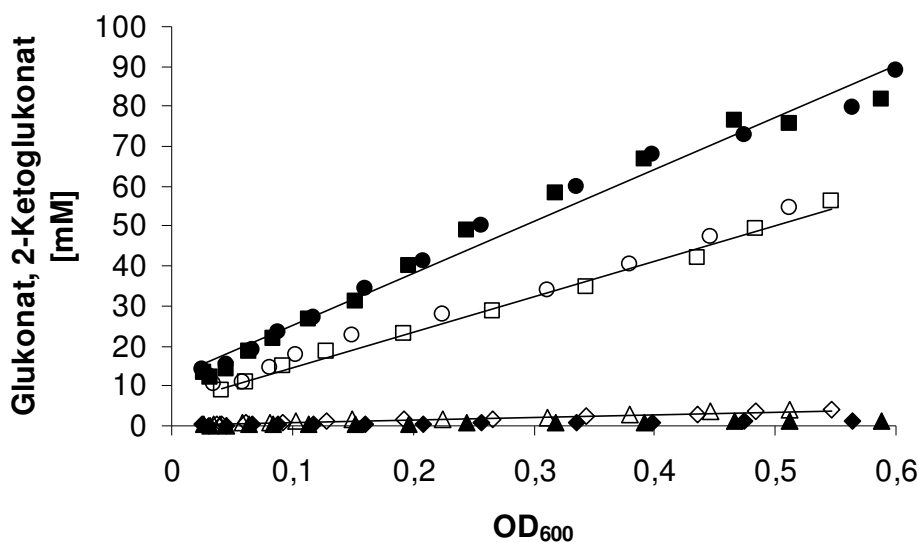


Abb. 21: Glukonat- und 2-Ketoglukonatproduktion des mGDH-Überproduktionsstamms und des Kontrollstamms. (■), (●) Glukonatproduktion von zwei unabhängigen Replikaten des Überproduktionsstamms; (▲), (◆) 2-Ketoglukonatproduktion des Überproduktionsstamms; (□), (○) Glukonatproduktion von zwei unabhängigen Replikaten des Kontrollstamms; (Δ), (◇) 2-Ketoglukonatproduktion des Kontrollstamms.

Die Glukonatproduktionsrate des mGDH-Überproduktionsstamms war im Vergleich zu dem Kontrollstamm um etwa 70 % erhöht und auch die Glukoseverbrauchsrates war entsprechend höher (siehe Tabelle 6). Bei einer OD_{600 nm} von 0,6 hatte der Überproduktionsstamm fast die gesamte zur Verfügung stehende Glukose aufoxidiert, wogegen in den Kulturen des Kontrollstamms noch etwa 40 mM Glukose vorhanden waren. Dies spiegelte sich auch in der Glukonatgesamtproduktion wieder, mit etwa 90 mM in dem Kulturüberstand des

Überexpressionsstamms und 60 mM in dem Kulturüberstand des Kontrollstamms. Die Ketoglukonatkonzentrationen waren sowohl für den mGDH-Überproduktionsstamm als auch für den Kontrollstamm niedrig. Mit beiden Stämmen wurden weniger als 1 mM 5-Ketoglukonat detektiert und bis zu 1 mM 2-Ketoglukonat für den Überexpressionsstamm bzw. bis zu 4 mM 2-Ketoglukonat für den Kontrollstamm nachgewiesen.

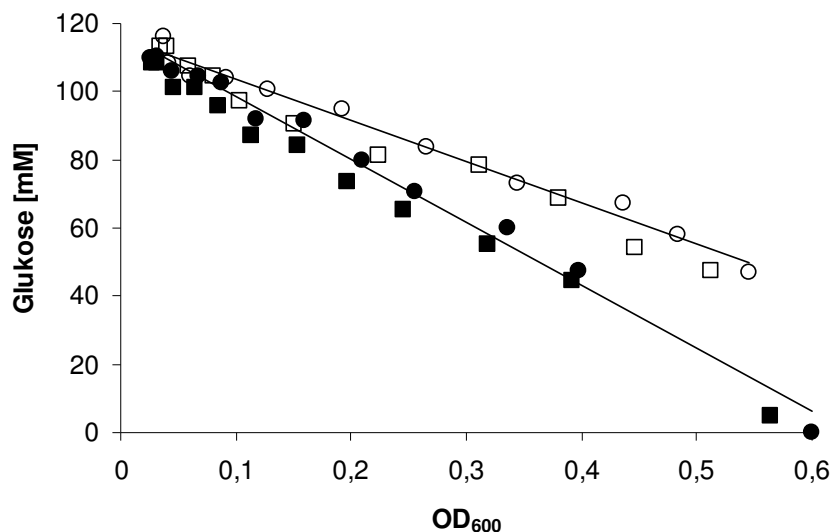


Abb. 22: Glukoseverbrauch von jeweils zwei unabhängigen Kulturen des mGDH-Überproduktionsstamms und des Kontrollstamms. (■), (●) Überproduktionsstamm; (□), (○) Kontrollstamm.

Die gesteigerten Glukoseverbrauchs- und Glukonatproduktionsraten zeigten, dass die durch RT-qPCR ermittelte erhöhte Expression des *mgdh*-Gens zu einer erhöhten Produktion der mGDH führte. Des Weiteren war die Glukonatproduktion proportional zu der Zellzahl pro Milliliter in der exponentiellen Wachstumsphase, was darauf hinwies, dass die Aktivität der mGDH nicht durch externe Parameter wie den pH-Wert oder den Sauerstoffpartialdruck in der Kultur limitiert wurde.

Tabelle 6: Glukonatproduktions- und Glukoseverbrauchsrate für den *G. oxydans* mGDH-Überproduktionsstamm und den Kontrollstamm.

<i>G. oxydans</i> Δ hsdR mit dem Plasmid	Glukonatproduktionsrate [mM/OD _{600 nm}]	Glukoseverbrauchsrate [mM/OD _{600nm}]
pBBR1p452- <i>gox0265</i> -ST	155 ± 5	185 ± 0,1
pBBR1p452	89 ± 2	126 ± 7

3.3.4.2 Glukose-Oxidation durch ruhende Zellen von *G. oxydans*

Ruhende Zellen von *G. oxydans* $\Delta hsdR$ mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-ST und dem Kontrollstamm mit dem Vektor pBBR1p452 wurden wie unter „Material und Methoden“ beschrieben hergestellt und der Proteingehalt in einem modifizierten Biuret-Test bestimmt. Die Oxidation von Glukose durch die ruhenden Zellen wurde sowohl photometrisch mit den artifiziellen Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP als auch anhand einer Sauerstoffelektrode bestimmt (siehe Tabelle 7). Die Messungen wurden in 40 mM KP-Puffer pH 6 bei 25 °C durchgeführt und die Substratkonzentration in den Ansätzen betrug jeweils 60 mM.

Tabelle 7: Spezifische Aktivität von ruhenden Zellen des *mgdh*-Überexpressionsstamms und des Kontrollstamms gemessen mit den artifiziellen Elektronenakzeptoren PMS-DCPIP, sowie die Sauerstoffverbrauchsrate der beiden Stämme, jeweils mit Glukose als Substrat.

<i>G. oxydans</i> $\Delta hsdR$ mit dem Plasmid	Spezifische Aktivität mit PMS-DCPIP [U/mg] ^a	Sauerstoffverbrauchsrate [nmol $\frac{1}{2}O_2$ min ⁻¹ mg ⁻¹]
pBBR1p452- <i>gox0265</i> -ST	3,6 ± 0,2	1440 ± 296
pBBR1p452	1,6 ± 0,1	923 ± 166

^a1 U/mg = 1 μ mol min⁻¹ mg⁻¹ Protein

Die spezifische Aktivität der ruhenden Zellen des *mgdh*-Überexpressionsstamms, gemessen mit den Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP (3,6 ± 0,2 U/mg), war 2,2-fach höher im Vergleich zu dem Kontrollstamm (1,6 ± 0,1 U/mg). Parallel war die Sauerstoffverbrauchsrate (1440 ± 296 nmol $\frac{1}{2}O_2$ min⁻¹ mg⁻¹) 1,6-fach höher als bei dem Kontrollstamm (923 ± 166 nmol $\frac{1}{2}O_2$ min⁻¹ mg⁻¹). Dies zeigte, dass die zu beobachtende Steigerung der Glukonatproduktion tatsächlich aus einer vermehrten Produktion der mGDH und beschleunigten Respirationsraten resultierte.

3.3.4.3 Spezifische Aktivität der Membranfraktionen von *G. oxydans* mit den Substraten Glukose, Ethanol und Mannitol

Sowohl für den *G. oxydans* $\Delta hsdR$ mGDH-Überproduktionsstamm als auch für den Kontrollstamm wurden Membranfraktionen präpariert. Hierzu wurden entsprechende Kulturen in 400 mL YM-Medium bis zu einer OD_{600 nm} von 0,8 – 1,2 angezogen und die Zellen geerntet. Im Anschluss wurden die in Puffer resuspendierten Zellen im Ultraschall lysiert, das Lysat abzentrifugiert und die Membranfraktionen durch Ultrazentrifugation pelletiert. Nach dem Waschen der Pellets wurden die Membranfraktionen in 40 mM KP-Puffer pH 7 resuspendiert und der Proteingehalt mit dem Bradford-Reagenz

ermittelt. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Membranfraktionen wurden 60 mM Substrat, die Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP, sowie 5 – 9 μg Membranprotein in die Reaktionsansätze gegeben. Die Oxidation der Substrate D-Glukose und Ethanol wurde bei einem pH-Wert von 7 (40 mM KP-Puffer) gemessen und die Oxidation von Mannitol wurde bei einem pH-Wert von 5 (50 mM Natriumacetat-Kaliumphosphat-Puffer) gemessen. Mit letzterem Substrat konnte keine Aktivität der Membranfraktionen bei pH 7 festgestellt werden, da es sich bei dem verantwortlichen Enzym vermutlich um die nur im sauren pH-Bereich aktive membrangebundene Sorbitol-Dehydrogenase handelt (Sugisawa & Hoshino, 2002). Während die spezifische Aktivität der Membranfraktionen des mGDH-Überproduktionsstamms mit Glukose als Substrat mit $13,3 \pm 0,6$ U/mg etwa fünffach erhöht war im Vergleich zu dem Kontrollstamm mit $2,5 \pm 0,1$ U/mg, war die spezifische Aktivität mit Ethanol (0,9 U/mg) und Mannitol (0,2 U/mg) bei beiden Stämmen gleich (Abb. 23). Folglich wurde die mGDH in signifikanter Menge überproduziert und in funktionaler Form in die Membran integriert, ohne dass dabei die Produktion anderer membrangebundener Dehydrogenasen (Alkohol-Dehydrogenase, Sorbitol-Dehydrogenase) beeinflusst wurde.

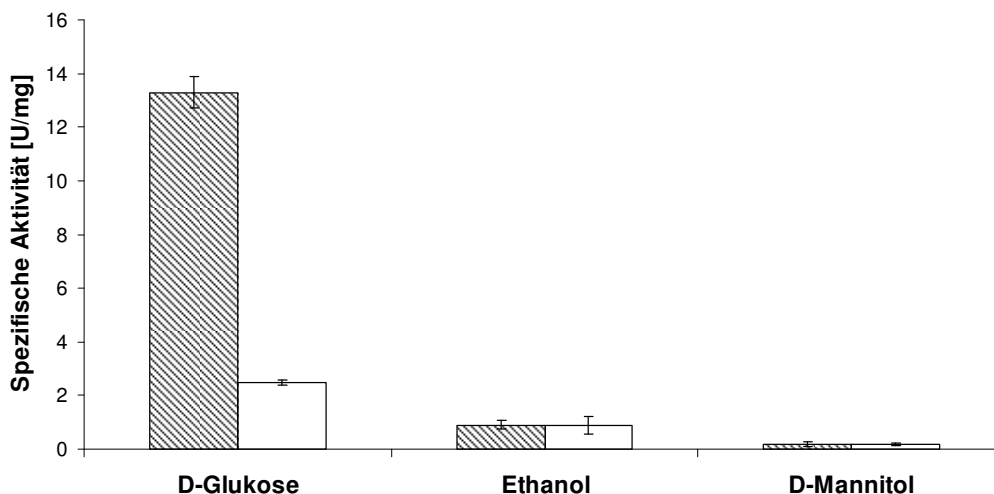


Abb. 23: Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Membranfraktionen des *G. oxydans* ΔhsdR mGDH-Überproduktionsstamms und des Kontrollstamms mit den Substraten D-Glukose, Ethanol und D-Mannitol. Schraffierte Säulen: Überproduktionsstamm; ungefüllte Säulen: Kontrollstamm. Fehlerbalken: \pm Standardfehler (SEM). Modifizierte Abbildung aus Meyer *et al.*, (2013).

3.3.4.4 Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktionen mit Glukose und Ethanol

Der Sauerstoffverbrauch der Membranfraktionen des mGDH-Überproduktionsstamms und des Kontrollstamms mit Glukose sowie Glukose und Ethanol wurde mithilfe einer Sauerstoffelektrode bestimmt. Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug 3 mL bestehend aus KP-Puffer pH 7, 60 mM der Substrate und der Membranfraktion (0,75 mg Protein). Die Temperatur wurde durch ein Wasserbad konstant auf 25 °C gehalten. Die Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktionen mit D-Glukose als Substrat war bei dem mGDH-Überproduktionsstamm sehr hoch ($1075 \pm 64 \text{ nmol } \frac{1}{2}\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) und in etwa dreimal schneller als bei dem Kontrollstamm ($368 \pm 19 \text{ nmol } \frac{1}{2}\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) (Abb. 24 und Abb. 25).

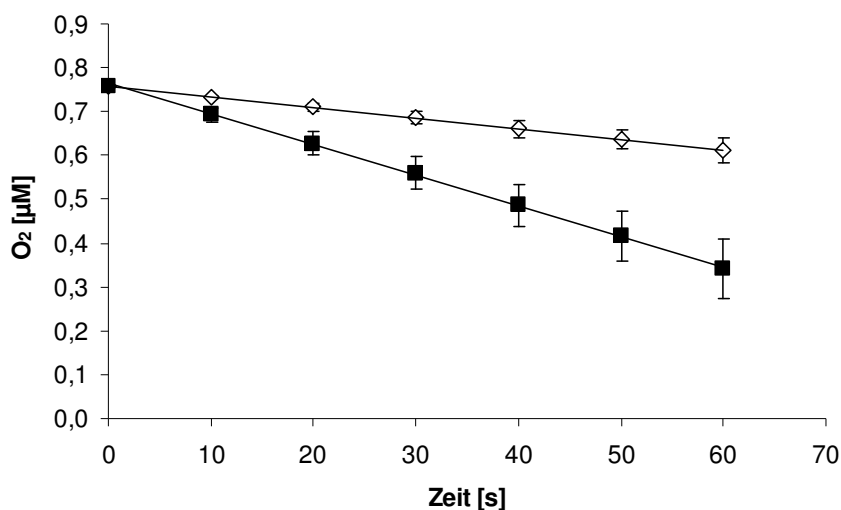


Abb. 24: Sauerstoffverbrauchsrate von Membranfraktionen des mGDH-Überproduktionsstamms und des Kontrollstamms mit dem Substrat D-Glukose. Die gezeigten Werte stellen die Sauerstoffverbrauchsrate für äquivalente Proteinmengen dar. (■) mGDH-Überproduktionsstamm; (◇) Kontrollstamm. Fehlerbalken: \pm Standardfehler (SEM). Modifizierte Abbildung aus Meyer *et al.*, (2013).

Während die Sauerstoffverbrauchsrate des Kontrollstamms ungefähr verdoppelt werden konnte, wenn zusätzlich zu D-Glukose auch Ethanol in den Ansatz gegeben wurde, konnte die Sauerstoffverbrauchsrate des Überexpressionsstamms auf diese Weise nicht weiter gesteigert werden (Abb. 25). Dies zeigte, dass bei dem Kontrollstamm sowohl die mGDH als auch die Alkohol-Dehydrogenase Elektronen an Ubichinon abgaben und die Kapazität der Endoxidasen in diesem Fall groß genug war, um alles gebildete Ubichinol zu oxidieren. Anders war die Situation bei dem Überexpressionsstamm. Aufgrund der überproduzierten

mGDH wurde die Atmungskette hier allein durch die Oxidation von Glukose gesättigt und die gemessene Sauerstoffverbrauchsrate stellte die maximale Elektronentransportkapazität dar.

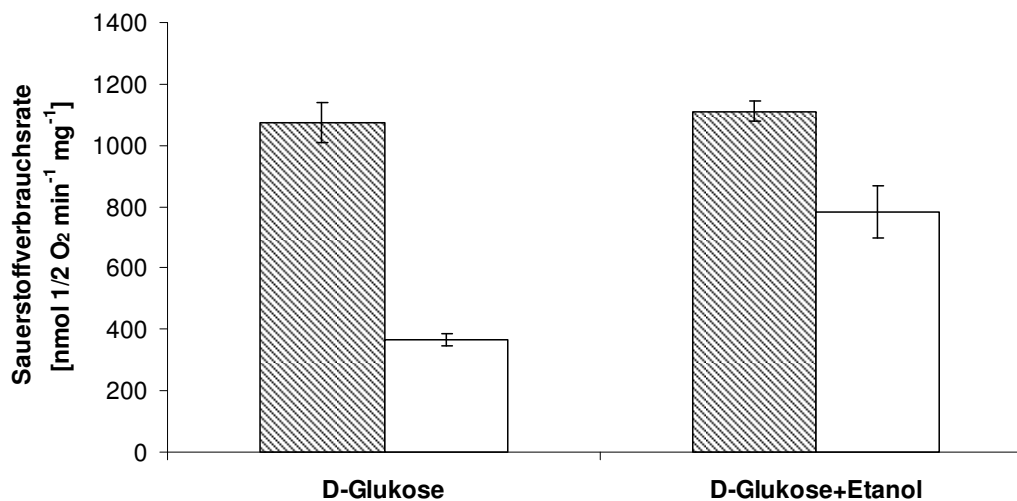


Abb. 25: Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktionen des *G. oxydans* $\Delta hsdR$ mGDH-Überproduktionsstamms und des Kontrollstamms mit den Substraten Glukose, sowie Glukose und Ethanol. Schraffierte Säulen: mGDH-Überproduktionsstamm; ungefüllte Säulen: Kontrollstamm. Fehlerbalken: \pm Standardabweichung (SD).

3.3.5 Aufreinigung und Charakterisierung der mGDH

Aus 400 mL Kulturen von *G. oxydans* $\Delta hsdR$ mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-ST wurden die Membranfraktionen präpariert und diese mit 1 % (v/v) Triton X-100 über Nacht solubilisiert. Durch Ultrazentrifugation wurde die unlösliche Fraktion abgetrennt und aus dem Überstand die mGDH über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (alle Puffer enthielten 0,1 % Triton X-100) aufgereinigt.

3.3.5.1 SDS-PAGE und Western-Blot der aufgereinigten mGDH

Die gereinigte mGDH wurde durch eine SDS-PAGE und einen Western-Blot analysiert. In dem mit Silber gefärbten Gel war eine einzelne, klare Bande sichtbar. Das mithilfe eines Größenstandards ermittelte Molekulargewicht betrug 89 kDa und entsprach somit der vorhergesagten Größe des Proteins inklusive des Strep-Tags von 88,5 kDa (Abb. 26 A). Auch auf dem Western-Blot konnte über das Strep-Tactin-Myeloperoxidase-Konjugat eine entsprechende einzelne Bande detektiert werden (Abb. 26 B). Das Enzym lag also in reiner Form vor.

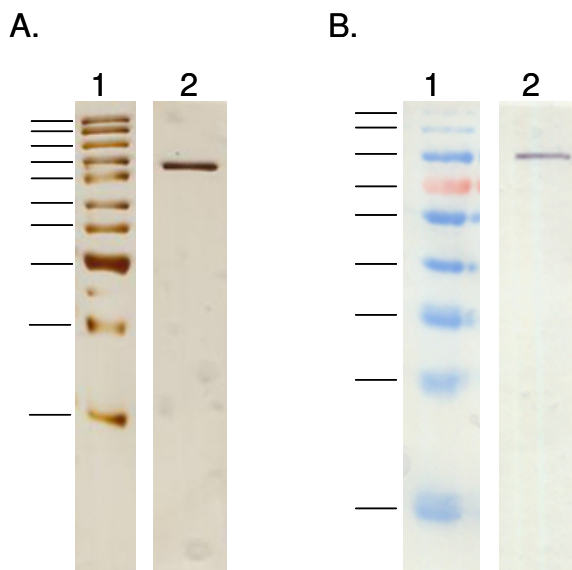


Abb. 26: SDS-PAGE und Western-Blot der mGDH. (A) SDS-PAGE. Spur 1: PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, von oben: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30 kDa); Spur 2: gereinigte rekombinante mGDH. (B) Western-Blot. Spur 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, von oben: 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17 kDa); Spur 2: gereinigte mGDH.

3.3.5.2 Anreicherung der mGDH

Um die Anreicherung der mGDH während des Aufreinigungsprozesses verfolgen zu können, wurde in der Membranfraktion vor der Solubilisierung, im Durchfluss, in den Waschfraktionen und in den Elutionsfraktionen jeweils die Aktivität mit Glukose gemessen. Für die Bestimmung des Proteingehalts, in den mit dem Detergenz Triton X-100 versetzten Fraktionen, wurde ein Kit eingesetzt, das speziell für Proben mit Detergenzien geeignet ist (Bio-Rad DC Protein Assay Kit). In Tabelle 8 ist beispielhaft eine mGDH-Aufreinigung dargestellt.

Tabelle 8: Beispiel einer Aufreinigung der mGDH aus *G. oxydans* Δ hsdR mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-ST über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.

Fraktion	Volumen [mL]	Volumen-aktivität [U/mL]	Protein-gehalt [mg/mL]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Gesamt-aktivität [U]	Ausbeute [%]
Membranfraktion	1	276	17,0	16,2	276	100
Durchfluss	10	19,7	5,2	3,8	197	71
Waschfraktionen	9	3,3	0,7	4,7	29,8	11
Elutionsfraktionen	3	2,9	0,02	145	8,7	3,2

Es zeigte sich, dass ein signifikanter Anteil der mGDH-Ausgangsaktivität nach der Aufreinigung im Durchfluss vorlag. Zudem konnten aus 17 mg Membranprotein nur insgesamt 60 µg der reinen mGDH gewonnen werden. Da die Kapazität der Strep-Tactin-Matrix für ein Protein von 88,5 kDa im Bereich von 9 mg liegt (Berechnung nach Angaben des Herstellers) und somit nicht durch die Menge der mGDH ausgeschöpft gewesen sein konnte, war das Binden des solubilisierten Membranproteins an das Säulenmaterial offensichtlich ineffizient. Dennoch war die Menge an gereinigter mGDH ausreichend, um das Enzym zu charakterisieren.

3.3.5.3 Spezifische Aktivität der gereinigten mGDH

Da die Aktivität der mGDH bei pH 6 im Vergleich zu pH 7 etwas höher lag, wurden die Messungen im Folgenden in 40 mM KP-Puffer bei pH 6 durchgeführt. Die Temperatur wurde konstant auf 25 °C gehalten und als artifizielle Elektronenakzeptoren wurden PMS und DCPIP eingesetzt. Die spezifische Aktivität der gereinigten mGDH mit Glukose betrug 150 ± 30 U/mg und das Enzym zeigte geringere Aktivitäten mit weiteren Substraten.

3.3.5.4 Substratspektrum der mGDH

Zusätzlich zu D-Glukose wurde die Aktivität der mGDH mit weiteren D- und L-Aldosen, Aldosederivaten, D-Fruktose und Ethanol getestet. Dabei wurde nur mit den D-Aldosen und Aldosederivaten eine Oxidation beobachtet. Während D-Glukose das bevorzugte Substrat der mGDH war, wurden auch 2-Deoxy-D-Glukose, D-Allose, D-Fucose und D-Xylose mit Oxidationsraten von mehr als 10 % bezogen auf die Glukoseoxidationsrate umgesetzt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Substratspektrum der gereinigten mGDH.

Substrat	Aktivität [%] ^a
D-Glukose	100
2-Deoxy-D-Glukose	72
D-Allose	43
D-Fucose	33
D-Xylose	11
D-Galaktose	7
D-Glukosamin	6
Melibiose	6
D-Maltose	6
L-Arabinose	5
D-Gulose	4

^aDie Oxidation wurde mit 20 mM Substrat bei pH 6 in 40 mM KP-Puffer unter Verwendung der Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP gemessen. Die Aktivitäten sind als Prozentanteil bezogen auf die Aktivität mit Glukose angegeben (150 U/mg). Eine Unit wurde definiert als die Menge Enzym, die die Umsetzung von 1,0 μmol Substrat pro Minute katalysiert. In Ansätzen mit D-Mannose, D-Ribose, D-Arabinose, D-Xylose, D- oder L-Altrose, D- oder L-Talose und D- oder L-Idose wurde keine Aktivität der mGDH beobachtet.

3.3.5.5 Kinetische Parameter der mGDH

Die kinetischen Parameter der mGDH wurden durch nicht-lineare Regression der Michaelis-Menten-Daten unter Verwendung des Programms GraphPad Prism bestimmt (Abb. 27). Hierzu wurde die spezifische Aktivität bei variierenden Substratkonzentrationen (1 – 50 mM) gemessen. Für die Oxidation von Glukose durch die mGDH ergaben sich daraus ein V_{max} -Wert von $216 \pm 5,4$ U/mg und ein K_M -Wert von $5,9 \pm 0,34$ mM. Die katalytische Effizienz, k_{cat}/K_M , lag bei $5,4 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

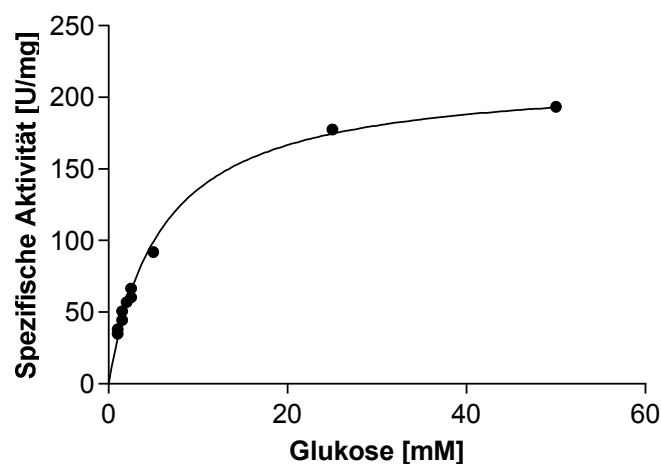


Abb. 27: Nicht-lineare Regression der Michaelis-Menten-Daten für die Oxidation von Glukose durch die mGDH. Die Grafik wurde mit dem Programm GraphPad Prism erstellt.

3.3.5.6 Aufreinigung der mGDH anhand des Strep-Tags mit verlängerter Linkersequenz (Streplong)

Um zu testen, ob eine verlängerte Linkersequenz zwischen Membranprotein und Strep-Tag zu einer Verbesserung der Ausbeute in der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie beiträgt, wurde die Aufreinigung der mGDH aus *G. oxydans* Δ hsdR mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-Streplong analog zu der für den einfachen Strep-Tag beschriebenen Aufreinigung durchgeführt. Doch obwohl mit den Membranfraktionen eine erhöhte spezifische Aktivität mit Glukose (bis zu 8 U/mg) im Vergleich zu Membranfraktionen des Kontrollstamms mit dem Plasmid pBBR1p452 (2,5 U/mg) gemessen wurde, verlief die Aufreinigung nicht erfolgreich. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass sich der Strep-Tag mit verlängerter Linkersequenz (Streplong) nicht für die Aufreinigung der mGDH aus *G. oxydans* eignet.

3.3.5.7 Aufreinigung der mGDH mithilfe des doppelten Strep-Tags (One-Strep-Tag)

Da die Bindung von Strep-Tag Fusionsproteinen an die Strep-Tactin-Matrix auch durch die Verwendung einer doppelten Strep-Tag-Sequenz (One-Strep-Tag/Twin-Strep-Tag) verbessert werden kann (Schmidt *et al.*, 2013), wurde diese für die Aufreinigung der mGDH eingesetzt. Dabei wurde die Aufreinigung der mGDH aus *G. oxydans* Δ hsdR mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-OneST ebenfalls analog zu der Aufreinigung anhand des einfachen Strep-Tags durchgeführt.

3.3.5.8 SDS-PAGE der aufgereinigten mGDH mit One-Strep-Tag

Die Elutionsfraktionen mit der über den One-Strep-Tag aufgereinigten mGDH wurden in einer SDS-PAGE überprüft. In dem mit Silber gefärbten Gel war eine einzelne, klare Bande sichtbar und das ermittelte Molekulargewicht von 91 kDa entsprach der vorhergesagten Größe des rekombinanten Proteins mit dem One-Strep-Tag (Abb. 28). Somit konnte die mGDH auch anhand des One-Strep-Tags aus *G. oxydans* Δ *hdsR* in reiner Form isoliert werden.

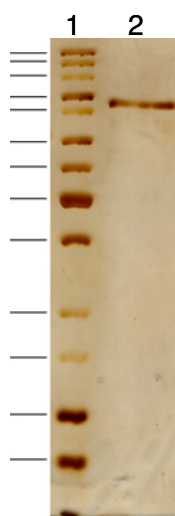


Abb. 28: SDS-PAGE der gereinigten mGDH mit dem One-Strep-Tag. Spur 1: PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, von oben: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 kDa); Spur 2: aufgereinigte mGDH (Gox0265-OneST).

3.3.5.9 Anreicherung der mGDH mit dem One-Strep-Tag

Zum Vergleich der Aufreinigung der mGDH mit dem einfachen und doppelten Strep-Tag, wurde auch für den One-Strep-Tag die Anreicherung des Proteins über die Aktivität der entstehenden Fraktionen mit Glukose verfolgt (Tabelle 10). Dabei zeigte sich, dass auch hier ein größerer Teil der Aktivität im Durchfluss verblieb. Bezüglich der Proteinausbeute konnte mit dem One-Strep-Tag jedoch eine Verbesserung erzielt werden. Durch die Verwendung des doppelten Strep-Tags wurde die Ausbeute von 3 auf 27 % gesteigert. Auffällig war, dass die spezifische Aktivität der mGDH mit dem One-Strep-Tag (706 U/mg) wesentlich höher war, als mit dem einfachen Strep-Tag (150 U/mg). Um auszuschließen, dass diese Abweichung lediglich in einer zu ungenauen Bestimmung des Proteingehalts in den Elutionsfraktionen begründet war, wurden Elutionsfraktionen aus beiden Aufreinigungen in einer SDS-PAGE und einem Western-Blot verglichen.

Tabelle 10: Aufreinigung der mGDH aus *G. oxydans* Δ hsdR mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-OneST über Strep-Tactin Affinitätschromatographie.

Fraktion	Volumen [mL]	Volumen-aktivität [U/mL]	Protein-gehalt [mg/mL]	Spezifische Aktivität [U/mg]	Gesamt-aktivität [U]	Ausbeute [%]
Membranfraktion	1	289	19,9	14,5	289	100
Durchfluss	10	13,4	3,6	3,7	134	46
Waschfraktionen	9	3,8	0,6	6,9	34,4	12
Elutionsfraktionen	3	26,2	0,04	706	78,6	27

3.3.5.10 Vergleichende SDS-PAGE und Western-Blot von Elutionsfraktionen aus der mGDH-Aufreinigung mit dem einfachen Strep-Tag und dem One-Strep-Tag

Es sollte sicher gestellt werden, dass die Proteinkonzentration in den Elutionsfraktionen aus der mGDH-Aufreinigung mit dem One-Strep-Tag tatsächlich nur etwa doppelt so hoch war wie in den Elutionsfraktionen aus der mGDH-Aufreinigung mit dem einfachen Strep-Tag. Mögliche Ungenauigkeiten bei der Proteinbestimmung konnten dadurch verursacht werden, dass der Proteingehalt der Elutionsfraktionen an der Nachweisgrenze des Proteinbestimmungskits (Bio-Rad DC Protein Assay Kit) lag. Daher wurden gleiche Volumina (10 μ L) der Elutionsfraktionen auf zwei SDS-Gele aufgetragen und anschließend die Intensität der Banden in einem mit Silber gefärbten Gel und auf einem Western-Blot verglichen (Abb. 29). In dem Programm Photoshop wurde dazu der Graustufenmodus gewählt, die Bilder invertiert, und dann die Bandenintensität nach Markierung der Bande jeweils im Histogramm (Mittelwert x Pixel) abgelesen. Sowohl in dem SDS-Gel als auch auf dem Western-Blot war die Intensität der Proteinbanden bei den Elutionsfraktionen aus der Aufreinigung der mGDH mit dem One-Strep-Tag entsprechend der Proteinkonzentrationsbestimmung etwa doppelt so hoch wie bei den Elutionsfraktionen aus der Aufreinigung der mGDH mit dem einfachen Strep-Tag. Somit konnte die erhöhte spezifische Aktivität der mGDH mit dem One-Strep-Tag nicht durch eine zu ungenaue Proteinbestimmung erklärt werden und musste folglich eine andere Ursache haben, wie z. B. einen Einfluss des One-Strep-Tags.

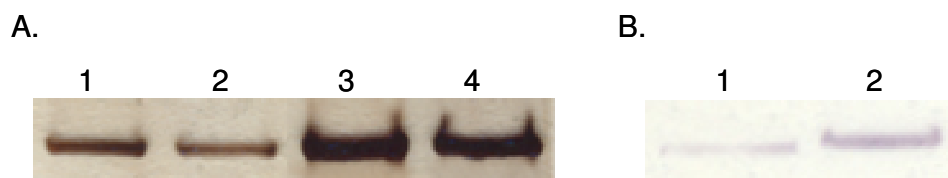


Abb. 29: Vergleichende SDS-PAGE und Western-Blot von Elutionsfraktionen aus der Aufreinigung der mGDH mit Strep-Tag und One-Strep-Tag. Es wurden jeweils gleiche Volumina (10 μ l) aufgetragen. (A) SDS-PAGE. Spur 1: Elutionsfraktion 4 aus der Aufreinigung der mGDH mit Strep-Tag; Spur 2: Elutionsfraktion 5 aus der Aufreinigung der mGDH mit Strep-Tag; Spur 3: Elutionsfraktion 4 aus der Aufreinigung der mGDH mit One-Strep-Tag; Spur 4: Elutionsfraktion 5 aus der Aufreinigung der mGDH mit One-Strep-Tag. (B) Western-Blot. Spur 1: Elutionsfraktion 4 aus der Aufreinigung der mGDH mit Strep-Tag; Spur 2: Elutionsfraktion 4 aus der Aufreinigung der mGDH mit One-Strep-Tag.

3.4 Die membrangebundene Dehydrogenase Gox1857 aus *G. oxydans*

Das durch das Gen *gox1857* kodierte Protein aus *G. oxydans* 621H wurde anhand von entsprechenden Deletionsmutanten bereits als PQQ-abhängige membrangebundene Inositol-Dehydrogenase beschrieben (Hölscher *et al.*, 2007). Gleichzeitig geben Patente Hinweise darauf, dass es sich bei Gox1857 um eine L-Sorboson-Dehydrogenase handeln könnte, die L-Sorboson in einem Schritt zu L-Ascorbinsäure umsetzt (Berry *et al.*, 2010, 2012; Beuzelin-Ollivier *et al.*, 2012). Ein Sequenzabgleich zeigte, dass die Sequenz des Proteins Gox1857 mit der in den Patenten angegebene Sequenz für ein Protein mit L-Sorboson-Dehydrogenase-Aktivität aus *G. oxydans* IFO 3244 (jeweils Sequenz Nummer 2 und 27) identisch ist. Um zu untersuchen, welche Substrate das Enzym Gox1857 tatsächlich umsetzt, wurde das Enzym in dieser Arbeit homolog als Strep-Tag-Fusionsprotein überproduziert und über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dazu wurde der Überexpressionsvektor pBBR1p452-ST verwendet.

3.4.1 Bioinformatische Analyse des Proteins Gox1857

Das Gen *gox1857* kodiert ein aus 788 Aminosäuren bestehendes Protein, das ein theoretisches Molekulargewicht von 85,4 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 6,09 besitzt. Mit dem Bioinformatikprogramm Phobius (<http://phobius.sbc.su.se>, 03.12.13) wurden für das Protein fünf N-terminale Transmembrandomänen und eine große periplasmatische Domäne

(Aminosäuren 140 – 788) vorhergesagt. Eine NCBI-Suche nach konservierten Domänen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, 09.12.13) (Marchler-Bauer & Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009, 2011) ergab, dass das Protein Gox1857 zu der Superfamilie der PQQ-abhängigen Dehydrogenasen, die einen acht-blättrigen β -Propeller beinhalten, und zu der Familie der membrangebundenen PQQ-abhängigen Glukose/Quinat/Shikimat-Dehydrogenasen gehört. Mitglieder dieser Familie besitzen mehrere vorhergesagte Transmembrandomänen in der N-terminalen Region und zu ihnen zählt z. B. die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase aus *Escherichia coli* (Cleton-Jansen *et al.*, 1990; Cozier & Anthony, 1995; Yamada *et al.*, 1993), sowie die Quinat/Shikimat-Dehydrogenase aus *Acinetobacter* sp. ADP1 (Barbe *et al.*, 2004). In der Sequenz des Proteins Gox1857 wurden Bindestellen für Calcium-Ionen und den Cofaktor PQQ (Keitel *et al.*, 2000), sowie acht Tryptophan-Docking-Motive mit der Konsensussequenz A-x-[DN]-x-x-T-G-[DEK]-x-x-W (Anthony & Ghosh, 1998) detektiert, die für die Interaktion zwischen den β -Faltblättern der Propellerflügel verantwortlich sind. Die Identifizierung der entsprechenden Aminosäuren erfolgte dabei jeweils über die in einem Sequenzvergleich mit anderen Mitgliedern der Proteinfamilie festgestellten Ähnlichkeiten. Zu beachten ist, dass nicht in jedem Tryptophan-Docking-Motiv alle Aminosäuren der Konsensussequenz konserviert waren. In Abb. 30 ist die Sequenz des Proteins Gox1857 mit den fünf Transmembrandomänen, den acht Tryptophan-Docking-Motiven sowie den Aminosäuren in dem aktiven Zentrum, die vermutlich an der Bindung von Calcium und PQQ beteiligt sind, dargestellt.

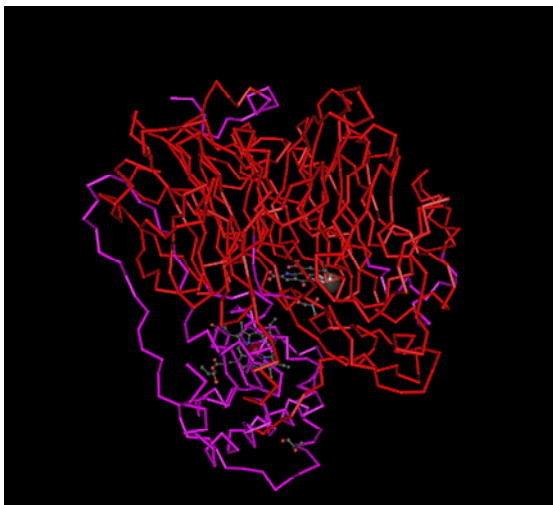
1	MNSGPR <u>TL</u> SMIIIGILGALMAAFLII <u>EG</u> LHLI <u>IL</u> GGSWFYTLAGIALAASSVY <u>MIR</u> RNI <u>LS</u>	60
61	<u>TW</u> IALG <u>LL</u> VATALW <u>SLA</u> EVGTS <u>FW</u> PSFSRLIVFLCVALIATLMAPW <u>L</u> SGPGRRYFTR <u>P</u> <u>VT</u>	120
121	<u>GAT</u> SGALGAIIVAF <u>LAG</u> MF <u>RV</u> HPTIAPQDTTHPQETASTADSDQPGHDWPAYGRTASGTR	180
181	YASFTQINRDNVGKLRVAWTYRTGDMALNGAEF <u>Q</u> GTPIKIGDTVYICSPHNIVSALDPDT	240
241	<u>GTE</u> KWKFDPHAQT <u>KV</u> WQRC <u>R</u> GVGYWHDSTATDANAPCASRIVLTTIDARLITIDARTGQA	300
301	<u>CT</u> DFGTNGNVNLLTGLGPTAPGSYYP <u>TA</u> APLVAGDIVVVGG <u>RI</u> ADNERTGEP SGVV <u>RG</u> YD	360
361	<u>VRT</u> GAQVWAWDATNPHRGTTPLAEGEIIYPAETPN <u>M</u> WGTASYDPKLNLVFFPLGNQTPDFW	420
421	GGDRSKASDEYNDAFVAVDAKTGDERWHFRTANHDLVDYDATAQPILYDIPDGHGGTRPA	480
481	IIAMT <u>K</u> RGQIFVLD <u>RR</u> DGTPIVPVEMRKVPQDGAPEHQYLAPEQPYSALSIGTERLKPSD	540
541	MWGGTIFDQLLCRIQFASYRYEGEFTPVNEKQATIIYPGYGGINWGGGAVDESTGTLLV	600
601	NDIRMAQWGKFMKQEEARRSGFKPSSEGEYSEQKGPWGVVRS M FFSPAGLPCVKPPYGT	660
661	MNAIDLRSKVKWSMPLGTIQDMPVHGMVPLAIPLMPT <u>M</u> SGPLATHTGLVFFSGTLDN	720
721	YVRALNTDTGEVVW <u>KAR</u> LPVASQAAPMSYMSDKTGKQYIVVTAGGLTRSGVDKNRGDYVI	780
781	<u>AY</u> ALPSEE	788

Abb. 30: Sequenz des Proteins Gox1857. Die fünf Transmembrandomänen sind umrandet, die acht Tryptophan-Docking-Motive unterstrichen und Aminosäuren im aktiven Zentrum, die vermutlich an der Bindung von Calcium-Ionen und PQQ beteiligt sind, sind in rot und fett dargestellt. Die Transmembrandomänen wurden mit dem Programm Phobius bestimmt, die Tryptophan-Docking-Motive, sowie die Aminosäuren im aktiven Zentrum wurden über eine NCBI-Suche nach konservierten Domänen durch Ähnlichkeit zu anderen Mitgliedern der Proteinfamilie festgelegt.

In einer BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 09.12.13) (Altschul *et al.*, 1997), bei der die Aminosäuresequenz des Enzyms Gox1857 mit nicht-redundanten Proteinsequenzen abgeglichen wurde, wurde eine hohe Homologie zu einer putativen Dehydrogenase aus *Gluconobacter morbifer* (WP_008850712; 88 % Identität, 99 % Sequenzabdeckung) gefunden. Weitere Homologien (56 – 59 % Identität, 96 – 99 % Sequenzabdeckung) wurden auch zu anderen putativen Dehydrogenasen, wie einer Quinat/Shikimat-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* (YP_008113194), einer membrangebundenen PQQ-abhängigen Dehydrogenase der Glukonat/Quinat/Shikimat-Familie aus *Gluconobacter frateurii* (WP_010504744), einer Glukose-Dehydrogenase aus *Gluconobacter frateurii* NBRC 103465 (GAD09986) und einer membrangebundenen PQQ-abhängigen Dehydrogenase der Glukonat/Quinat/Shikimat-Familie aus *Pantoea* sp.

At-9b (YP_004118995) festgestellt. Da die genannten Proteine jedoch nicht biochemisch charakterisiert sind, wurde auch eine BAST-Analyse unter Verwendung der UniProtKB/Swissprot-Datenbank durchgeführt. Dabei wurden geringere Homologien des Proteins Gox1857 zu einer Quinat/Shikimat-Dehydrogenase bzw. NAD(P)-unabhängigen Quinat-Dehydrogenase aus *Acinetobacter* sp. ADP1 (Q59086.1; 42 % Identität, 98 % Sequenzabdeckung), einer möglichen Quinat-Dehydrogenase aus *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (Q9XD78.1; 40 % Identität, 97 % Sequenzabdeckung), einer Chinoprotein Glukose-Dehydrogenase aus *Acinetobacter calcoaceticus* (P05465.1; 38 % Identität, 99 % Sequenzabdeckung) und der Chinoprotein Glukose-Dehydrogenase aus *Escherichia coli* K-12 (P15877.3; 38 % Identität, 99 % Sequenzabdeckung) ermittelt. Eine relativ geringe Ähnlichkeit zu einem Protein mit bekannter Struktur hatte Gox1857 zu der Kette A der Methanol-Dehydrogenase aus *Paracoccus denitrificans* (1LRW_A; 25 % Identität, 75 % Sequenzabdeckung) (Xia *et al.*, 2003) und der Kette A der Chinohämoprotein Alkohol-Dehydrogenase ADH-IIG aus *Pseudomonas putida* HK5 (1YIQ_A; 26 % Identität, 76 % Sequenzabdeckung) (Chen *et al.*, 2002; Toyama *et al.*, 2005). Eine Modellierung von Gox1857 anhand der Quartärstruktur des letzteren Proteins, angefertigt mit dem Programm Cn3D, ist in Abb. 31 A gezeigt. Ein Modell der Kette A der Alkohol-Dehydrogenase ADH-IIG aus *Pseudomonas putida* HK5 mit β -Faltblattstrukturen und α -Helices ist in Abb. 31 B dargestellt.

A.



B.

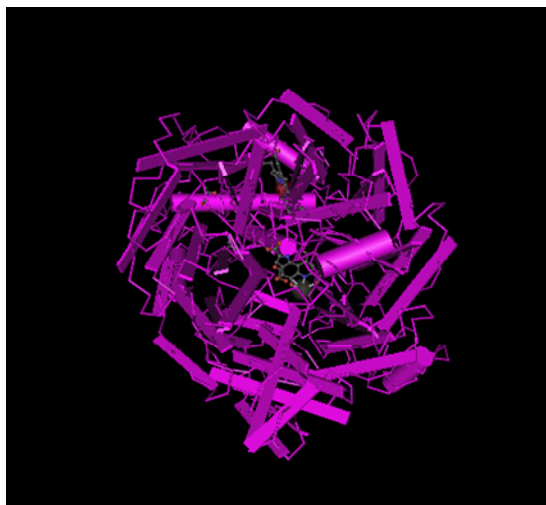


Abb. 31: Modellierung des Proteins Gox1857 anhand der Quartärstruktur der Kette A der Chinohämoprotein Alkohol-Dehydrogenase ADH-IIG aus *Pseudomonas putida* HK5 (Chen *et al.*, 2002; Toyama *et al.*, 2005) und ein Modell der Kette A der Alkohol-Dehydrogenase mit β -Faltblattstrukturen und α -Helices, jeweils erstellt mit dem Programm Cn3D. (A) Modellierung von Gox1857. Rote Strukturen zeigen eine Übereinstimmung zwischen den Proteinsequenzen an, lilafarbene Strukturen zeigen Abweichungen an. Im Zentrum des β -Propellers ist ein PQQ-Molekül, sowie ein Ca^{2+} -Ion lokalisiert. Gox1857 besitzt im Gegensatz zu der Alkohol-Dehydrogenase aus *Pseudomonas putida* kein Häm *c* als Cofaktor. (B) Darstellung der Kette A der Alkohol-Dehydrogenase ADH-IIG mit β -Faltblattstrukturen (Pfeile) und α -Helices (Röhren). Ansicht von oben auf den β -Propeller.

3.4.2 Klonierung des Gens *gox1857*

Das Gen *gox1857* wurde aus genomischer DNA von *G. oxydans* 621H anhand der Primer *gox1857EcoRI-f* und *gox1857SnaBI-r* amplifiziert. Das Amplikon von 2423 bp (Abb. 32 A) beinhaltet dabei auch die stromaufwärts gelegene Ribosomenbindestelle des Gens. Über die durch die Primer angefügten *EcoRI*- und *SnaBI*-Restriktionsschnittstellen konnte das DNA-Fragment anschließend in den Überexpressionsvektor pBBR1p452-ST eingebracht werden, so dass das Plasmid pBBR1p452-*gox1857*-ST entstand (Abb. 33). *E. coli*-Kolonien, die ein Plasmid mit dem gewünschten Gen enthielten, wurden anhand einer PCR mit den Primern pBBR1-f und pASK-r identifiziert. Die Größe des korrekten PCR-Produkts betrug 2968 bp (Abb. 32 B). Die Gensequenz in dem isolierten Plasmid wurde durch Sequenzierung mit den Primern pBBR1-f und pASK-r geprüft. Der Vektor pBBR1p452-*gox1857*-ST wurde durch Elektroporation in *G. oxydans* Δ *hsdR* eingebracht.

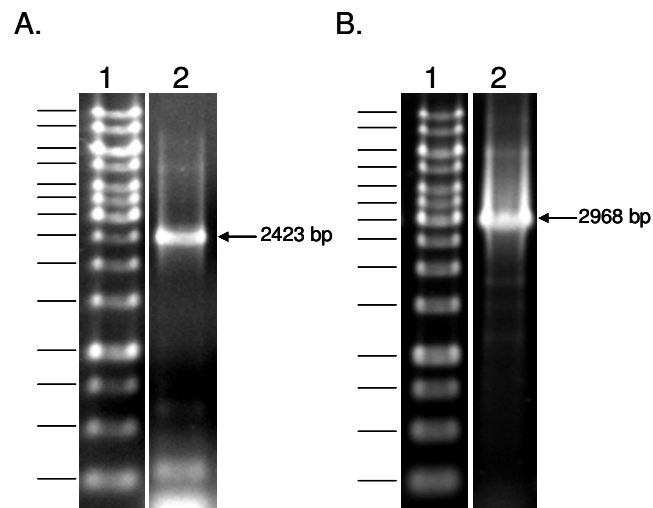


Abb. 32: Klonierung des Gens *gox1857*. (A) Produkt aus der PCR zur Amplifizierung des Gens *gox1857*. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, von oben: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250 bp); Spur 2: PCR-Produkt. (B) Produkt der PCR zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien, die den Vektor pBBR1p452-*gox1857*-ST trugen. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); Spur 2: Produkt aus der Kolonie-PCR.

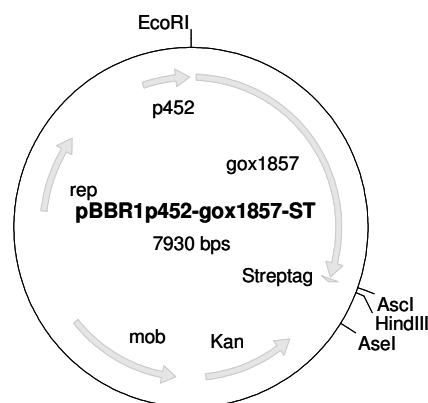


Abb. 33: Karte des Vektors pBBR1p452-*gox1857*-ST. Mit rep: Replikationsursprung; p452: Promotorregion des Gens *gox0452*; *gox1857*: Gen *gox1857*; Streptag: Sequenz für den Strep-Tag II; Kan: Kanamycinresistenzkassette, mob: Mobilisierungsgen.

3.4.3 Aktivität der Membranfraktionen von *G. oxydans* mit *myo*-Inositol und L-Sorbose

Zunächst wurden Aktivitätstests mit den Membranfraktionen des Überexpressionsstamms *G. oxydans* Δ *hsdR* mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox1857*-ST und des Kontrollstamms

G. oxydans Δ hdsR mit dem Plasmid pBBR1p452 gemacht. Hierbei wurden die Substrate *myo*-Inositol und L-Sorboson eingesetzt, da vermutet wurde, dass es sich bei dem Enzym Gox1857 um eine *myo*-Inositol Dehydrogenase oder um eine L-Sorboson-Dehydrogenase handelt. Die Membranfraktionen wurden aus 400 mL der entsprechenden Kulturen präpariert und anschließend die Aktivität unter Verwendung der Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP bzw. Ferricyanid gemessen. Außerdem wurde die Sauerstoffverbrauchsrate mit den Zuckerderivaten anhand einer Sauerstoffelektrode bestimmt. Wenn das Substrat *myo*-Inositol eingesetzt wurde, ergab die Aktivitätsmessung mit PMS und DCPIP in 167 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 8,75 für die Membranfraktion des Überexpressionsstamms eine nur leicht erhöhte Aktivität ($0,528 \pm 0,090$ U/mg) im Vergleich zu dem Kontrollstamm ($0,415 \pm 0,055$ U/mg). Mit dem Elektronenakzeptor Ferricyanid war die spezifische Aktivität niedriger im Vergleich zu PMS und DCPIP (ca. - 50 %). Messungen in 40 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 6 und 7 zeigten, dass die Aktivität mit sinkendem pH-Wert abnahm. Deshalb wurden alle folgenden Messungen bei pH 8,75 durchgeführt. Mit dem Substrat L-Sorboson musste, aufgrund einer starken Reaktivität des Substrats mit DCPIP, Ferricyanid als Elektronenakzeptor eingesetzt werden. Mit L-Sorboson war jedoch keine Aktivität der Membranfraktionen messbar. Die Reaktion von L-Sorboson ohne das Enzym stellte bei den Messungen ein Problem dar. Deshalb mussten die enzymatischen Reaktionen nach Aufnahme einer Basisabnahme der Absorption durch die Zugabe der Membranfraktionen gestartet werden. Mögliche relativ geringe Aktivitäten der Membranfraktionen mit L-Sorboson könnten so jedoch überdeckt worden sein. Die Messungen an der Sauerstoffelektrode spiegelten die Ergebnisse mit den artifiziellen Elektronenakzeptoren wieder. Die Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktion des Überexpressionsstamms mit *myo*-Inositol ($225 \text{ nmol } \frac{1}{2}\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) war nur leicht erhöht im Vergleich zu dem Kontrollstamm ($191 \text{ nmol } \frac{1}{2}\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Auch hier konnte kein Sauerstoffverbrauch mit dem Substrat L-Sorboson gemessen werden, der über den Basisverbrauch von L-Sorboson ohne die Zugabe der Membranfraktionen hinausging. Aufgrund der relativ niedrigen Aktivitäten der Membranfraktionen mit *myo*-Inositol wäre es von Vorteil, wenn das Protein Gox1857 in gereinigter Form vorliegen würde. So könnte geklärt werden, ob dieses Enzym für die mit den Membranfraktionen gemessene Oxidation von *myo*-Inositol verantwortlich ist und/oder ob das Enzym Gox1857 ein anderes Substrat als *myo*-Inositol bevorzugt. Mit dem isolierten Protein könnte auch eine eventuelle Aktivität mit L-Sorboson besser gemessen werden.

3.4.4 Überproduktion und Aufreinigung des Proteins Gox1857

Wie für die Aufreinigung der membrangebundenen Glukose-Deydrogenase wurden 400 mL Kulturen des Überexpressionsstamms, in diesem Fall *G. oxydans* Δ *hsdR* mit dem Plasmid pBBR1p452-*gox1857*-ST, bei einer $OD_{600\text{nm}}$ von 0,8 – 1,2 geerntet und die Membranfraktionen präpariert. Zur Solubilisierung der Membranen wurden jeweils 1 % der nicht-ionischen Detergenzien Triton X-100, n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM), n-Octyl- β -D-Glukopyranosid (OG) und Brij-35 getestet. Die in der darauf folgenden Strep-Tactin-Affinitätschromatographie verwendeten Puffer enthielten 0,1 % der entsprechenden Detergenzien. Der Proteingehalt in den Elutionsfraktionen wurde mit dem Detergenzkompatiblen Bio-Rad DC Protein Assay Kit bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nur bei der Verwendung der Detergenzien Triton X-100 und DDM Protein erhalten wurde. Die Gesamtausbeute an Protein war mit 20 – 45 μ g aus 400 mL Kultur jedoch sehr gering. Durch eine Steigerung des eingesetzten Kulturvolumens auf 2,5 L konnte die Proteinausbeute auf 180 μ g erhöht werden. Das gereinigte Protein wurde in einer SDS-PAGE und einem Western-Blot überprüft und die Aktivität mit verschiedenen Substraten getestet.

3.4.4.1 SDS-PAGE und Western-Blot des Proteins Gox1857

Das durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigte Protein Gox1857 wurde in einer SDS-PAGE und einem Western-Blot analysiert. In dem mit Silber gefärbten Gel der SDS-PAGE (Abb. 34 A) war eine einzelne, klare Bande sichtbar, für die anhand des Größenstandards ein Molekulargewicht von 87 kDa ermittelt wurde. Dies entsprach der vorhergesagten Größe des rekombinanten Proteins mit dem Strep-Tag. Auch auf dem Western-Blot konnte eine einzelne Bande bei der entsprechenden Größe detektiert werden (Abb. 34 B). Folglich lag das Protein Gox1857 in ausreichend gereinigter Form vor.

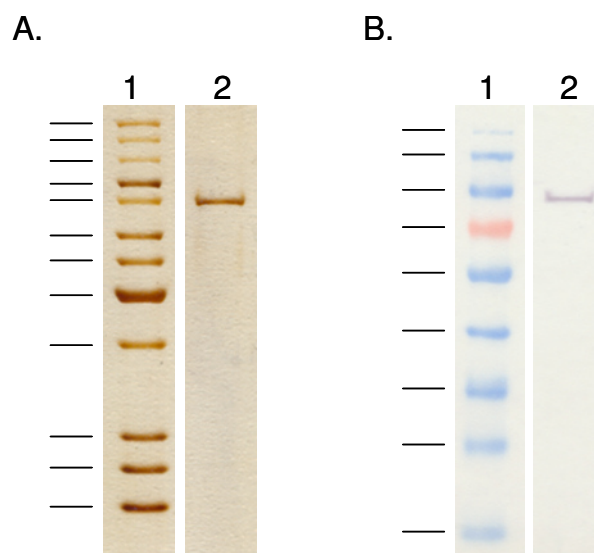


Abb. 34: SDS-PAGE und Western-Blot des Proteins Gox1857. Das Protein in den gezeigten Elutionsfraktionen wurde unter Verwendung des Detergenz DDM aufgereinigt. (A) SDS-PAGE. Spur 1: PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, von oben: 200, 150, 120, 100, 85, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20 kDa); Spur 2: gereinigtes Protein Gox1857. (B) Western-Blot. Spur 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, von oben: 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17 kDa); Spur 2: gereinigtes Proteins Gox1857.

3.4.4.2 Substratspektrum des Enzyms Gox1857

Die Aktivität des gereinigten Enzyms Gox1857 wurde zunächst mit den Substraten *myo*-Inositol und L-Sorboson getestet. Dabei wurden die Tests mit 20 – 40 mM *myo*-Inositol in 167 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,75 (Hölscher *et al.*, 2007) unter Verwendung der artifiziellen Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP durchgeführt. Für die Tests mit 20 - 40 mM L-Sorboson in 167 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,75 bzw. 40 mM KP-Puffer pH 6 oder 7 wurde der Elektronenakzeptor Ferricyanid verwendet. Aufgrund der zu beobachtenden Reaktion des Substrats ohne Enzym, wurde das Enzym grundsätzlich als letztes in den Reaktionsansatz gegeben und zuvor eine Basisabnahme der Absorption gemessen. Da für Gox1857 mit *myo*-Inositol eher geringe spezifische Aktivitäten (0,5 - 5 U/mg) und mit L-Sorboson keine Aktivität unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen gemessen werden konnte, wurden diverse weitere Substrate getestet. Die Aktivität mit den Zuckern, Zuckeralkoholen und zyklischen Diolen wurde mit den Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP in 167 mM Tris-HCl pH 8,75 oder 40 mM KP-Puffer pH 7 überprüft. Dabei konnte mit den Substraten Ribitol, Sorbitol, Mannitol, Xylitol, Glyoxal, Methylglyoxal, 1,4-Cyclohexandiol, 1,2-Cyclohexandiol, *cis*-1,2-Cyclopentandiol, *trans*-1,2-Cyclopentandiol, *cis/trans*-1,3-Cyclopentandiol, L-Sorbose, D-Glukose, Fruktose und

2-L-epi-2-Inosose keine Aktivität des Enzyms Gox1857 gemessen werden, die höher war als mit *myo*-Inositol.

3.4.4.3 Rekonstitution des Enzyms Gox1857 mit PQQ

Bei Gox1857 handelt es sich um eine PQQ abhängige Dehydrogenase. Um zu überprüfen, ob das gereinigte Enzym aufgrund des Verlustes der prosthetischen Gruppe während des Aufreinigungsprozesses nur wenig aktiv war, wurde in einem Rekonstitutionsansatz PQQ zugegeben. Dazu wurden 0,4 - 1,2 µg Protein in 1 mL Tris-HCl-Puffer pH 8,75 mit 16,5 µM PQQ und 20 mM CaCl₂ oder MgSO₄ für 10 Minuten auf Eis oder bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein Aktivitätstest mit 40 mM *myo*-Inositol unter Verwendung von PMS und DCPIP durchgeführt. Die Inkubation mit PQQ und CaCl₂ führte dabei zu keiner Steigerung der Aktivität und nach einer Inkubation mit PQQ und MgSO₄ war gar keine Aktivität mehr messbar. Da PQQ häufig so fest mit dem Enzym assoziiert ist, dass es während der Aufreinigung gebunden bleibt (siehe z. B. membrangebundene Glukose-Dehydrogenase), war davon auszugehen, dass auch Gox1857 zusammen mit der prosthetischen Gruppe aufgereinigt wurde.

3.4.4.4 Auswirkungen von Detergenz auf die Oxidation von *myo*-Inositol

Bevor die membrangebundene Dehydrogenase Gox1857 über Step-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnte, mussten die Membranfraktionen mit Detergenz solubilisiert werden. Um zu überprüfen, ob dies Auswirkungen auf die Aktivität der Enzyme hatte, wurde die Aktivität von mit DDM behandelten Membranfraktionen im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Detergenz gemessen. Die Messungen wurden mit dem Substrat *myo*-Inositol und den Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP bei einem pH-Wert von 8,75 durchgeführt. Dabei war festzustellen, dass die Aktivität der Membranfraktionen, die in 1 % DDM inkubiert wurden, nach 1,5 Stunden im Vergleich zu der Aktivität der Kontrollmembranfraktionen um 95 % gesunken war (0,04 U/mg vs. 0,69 U/mg). Ähnlich führte auch die Inkubation der Membranfraktionen mit dem Detergenz Triton X-100 zu einer fast sofortigen Abnahme der Aktivität. Dies zeigte, dass das Enzym in den Membranfraktionen, das für die Oxidation von *myo*-Inositol verantwortlich war, durch die Detergenzien offensichtlich destabilisiert wurde. Eine Destabilisierung könnte dementsprechend auch die recht geringen Aktivitäten des gereinigten Proteins Gox1857 erklären. Ein erster Versuch, die Membranproteine während der Solubilisierung durch die

Zugabe von Lipiden in der Form von 1 - 2 % Asolectin zu stabilisieren, zeigte jedoch keinen Erfolg.

3.4.4.5 Zugabe des Extrakts von polaren Lipiden aus *E. coli* zu dem gereinigten Protein Gox1857

Da die Solubilisierung der Membranfraktionen mit Detergenz zu einer starken Verminderung der Aktivität mit dem Substrat *myo*-Inositol führte, wurde getestet, ob die Aktivität des gereinigten Proteins Gox1857 durch die Zugabe von Lipiden gesteigert werden konnte. Dazu wurde der Extrakt von polaren Lipiden aus *E. coli* wie unter „Material und Methoden“ beschrieben vorbereitet und anschließend 125 µg Lipide zu 0,32 µg Enzym gegeben. Die Aktivität mit *myo*-Inositol und L-Sorboson wurde unter Verwendung von Ferricyanid als Elektronenakzeptor in 167 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 8,75 geprüft. Mit beiden Substraten war jedoch keine gesteigerte Aktivität messbar. Dementsprechend besaß das Enzym entweder generell eine eher geringere Aktivität mit *myo*-Inositol und keine Aktivität mit L-Sorboson, oder aber es benötigt für eine Steigerung der Aktivität andere Lipide bzw. eine andere Konzentration der Lipide. Möglich ist auch, dass Gox1857 in vollständige Liposomen integriert werden müsste, damit eine höhere Aktivität des Enzyms erreicht wird.

3.5 Analyse der putativen L-Sorboson-Dehydrogenase Gdi_3764 aus *Ga. diazotrophicus*

Das in dieser Arbeit weiterentwickelte System für die homologe Produktion und Aufreinigung von Membranproteinen wurde erfolgreich für Dehydrogenasen aus *G. oxydans* (mGDH, Gox1857) eingesetzt. Die entsprechenden Gene wurden als Strep-Tag-Fusionsproteine unter dem moderaten Promotor p452 exprimiert und die Proteine konnten nach der Solubilisierung aus der Membran über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Nun sollte das System auf andere Essigsäurebakterien übertragen werden. Hierzu wurde eine putative L-Sorboson-Dehydrogenase aus *Ga. diazotrophicus* ausgewählt. Bezüglich der die L-Sorboson-Dehydrogenase kodierenden Gensequenz bestanden zwei mögliche Varianten, da das Genom von *Ga. diazotrophicus* PA1 5 durch zwei unabhängige Gruppen sequenziert wurde. Von Bertalan *et al.* (2009) aus dem Instituto de Bioquímica Médica in Brasilien wurde eine 468 Aminosäuren umfassende L-Sorboson-

Dehydrogenase vorhergesagt, die durch das Gen *gdi_3764* kodiert wird (NCBI: YP_001603987.1). Bei Lucas *et al.* (2008) aus dem US DOE Joint Genome Institute beginnt das entsprechende Gen *gdia_2640* an einem alternativen Startcodon, wodurch das kodierte Protein um 17 Aminosäuren kürzer ist (NCBI: YP_002276996.1). Um sicher zu gehen, dass das vollständige Protein produziert wird, wurde in dieser Arbeit auf die längere Gensequenz zurückgegriffen und das kodierte Protein im Folgenden als Gdi_3764 bezeichnet. Es war davon auszugehen, dass die Verwendung der verlängerten Sequenz keine Probleme verursacht, da das Gen homolog in *Ga. diazotrophicus* überexprimiert werden sollte und das korrekte Startcodon somit in dem Expressionsstamm erkannt werden müsste. Das Gen *gdi_3764* wurde für die homologe Expression in *Ga. diazotrophicus* zum einen in den Vektor pBBR1p452-ST eingebracht, der die Sequenz für einen einfachen Strep-Tag II enthielt, und zum anderen wurde der doppelte Strep-Tag (One-Strep-Tag) eingesetzt.

3.5.1 Bioinformatische Analyse des Proteins Gdi_3764

Mit beiden Varianten der Proteinsequenz für die L-Sorboson-Dehydrogenase, Gdi_3764 und Gdia_2640, wurde eine Suche in der nicht-redundanten BLAST-Datenbank von NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 10.12.12) (Altschul *et al.*, 1997) durchgeführt. Dabei wurde eine große Homologie zu der membrangebundenen L-Sorboson-Dehydrogenase aus *Gluconacetobacter liquefaciens* festgestellt (Q44091; 79 % Identität und 94 bzw. 98 % Sequenzabdeckung) (Shinjoh *et al.*, 1995). Die Homologie von Gdi_3764 zu diesem Protein trat dabei erst ab Aminosäure 18 auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die kürzere, durch das Gen *gdia_2640* kodierte Variante der putativen L-Sorboson-Dehydrogenase vermutlich die korrekte Variante ist. Durch die BLAST-Analyse wurden auch Homologien (70 - 76 % Identität, 91 - 93 % Sequenzabdeckung bzw. 70 - 77 % Identität, 94 - 97 % Sequenzabdeckung) zu weiteren, putativen L-Sorboson Dehydrogenasen aus *Gluconacetobacter oboediens* (WP_010515891), *Gluconacetobacter europaeus* (WP_019091946.1), *Acetobacter pasteurianus* 386B (YP_008391304.1), *Acetobacter pomorum* (WP_006117236) und *Acetobacter pasteurianus* (WP_019087754) gefunden.

Mithilfe des TMHMM Servers (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>, 10.12.13) wurden für das Protein Gdi_3764/Gdia_2640 eine N-terminale Transmembranhelix (Aminosäuren 23 - 45/7 - 29) und eine große, periplasmatische Domäne vorhergesagt. Mit dem Bioinformatikprogramm Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>, 10.12.13) wurde dagegen keine Transmembranhelix, sondern ein Signalpeptid (Aminosäuren 1 - 55/1 - 38) postuliert.

Das Vorhandensein eines Signalpeptids konnte über den SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, 10.12.13) (Petersen *et al.*, 2011) nicht bestätigt werden. Mit Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, 10.12.13) (Buchan *et al.*, 2013; Jones, 1999) wurden für Gdi_3764/Gdia_2640 zwei α -Helices (Aminosäuren 21 - 39 und 131 - 140 bzw. Aminosäuren 6 - 22 und 114 - 124), sowie einige β -Faltblatt-Stränge vorhergesagt. InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>, 10.12.13) (Hunter *et al.*, 2012) zeigte für das Protein die Signatur für einen sechs-blättrigen TolB-ähnlichen β -Propeller (Abergel *et al.*, 1999) und die Domäne für eine lösliche Glukose/Sorboson-Dehydrogenase an. Aufgrund der divergierenden Ergebnisse, die die verschiedenen bioinformatischen Analysen für das Protein Gdi_3764/Gdia_2640 ergaben, musste in dieser Arbeit experimentell überprüft werden, ob das Protein membrangebunden ist und eine große Domäne mit dem aktiven Zentrum im Periplasma besitzt oder ob es sich um ein lösliches, periplasmatisches Protein handelt.

3.5.2 Klonierung des Gens *gdi_3764* aus *Ga. diazotrophicus*

Das Gen *gdi_3764* wurde zusammen mit 33 bp der stromaufwärts gelegenen Region anhand der Primer *gdi3764_MfeI* und *gdi3764_SnaBI* mit genomischer DNA von *Ga. diazotrophicus* als Matrize in einer PCR amplifiziert. Über die angefügten Restriktionsschnittstellen für *MfeI* und *SnaBI* wurde das Amplikon von 1475 bp (Abb. 35 A) anschließend in den mit *EcoRI* und *SnaBI* behandelten Überexpressionsvektor pBBR1p452-ST eingebracht. Dabei war zu beachten, dass *MfeI* zu *EcoRI* kompatible kohäsive Enden produziert. Diese Alternative wurde aufgrund einer *EcoRI*-Schnittstelle in dem Gen gewählt. Durch die Ligation entstand das Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-ST (Abb. 36 A). Parallel dazu wurde auch der Vektor pBBR1p452-*gox0265*-OneST (siehe Abschnitt 3.3.2) mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *SnaBI* verdaut, anschließend mit alkalischer Phosphatase behandelt um eine Re-Ligation mit dem Ausgangsfragment zu verhindern und mit dem *gdi_3764*-Fragment ligiert. So wurde der Vektor pBBR1p452-*gdi3764*-OneST erhalten (Abb. 36 B), über den das Gen als Fusionsprotein mit doppeltem Strep-Tag exprimiert werden konnte. Zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien, die einen Vektor mit dem gewünschten Gen enthielten, wurde jeweils eine PCR mit den Primern pBBR1-f und pASK-r durchgeführt. Die Größe der erwarteten PCR Produkte betrug 2002 bp für den Vektor pBBR1p452-*gdi3764*-ST und 2071 bp für den Vektor pBBR1p452-*gdi3764*-OneST. (Abb. 35 B und C). Die Gensequenz in den hergestellten Vektoren wurde jeweils durch Sequenzierung mit den gleichen Primern überprüft. Die Überexpressionsvektoren wurden durch Elektroporation in *Ga. diazotrophicus* eingebracht.

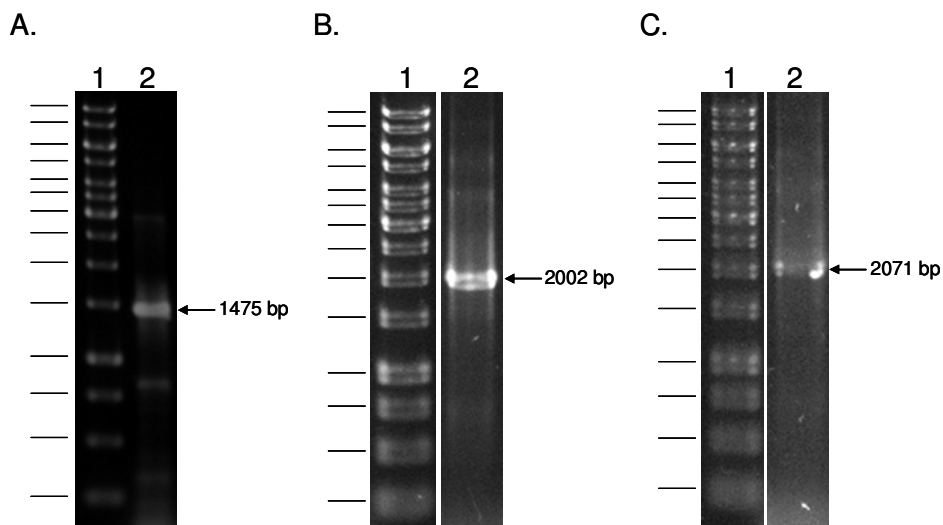


Abb. 35: Klonierung des Gens *gdi_3764*. (A) Produkt aus der PCR zur Amplifizierung des Gens *gdi_3764*. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, von oben: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500, 250 bp); Spur 2: PCR-Produkt. (B) Produkt der PCR zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien mit Vektor pBBR1p452-*gdi3764*-ST. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); Spur 2: Produkt der Kolonie-PCR. (C) Produkt der PCR zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien mit Vektor pBBR1p452-*gdi3764*-OneST. Spur 1: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); Spur 2: Produkt der Kolonie-PCR.

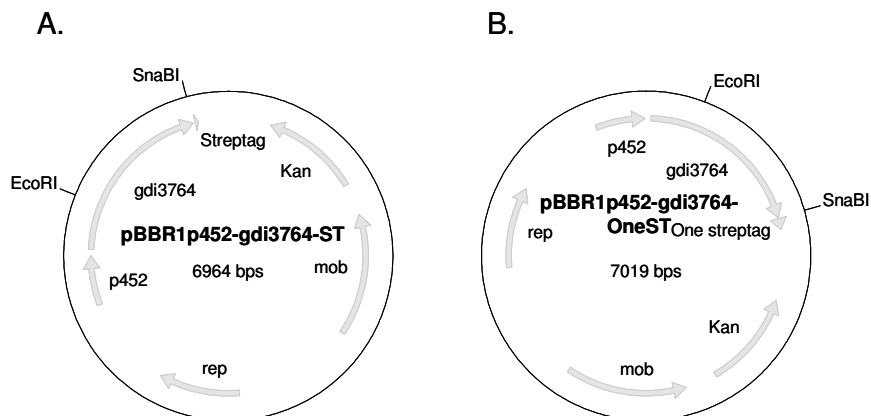


Abb. 36: Karten der Vektoren, die für die homologe Expression des Gens *gdi_3764* aus *Ga. diazotrophicus* verwendet wurden. (A) pBBR1p452-*gdi3764*-ST; (B) pBBR1p452-*gdi3764*-OneST. Mit rep: Replikationsursprung; Kan: Kanamycinresistenzkassette, mob: Mobilisierungsgen; Streptag: Sequenz für den Strep-Tag II; One Streptag: Sequenz für den One-Strep-Tag; p452: Promotorregion des Gens *gox0452*; *gdi3764*: Gen *gdi_3764*.

3.5.3 Transkriptabundanz des Gens *gdi_3764* in *Ga. diazotrophicus*

Die Expression des Gens *gdi_3764* in *Ga. diazotrophicus* mit dem Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-ST und dem Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-OneST im Vergleich zu der Expression im Wildtyp wurde durch RT-qPCR geprüft. Die Gesamt-RNA aus den entsprechenden Stämmen wurde isoliert und anschließend in der RT-qPCR jeweils der Quantifikationszyklus (Cp) des konstitutiv exprimierten Gens *gdia_2968*, das das ribosomale Protein L23 kodiert, als Referenz für die Bestimmung der *gdi_3764*-Expressionsrate verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Transkriptabundanz des Gens *gdi_3764* in den beiden Stämmen mit den Überexpressionsvektoren 91- bis 97-fach höher war als die Transkriptabundanz des Referenzgens *gdia_2968* (siehe Tabelle 11). In dem Wildtyp-Stamm war dagegen die Expressionsrate des Referenzgens höher als die des Gens *gdi_3764*. Die relative Transkriptabundanz des Gens *gdi_3764* bezogen auf das Referenzgen *gdia_2968* war in *Ga. diazotrophicus* mit dem Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-ST und dem Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-OneST im Vergleich zu dem Wildtyp entsprechend 8230- bis 8820-fach erhöht. Somit war davon auszugehen, dass das Gen basierend auf den Überexpressionsvektoren in *Ga. diazotrophicus* ausreichend exprimiert wurde, um eine Aufreinigung des Strep-Tag-Fusionsproteins aus diesem Organismus zu ermöglichen.

Tabelle 11: Analyse der Transkriptabundanz des Gens *gdi_3764* in *Ga. diazotrophicus*.

Stamm	Cp (<i>gdia_2968</i>)	Cp (<i>gdi_3764</i>)	Δ Cp (<i>gdi_3764</i> - <i>gdia_2968</i>)	$2^{-\Delta$ Cp (Verhältnis <i>gdi_3764</i> / <i>gdia_2968</i>)
<i>Ga. diazotrophicus</i> pBBR1p452- <i>gdi3764</i> -ST	17,9 ± 0,3	11,3 ± 0,2	- 6,6	97
<i>Ga. diazotrophicus</i> pBBR1p452- <i>gdi3764</i> -OneST	17,8 ± 0,05	11,3 ± 0,1	- 6,5	90,5
<i>Ga. diazotrophicus</i> Wildtyp	18 ± 0,02	24,5 ± 0,01	6,5	0,011

3.5.4 Überproduktion und Aufreinigung des Proteins Gdi_3764

Um zu überprüfen, ob das Protein Gdi_3764, wie aufgrund der Transkriptionsstudien anzunehmen war, in *Ga. diazotrophicus* mit dem Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-ST überproduziert wurde, wurde zunächst das Zelllysate in einem Western-Blot analysiert. Der Überexpressionsstamm wurde dazu in 500 mL YM-Medium bis zu einer OD_{600 nm} von 1,1 angezogen, die Zellen geerntet und durch Ultraschall lysiert. Da außerdem festgestellt werden

sollte, ob das Protein wie vorhergesagt an die Membran gebunden war, oder in löslicher Form vorlag, wurde die Membranfraktion von den löslichen Zellbestandteilen durch Ultrazentrifugation getrennt und die so entstandenen Fraktionen ebenfalls in einem Western-Blot analysiert. Anhand des Strep-Tactin-Meerrettichperoxidase-Konjugats wurde für das Lysat auf dem Western-Blot eine schwache Bande bei einer Größe von etwa 50 kDa detektiert (Abb. 37). Für das Zelllysat des *Ga. diazotrophicus* Wildtyps war diese Bande nicht sichtbar (Abbildung nicht gezeigt). Für die Membranfraktion war die entsprechende Bande wesentlich stärker ausgeprägt, während die Bande für den Überstand mit den löslichen Zellbestandteilen kaum sichtbar war. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass das Protein erstens überproduziert wurde und zweitens mit der Membran assoziiert war.

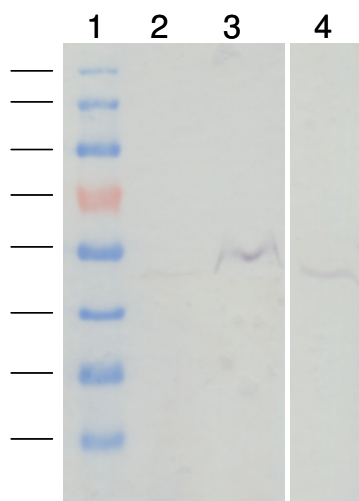


Abb. 37: Western-Blot der Zellfraktionen von *Ga. diazotrophicus* mit dem Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-ST. Spur 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, von oben: 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26 kDa); Spur 2: Überstand nach Ultrazentrifugation (lösliche Fraktion); Spur 3: Membranfraktion; Spur 4: Zelllysat.

3.5.4.1 Aufreinigung des Proteins Gdi_3764

Für die Aufreinigung des Proteins Gdi_3764 über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie wurde der Überexpressionsstamm *Ga. diazotrophicus* mit dem Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-OneST gewählt, da zuvor gezeigt wurde, dass die Proteinausbeute bei Verwendung des doppelten Strep-Tags im Vergleich zu dem einfachen Strep-Tag höher ist (siehe Aufreinigung der membrangebundenen Glukose-Dehydrogenase, Abschnitt 3.3.5.9). Aus einer 500 mL Kultur des *Ga. diazotrophicus* *gdi_3764*-Überexpressionsstamms wurde, wie für die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase und Gox1857 aus *G. oxydans* beschrieben, die Membranfraktion präpariert und anschließend mit dem Detergenz Triton X-100 solubilisiert.

Nach der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie wurde die Proteinkonzentration in den Elutionsfraktionen mit dem Detergenz-kompatiblen Bio-Rad DC Protein Assay Kit bestimmt. Die so ermittelte Gesamtausbeute an Protein lag bei 90 µg/mL.

3.5.4.2 SDS-PAGE und Western-Blot des Proteins Gdi_3764

Das gereinigte Protein Gdi_3764 wurde in einer SDS-PAGE und einem Western-Blot analysiert. Dabei konnte das Protein in den aufgetragenen Elutionsfraktionen zunächst weder in dem mit Silber gefärbten Gel der SDS-PAGE noch auf dem Western-Blot detektiert werden (Abbildungen nicht gezeigt). Erst nachdem die Elutionsfraktionen vereinigt und das Protein durch Zentrifugation über eine Säule (Vivaspin 500 von Sartorius; Zentrifugation bei 4 °C und 12000 Upm) eingeeengt wurde, konnte es auf einem Western-Blot bei der zu erwartenden Größe von ca. 50 kDa detektiert werden (Abb. 38). Aufgrund des geringen Unterschieds in dem theoretischen Molekulargewicht der beiden möglichen Varianten des Strep-Tag-Fusionsproteins (51,6 kDa für Gdi_3764-ST und 49,87 kDa für Gdia_2640-ST) konnte anhand des Western-Blots nicht unterschieden werden, welche Proteinvariante vorlag und bei welchem Startcodon in der DNA-Sequenz das Gen dementsprechend beginnt. Der Western-Blot zeigte jedoch, dass das Protein unter Verwendung des One-Strep-Tags in geringen Mengen aus *Ga. diazotrophicus* aufgereinigt werden konnte.

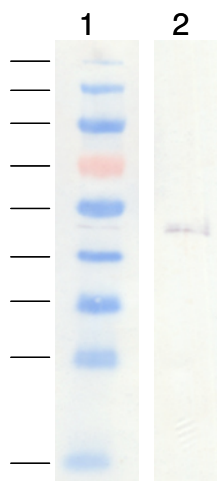


Abb. 38: Western-Blot des gereinigten Proteins Gdi_3764 mit dem One-Strep-Tag. Spur 1: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, von oben: 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17 kDa); Spur 2: gereinigtes Protein Gdi_3764.

3.5.4.3 Aktivitätstest des gereinigten Proteins Gdi_3764 mit L-Sorboson

Die Aktivität des gereinigten Proteins Gdi_3764 mit L-Sorboson wurde unter Verwendung des Elektronenakzeptors Ferricyanid getestet. Die Ansätze enthielten jeweils 20 µl des Enzyms vor oder nach der Einengung, 10 mM L-Sorboson und 1 mM Ferricyanid in 1 mL 40 mM KP-Puffer pH 6 oder 7 bzw. 100 mM Tris-HCl-Puffer pH 7. Dabei konnte jedoch keine Oxidation des Substrats durch das Enzym festgestellt werden. Wie schon zuvor beschrieben, stellte auch hier die Reaktion von L-Sorboson ohne Enzym ein Problem dar. Da das Protein nur in geringen Konzentrationen vorlag, konnten eventuelle geringfügige Aktivitäten so überdeckt werden.

4 Diskussion

Membrangebundene Dehydrogenasen spielen eine Schlüsselrolle bei der schnellen stereo- und regiospezifischen Umsetzung einer großen Reihe von Zuckern, Alkoholen und Polyolen durch Essigsäurebakterien. Die Substrate werden direkt im Periplasma unvollständig oxidiert und die entstehenden Aldehyde, Ketone und organischen Säuren über Porine in das Medium abgegeben (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009). Um das große biotechnologische Potential membrangebundener Dehydrogenasen ausschöpfen zu können, ist es wichtig, die genaue Funktion der Proteine zu kennen. Viele dieser Enzyme wurden bereits unter anderem aus den in dieser Arbeit eingesetzten Essigsäurebakterien *Gluconobacter oxydans* und *Gluconacetobacter diazotrophicus* aufgereinigt und charakterisiert (Adachi *et al.*, 1980, 2001; Gómez-Manzo *et al.*, 2008, 2010a; Matsushita *et al.*, 2003), jedoch bilden diese Organismen auch einige membrangebundene Dehydrogenasen mit bisher unbekannter Funktion. Die Aufreinigung von Membranproteinen, die der Charakterisierung vorangeht, ist mit den bisher beschriebenen Verfahren aufwändig und zeitintensiv. Deshalb stellte die Entwicklung eines geeigneten Systems zur Produktion und Aufreinigung von membrangebundenen Dehydrogenasen aus Essigsäurebakterien einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar.

4.1 *Gluconobacter oxydans* als Organismus der Biotechnologie

4.1.1 Biotechnologische Anwendungen von *G. oxydans*

G. oxydans wird bereits für eine Reihe von Prozessen in der Biotechnologie verwendet. Der Organismus wird z. B. zur Produktion von D-Tagatose, einem Süßstoff mit geringer Kalorienzahl (Rollini & Manzoni, 2005) und Dihydroxyaceton, das in der pharmazeutischen Industrie als Bräunungsmittel Verwendung findet (Claret *et al.*, 1994), eingesetzt. Außerdem kommt *G. oxydans* bei der Herstellung von L-Ribulose aus Ribitol zum Einsatz. L-Ribulose ist ein bedeutendes chirales Schlüsselmolekül, unter anderem für die Synthese des seltenen Zuckers L-Ribose, der in der Produktion von antiviralen Medikamenten verwendet wird (De Muynck *et al.*, 2006). Weitere wichtige biotechnologische Anwendungen von *G. oxydans*

sind auch die Oxidation von 1-Amino-1-Deoxy-D-Sorbitol zu 6-Amino-6-Deoxy-L-Sorbose in der Produktion des Diabetes-Medikaments Miglitol (N-Hydroxyethyl-1-Deoxynojirimicin) (Schedel, 2000) und die Oxidation von D-Sorbitol zu L-Sorbose während des industriellen Prozesses zur Synthese von Vitamin C (Adachi *et al.*, 2003; Hancock & Viola, 2002; Reichstein & Grüssner, 1934). Daneben ist die Umsetzung von D-Glukose zu D-Glukonat eine der genutzten Fähigkeiten von *G. oxydans*. Glukonat kann weiter zu 2- und 5-Keto-D-Glukonat sowie zu 2,5-Diketo-D-Glukonat oxidiert werden. 2- und 5-Keto-D-Glukonat stellen jeweils interessante Vorläufer für die Synthese von Isoascorbinsäure bzw. Weinsäure dar (Deppenmeier *et al.*, 2002; Klasen *et al.*, 1992; Merfort *et al.*, 2006a, b). 2,5-Diketo-D-Glukonat kann wiederum zu 2-Keto-L-Gulonat, einem Intermediat in der Vitamin C-Synthese, umgesetzt werden (Deppenmeier *et al.*, 2002). Sowohl ganze Zellen von *G. oxydans* als auch gereinigte Enzyme finden Verwendung als biologische Elemente in Sensorsystemen zur Detektion von Alkoholen, Zuckern und Polyolen (Hikuma *et al.*, 1995; Lapenaite *et al.*, 2005; Reshetilov *et al.*, 1997; Švitel *et al.*, 1998; Tkáč *et al.*, 2001, 2003, 2009).

4.1.2 Membrangebundene Dehydrogenasen und PQQ

Membrangebundene Dehydrogenasen werden allgemein in Chinoproteine, die die prosthetische Gruppe Pyrrolochinolinchinon (PQQ) tragen, und Flavoproteine, die Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) enthalten, aufgeteilt (Matsushita *et al.*, 1994). Einige dieser Enzyme beinhalten zusätzlich zu PQQ auch Cytochrom *c* und werden entsprechend als Chinohämoproteine bezeichnet (Goodwin & Anthony, 1998). PQQ (auch unter dem Trivialnamen Methoxatin bekannt) besteht aus einem Pyrrolring, der mit einem Chinolinring, der eine *o*-Chinongruppe aufweist, fusioniert ist (Duine, 1991). Biologisch relevante Redox-Formen sind die Chinonform (PQQ), die Semichinonform (PQQH[•]) sowie die Chinolform (PQQH₂) (Duine *et al.*, 1986). Während viele Bakterien, wie *Klebsiella pneumoniae* (Meulenberg *et al.*, 1992), *Acinetobacter calcoaceticus* (Goosen *et al.*, 1989), *Methylobacterium extorquens* AM1 (Morris *et al.*, 1994; Springer *et al.*, 1996) und *Pseudomonas aeruginosa* (Gliese *et al.*, 2009) Gene für die Synthese von PQQ besitzen, können andere wie *Acinetobacter lwoffii* und *Escherichia coli* kein PQQ synthetisieren und produzieren dementsprechend nur Apochinoproteine (Matsushita *et al.*, 1997; van Schie *et al.*, 1984). Zur Bildung funktionsfähiger Chinoproteine benötigen letztere Organismen PQQ, das von außen zugeführt wird. In *G. oxydans* werden die Proteine für die Biosynthese von PQQ im *pqqABCDE* Genkluster kodiert (Felder *et al.*, 2000), wobei der *pqqA*-Promotor den

einigen Promotor innerhalb des Genklusters darstellt (Hölscher & Görisch, 2006). Neben dem Vorkommen in bakteriellen Dehydrogenasen, tritt PQQ auch ubiquitär in höheren Organismen auf. Aufgrund seiner Effekte auf verschiedene physiologische und biochemische Prozesse und der nachgewiesenen Förderung von Wachstum und Stresstoleranz wird PQQ häufig als essentieller Nährstoff oder Vitamin bezeichnet (Kasahara & Kato, 2003; Misra *et al.*, 2012). Auch in menschlichen Geweben und Körperflüssigkeiten wurde PQQ nachgewiesen (Kumazawa *et al.*, 1992). Da bisher keine Berichte über die Synthese von PQQ in eukaryotischen Zellen vorliegen, ist anzunehmen, dass PQQ durch Enterobakterien synthetisiert oder über die Nahrung aufgenommen wird. PQQ wurde in fast allen daraufhin untersuchten Lebensmitteln nachgewiesen (Kumazawa *et al.*, 1995; Noji *et al.*, 2007) und unter anderem wurde die Bedeutung von PQQ für das Wachstum und die Entwicklung von Mäusen gezeigt (Killgore *et al.*, 1989; Steinberg *et al.*, 1994). Aus diesem Grund stellen sowohl PQQ-abhängige Enzyme als auch die Herstellung von PQQ selbst ein wichtiges Kapitel im Bereich der Biotechnologie dar. Dementsprechend interessant ist auch die Charakterisierung von PQQ-abhängigen membrangebundenen Dehydrogenasen mit bisher unbekannter Funktion. Besonders bei Membranproteinen ist die homologe Produktion von Vorteil, da so die funktionale Integration des Proteins in die Membran besser gewährleistet werden kann und *G. oxydans*, im Gegensatz zu *E. coli*, PQQ selbst synthetisieren kann. Deshalb werden geeignete Expressionssysteme für *G. oxydans* benötigt, die die Überproduktion und Aufreinigung dieser Enzyme ermöglichen.

4.1.3 Entwicklung von Expressionssystemen für Essigsäurebakterien

In der Vergangenheit wurden verschiedene Vektoren für den Gentransfer in Essigsäurebakterien entwickelt. Häufig dienten dabei natürlich auftretende, kryptische Plasmide mit niedriger Kopienzahl als Basis für die Konstruktion von Shuttle-Vektoren. Die Verwendbarkeit der beschriebenen Plasmide war jedoch häufig beschränkt. Während z. B. die Transformation und stabile Replikation der Plasmide pTA5001 und pMV102 in *Acetobacter* berichtet wurde (Fukaya *et al.*, 1985c; Ohmori *et al.*, 1982; Okumura *et al.*, 1985), war eine Transformation von *Gluconobacter* mit diesen Plasmiden nicht möglich (Fukaya *et al.*, 1985a). Die Fusion des Plasmids pMV102 aus *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* NBI 1002 mit dem *E. coli* Plasmid pACYC177 lieferte Plasmid pMV301, das sich sowohl zur Transformation von *Acetobacter aceti* als auch von *E. coli* eignete (Fukaya *et al.*, 1985b). Analog dazu entstand durch die Ligation des Plasmids pMV201 aus *G. oxydans* IFO 3130 mit dem Plasmid aus *E. coli* das Plasmid pMG101, das zur Transformation von *G. suboxydans*

var. *α* IFO 3254 und *E. coli* eingesetzt werden konnte (Fukaya *et al.*, 1985a). Seitdem wurden für *G. oxydans* weitere kryptische Plasmide (Creaven *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1997; Shinjoh & Hoshino, 1995; Tonouchi *et al.*, 1994, 2003; Trček *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2010) und Plasmide mit einem breiten Wirtsspektrum (Broad-Host-Range Plasmide) (Condon *et al.*, 1991; Merfort *et al.*, 2006a, b; Schleyer *et al.*, 2008) entwickelt. Ein wichtiger Aspekt dabei war die Optimierung von industriellen Stämmen zur Steigerung der Produktion von z. B. 2-Keto-L-Gulonat (Saito *et al.*, 1997) und 5-Keto-D-Glukonat (Merfort *et al.*, 2006a, b). Saito *et al.* (1997) setzten verschiedene *E. coli*-Promotoren (*tufB*, *tac* und PL) zur Expression des Sorbose-Dehydrogenase- und Sorboson-Dehydrogenase-Gens in *G. oxydans* ein. Die Aktivität dieser Promotoren wurde jedoch nicht quantifiziert, sondern konnte nur durch die Produktion von 2-Keto-L-Gulonat abgeleitet werden. Überdies war der verwendete Vektor recht groß und die Sequenz nicht vollständig bekannt. Merfort *et al.* (2006a, b) nutzten unter anderem den *tufB*-Promotor aus *G. oxydans* zusammen mit dem Vektor pBBR1MCS-5 (Kovach *et al.*, 1995). Bei diesem Promotor handelt es sich jedoch vermutlich um einen intergenen und schwachen Promoter, der nicht eindeutig definiert wurde. Der gleiche Promotor wurde auch in den pEXGOX Klonierungsvektoren verwendet (Schleyer *et al.*, 2008). Zhang *et al.* (2010) konstruierten außerdem den auf dem Plasmid pGOX3 aus *G. oxydans* DSM2003 und dem *E. coli* Vektor pUC18 basierenden Shuttle-Vektor pZL1, der in *G. oxydans* sowie *E. coli* repliziert werden konnte. Dieser Vektor mit einer mittleren Kopienzahl war ohne selektiven Druck weitgehend stabil in *G. oxydans*. Der Nachteil dieses Vektors war, dass auch hier ein nicht definierter Promotor aus *G. oxydans* genutzt wurde.

Die von Kallnik *et al.* (2010) eingeführten Vektoren, pBBR1p264 und pBBR1p452, basierten auf dem Broad-Host-Range Plasmid pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995) und boten den Vorteil, dass sie konstitutive Promotoren mit definierter Stärke (moderat und stark) enthielten und auch die Kopienzahl bekannt war. Zudem waren diese Vektoren relativ klein, beinhalteten viele zur Klonierung geeigneten Restriktionsschnittstellen und waren mobilisierbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Expressionsvektoren weiterentwickelt, um die einfache Produktion und Aufreinigung von Proteinen aus *G. oxydans* zu ermöglichen. Durch die Integration einer C-terminalen Strep-Tag-Sequenz wurden die Vektoren so modifiziert, dass eingebrachte Gene als Strep-Tag-Fusionsproteine exprimiert wurden, die über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden konnten. Die Eignung der entstandenen Vektoren pBBR1p264-ST und pBBR1p452-ST für die Überproduktion von Proteinen in *G. oxydans* und deren Aufreinigung wurde zunächst

anhand des löslichen Proteins Gox1801 überprüft und das isolierte Protein im Anschluss charakterisiert. Im nächsten Schritt wurde die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase (mGDH) aus *G. oxydans* als Modellprotein für PQQ-abhängige membrangebundene Dehydrogenasen ausgewählt. Das entsprechende Enzym aus *G. suboxydans* wurde zuvor bereits über konventionelle Säulenchromatographie aufgereinigt und charakterisiert (Ameyama *et al.*, 1981). Der Aufreinigungsprozess umfasste dabei jedoch mehrere aufwändige und zeitintensive Chromatographie-Schritte. Deshalb sollte die Aufreinigung der mGDH in dieser Arbeit über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie erfolgen. Das Enzym eignete sich gut, um den Aufreinigungsprozess von Membranproteinen zu optimieren, da die Aktivität leicht gemessen werden konnte. Durch die notwendige Solubilisierung mit Detergenzien, wird die Bindung von Membranproteinen an die Strep-Tactin-Säule häufig erschwert. Um diesbezüglich eine Verbesserung zu erzielen, wurden in dieser Arbeit auch ein modifizierter Strep-Tag mit verlängerter Verbindungssequenz (Linker) zwischen Protein und Tag (Streplong) (Zeiser *et al.*, 2014) sowie ein doppelter Strep-Tag (One-Strep-Tag/Twin-Strep-Tag) zur Aufreinigung der mGDH eingesetzt. Nachdem anhand der mGDH als Modellprotein gezeigt worden war, dass Membranproteine mit dem verwendeten System überproduziert und gereinigt werden können, wurde der Vektor pBBR1p452-ST zur homologen Produktion der membrangebundenen Dehydrogenase Gox1857 aus *G. oxydans* eingesetzt. Schließlich wurde die putative L-Sorboson-Dehydrogenase Gdi_3764 aus *Gluconacetobacter diazotrophicus* mithilfe des Vektors pBBR1p452-ST bzw. einer Variante dieses Vektors, die den doppelten Strep-Tag (One-Strep-Tag) enthielt, homolog überproduziert und gereinigt. So wurde die Übertragbarkeit des für *G. oxydans* entwickelten Expressionssystems auf andere Essigsäurebakterien überprüft.

4.2 Gox1801 – eine Succinat-Semialdehyd-Reduktase aus *G. oxydans*

Anhand des Proteins Gox1801 wurde gezeigt, dass das in dieser Arbeit weiterentwickelte System zur homologen Überproduktion und Aufreinigung von Proteinen aus *G. oxydans* geeignet ist. Eine bioinformatische Analyse der Proteinsequenz ergab, dass Gox1801 weder eine Transmembrandomäne, noch ein Signalpeptid besitzt. Dementsprechend muss es sich um ein cytoplasmatisches Enzym handeln. Es wurden zudem ein bis zwei NAD(P)-Bindestellen für Gox1801 identifiziert, die bei cytoplasmatischen Oxidoreduktasen häufig auftreten. In der

vorhergesagten Sekundärstruktur des Proteins konnten nur für eine der möglichen NAD(P)-Bindestellen β -Faltblattstrukturen detektiert werden, die neben α -Helices an der charakteristischen Rossmann-Faltung (Rossmann *et al.*, 1974) beteiligt sind. Daher ist unklar, ob das Protein Gox1801 eine zweite NAD(P)-Bindestelle aufweist. Eine BLAST-Analyse der Proteinsequenz unter Verwendung der UniProtKB/Swissprot-Datenbank zeigte unter anderem Ähnlichkeiten von Gox1801 zu einer 2-(Hydroxymethyl)Glutarat-Dehydrogenase aus *Eubacterium barkeri*, einer Glyoxylat/Succinat-Semialdehyd-Reduktase 1 bzw. γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus *Arabidopsis thaliana* und einer 2-Hydroxy-3-Oxopropionat-Reduktase bzw. Tartronat-Semialdehyd-Reduktase aus *Escherichia coli* K-12 an. Eine geringere Ähnlichkeit zu Proteinen bekannter Struktur wies Gox1801 zu den A Ketten der γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen aus *Geobacter sulfurreducens* und *Geobacter metallireducens* (Zhang *et al.*, 2011) sowie zu einer β -Hydroxysäure-Dehydrogenase aus *Eubacterium barkeri* (Reitz *et al.*, 2008) auf. Welche Funktion Gox1801 genau trägt, galt es in dieser Arbeit anhand des gereinigten Enzyms zu überprüfen.

4.2.1 Aufreinigung und Charakterisierung des Proteins Gox1801

Die Expression des Gens *gox1801* erfolgte unter dem starken Promotor des Vektors pBBR1p264-ST. Da es sich bei Gox1801 um ein lösliches Protein handelt, war zu erwarten, dass die homologe Überproduktion in *G. oxydans* auch bei hohen Expressionsraten unproblematisch ist. Bei der Aufreinigung des mit einem Strep-Tag II fusionierten Proteins aus dem Zelllysat über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie wurden in den Elutionsfraktionen Proteinkonzentrationen von bis zu 0,34 mg/mL erreicht. Die Gesamtausbeute an Protein aus 500 mL Kultur von *G. oxydans* Δ *hdsR* mit dem entsprechenden Plasmid betrug, abhängig von der jeweiligen Präparation, zwischen 0,38 und 0,57 mg. Durch eine SDS-PAGE und einen Western-Blot wurde sichergestellt, dass das Protein bis zur Homogenität gereinigt vorlag. Es zeigte sich, dass das Enzym Gox1801 bevorzugt Succinat-Semialdehyd umsetzte. Die spezifische Aktivität von Gox1801 mit Succinat-Semialdehyd und dem Cofaktor NADH betrug 225 ± 36 U/mg. Auch NADPH war ein geeigneter Elektronendonator für das Enzym. Die spezifische Aktivität mit diesem Cofaktor war vergleichbar und betrug 230 ± 19 U/mg.

4.2.1.1 Vergleich von Gox1801 mit Succinat-Semialdehyd-Reduktasen aus anderen Organismen

Succinat-Semialdehyd-Reduktasen (SSARs) aus *Geobacter sulfurreducens* und *Geobacter metallireducens*, sowie eine γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase bzw. Succinat-Semialdehyd-Reduktase aus *E. coli*, die Succinat-Semialdehyd (SSA) zu γ -Hydroxybutyrat (GHB) umsetzen, wurden bereits hetero- bzw. homolog in *E. coli* überproduziert und die rekombinaten Proteine anhand eines Hexahistidin-Tags aufgereinigt (Saito *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Das ermittelte Molekulargewicht von Gox1801 aus *G. oxydans* war dem der SSARs aus *Geobacter* und *E. coli* (zwischen 30 und 31 kDa) sehr ähnlich und wie diese lag auch Gox1801 nativ als Homotetramer vor. Während Gox1801 vergleichbare spezifische Aktivitäten mit den Cofaktoren NADH und NADPH aufwies, war die Aktivität des Enzyms aus *E. coli* mit NADPH geringer als mit NADH. Die SSARs aus *Geobacter* waren dagegen ausschließlich mit dem Cofaktor NADPH aktiv. Die spezifische Aktivität von Gox1801 war 63-fach bzw. 159-fach höher als die der SSARs aus *Geobacter sulfurreducens* (3,6 U/mg) und *Geobacter metallireducens* (1,45 U/mg) und zudem wesentlich höher (575-fach) als die spezifische Aktivität der *E. coli* SSAR mit nur 0,4 U/mg (Saito *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Dies spiegelte sich auch in den kinetischen Parametern wieder. Der K_M -Wert für SSA war bei dem Enzym aus *G. oxydans* mit 5,1 mM vergleichbar mit dem der SSAR aus *E. coli* (4,3 mM), der V_{max} -Wert war mit 298 U/mg vs. 0,2 U/mg jedoch bedeutend höher. Die Aktivität des Enzyms Gox1801 wurde bei dem optimalen pH-Wert von 6,5 und der optimalen Temperatur von 30 °C gemessen. Die Aktivität der *Geobacter* SSARs wurde dagegen bei pH 7,5 und Raumtemperatur bestimmt. Die Aktivität der SSAR aus *E. coli* wurde bei pH 7,2 und 37 °C gemessen. Geringere Aktivitäten zeigte Gox1801 mit Glyoxal, Phenylglyoxal und Methylglyoxal. Die Gegenreaktion der Succinat-Semialdehyd-Reduktion, also die Oxidation von GHB zu SSA mit NAD^+ , wurde lediglich mit einer geringen spezifischen Aktivität (4 U/mg) katalysiert. Dies zeigte, dass die Reduktion von SSA durch das Enzym stark begünstigt war. Ähnlich wie für Gox1801 wurden auch für das *E. coli*-Enzym sehr geringe Umsatzraten von GHB ($K_M = 102$ mM, $V_{max} = 0,062$ U/mg) sowie Aktivitäten mit Methylglyoxal und 3-Hydroxypropansulfonat angegeben (Saito *et al.*, 2009). Aufgrund des extrem hohen K_M -Werts für GHB ist jedoch davon auszugehen, dass diese Reaktion keinerlei physiologische Bedeutung hat. Gleichzeitig war die Aktivität des Enzyms aus *E. coli* auch mit SSA im Vergleich zu der des Enzyms Gox1801 sehr gering. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Umsetzung von SSA durch das *E. coli*-Enzym lediglich eine Nebenreaktion ist und das Enzym möglicherweise ein anderes, nicht identifiziertes Substrat bevorzugt. Ähnliches

könnte für die beschriebenen SSARs aus *Geobacter* zutreffen, da die spezifischen Aktivitäten dieser Enzyme im Vergleich zu der von Gox1801 mit SSA ebenfalls gering waren. Somit ist festzustellen, dass es sich bei Gox1801 tatsächlich um eine SSARs handelt, während es sich bei den Enzymen aus *E. coli* und *Geobacter* mit hoher Wahrscheinlichkeit um Proteine handelt, die anderen Familien zugeordnet werden müssen. Die Ergebnisse zeigen eindeutig das Alleinstellungsmerkmal für die SSAR aus *G. oxydans*, die mit hoher katalytischer Effizienz SSA zu GHB umsetzt, während die entsprechenden Werte der beschriebenen SSARs aus anderen aeroben Bakterien gering sind.

Auch aus anaeroben Bakterien sind Enzyme bekannt, die SSA reduzieren. In *Clostridium kluyveri* spielt die γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase eine wichtige Rolle beim Abbau von Succinat (Söhling & Gottschalk, 1996; Wolff & Kenealy, 1995; Wolff *et al.*, 1993). Im ersten Schritt wird Succinat durch eine CoA-Transferase aktiviert und Succinyl-CoA dann durch eine Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase zu SSA umgesetzt. Durch die γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase wird SSA anschließend zu GHB reduziert, das weiter metabolisiert werden kann (siehe unten). Söhling & Gottschalk (1996) wiesen die heterologe Transkription einer klonierten Genregion aus *Clostridium kluyveri*, die auch das Gen für die γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase beinhaltetete, in *E. coli* nach. Im Zellextrakt des entsprechenden rekombinanten *E. coli*-Stamms wurde eine γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase-Aktivität gemessen. Die NAD-abhängige γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus *Clostridium kluyveri* gehört zur Familie der Eisen-enthaltenden Alkohol-Dehydrogenasen und die Proteinsequenz (NCBI: AAA92348) weist keine Homologie zu der Sequenz von Gox1801 auf. Eine Sauerstoff-sensitive γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase wurde aus *Clostridium kluyveri* bereits aufgereinigt und charakterisiert (Wolff & Kenealy, 1995). Es wurde vermutet, dass die Sensitivität des Enzyms gegenüber Sauerstoff auf die enthaltenen Kupfer-Ionen zurück zu führen ist, die mit Sauerstoff reagieren können. Das gereinigte Enzym mit einem Molekulargewicht von 41,6 kDa lag in der nativen Form als Dimer vor. Da für dieses Protein keine Sequenz angegeben wurde, ist nicht eindeutig festzustellen, ob es sich um dasselbe Enzym handelt, auf das sich Söhling & Gottschalk (1996) beziehen. Das Molekulargewicht des isolierten Proteins stimmte jedoch mit dem theoretischen, aus dieser Sequenz abgeleiteten, überein. Mit 2800 U/mg war die spezifische Aktivität der γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus *Clostridium kluyveri* mit dem Substrat SSA etwa 12-fach höher als die Aktivität von Gox1801. Der K_M -Wert für SSA betrug dabei 0,56 mM und der K_M -Wert für den Cofaktor NADH lag bei 0,15 mM. Während für Gox1801 mit SSA vergleichbare Aktivitäten mit den

Cofaktoren NADH und NADPH festgestellt wurden ($K_M = 59 \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 307 \text{ U/mg}$ für NADH, $K_M = 13 \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 265$ für NADPH), wurden bei dem Enzym aus *Clostridium kluyveri* mit NADPH nur 25 % des V_{max} -Werts mit NADH erreicht. Wie Gox1801 und die SSAR aus *E. coli* katalysierte die γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus *Clostridium kluyveri* mit niedrigen und aus physiologischer Sicht vermutlich irrelevanten Raten ($K_M = 55 \text{ mM}$) auch die Oxidation von GHB (Wolff & Kenealy, 1995). Ähnlichkeiten weist die γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus *Clostridium kluyveri* unter anderem zu dem entsprechenden Enzym aus dem ebenfalls anaeroben Bakterium *Clostridium aminobutyricum* auf. Diese γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase ist in den Katabolismus von γ -Aminobutyrat über SSA und GHB involviert (Gerhardt *et al.*, 2000; Hardman, 1962).

Des Weiteren wurden SSARs aus eukaryotischen Organismen isoliert. Aus dem menschlichen Gehirn wurden z. B. zwei NADPH-abhängige Enzyme isoliert, die SSA reduzieren können (Cash *et al.*, 1979). Der K_M -Wert für SSA lag bei diesen Enzymen zwischen 24 und 56 μM . Während das eine Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa monomer vorlag und neben SSA weitere Substrate umsetzte (dieses Enzym wies die höchste Aktivität mit *p*-Nitrobenzaldehyd auf), lag das andere Enzym als Dimer mit einem Molekulargewicht von etwa 90 kDa vor und war spezifischer für SSA. In einer anderen Studie wurde die cDNA, die eine menschliche SSAR kodiert, kloniert und in *E. coli* exprimiert (Schaller *et al.*, 1999). Das NADPH-abhängige Enzym erwies sich als identisch mit der Aflatoxin B₁ Aldehyd-Reduktase aus der menschlichen Leber (Ireland *et al.*, 1998). Die Ähnlichkeit der Proteinsequenz von Gox1801 zu der dieser SSAR ist sehr gering (NCBI: AAC52104; 17 % Sequenzabdeckung, 35 % Identität). Der K_M -Wert des isolierten Enzyms betrug 16 μM für SSA und die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M war mit $1,44 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ wesentlich niedriger als die von Gox1801 aus *G. oxydans* mit $3,1 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Neben SSA setzte diese menschliche SSAR auch begrenzt andere Aldehyde und Ketone wie 2-Carboxybenzaldehyd, 9,10-Phenanthrenchinon, Phenylglyoxal und 4-Nitrobenzaldehyd um (Schaller *et al.*, 1999). Enzyme aus dem Gehirn von Schweinen, Rindern und Ratten, die SSA mit unterschiedlichen Raten und unterschiedlicher Spezifität reduzieren, wurden ebenfalls bereits beschrieben (Andriamampandry *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 1993; Cromlish & Flynn, 1985; Hearl & Churchich, 1985; Rumigny *et al.*, 1980). Aufgrund der variierenden Bezeichnungen für diese Enzyme und der Tatsache, dass die Gen- und Proteinsequenzen meist nicht angegeben wurden, ist ein Vergleich dieser SSARs jedoch generell schwierig.

4.2.1.2 Funktion von Succinat-Semialdehyd-Reduktasen und Gox1801

Sowohl in anaeroben Bakterien als auch in Säugetieren und Pflanzen sind SSARs in den Metabolismus von γ -Aminobutyrat (GABA) involviert. GABA ist ein wichtiger inhibitorischer Neurotransmitter im Zentralnervensystem von Säugetieren und ein Sekundärmetabolit in Pflanzen, der an der Reaktion auf abiotischen Stress beteiligt ist (Allan *et al.*, 2009; Bormann, 1988; Breitzkreuz *et al.*, 2003; Chebib & Johnston, 1999). Ebenso spielt GABA bei Bakterien nicht nur im Stickstoff- und Kohlenstoff-Metabolismus, sondern auch bei Anpassungen an Stress, wie z. B. einen sauren pH-Wert oder eine hohe Osmolarität, eine Rolle (De Biase *et al.*, 1999; Metzger & Halpern, 1990; Metzner *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006). Unter aeroben Bedingungen wird GABA überwiegend durch sogenannte GABA-Transaminasen, die GABA zu SSA umsetzen (Bartsch *et al.*, 1990; Porter *et al.*, 1985), und SSA-Dehydrogenasen, die SSA zu Succinat oxidieren (Donnelly & Cooper, 1981; Gibson *et al.*, 1998; Marek & Henson, 1988), metabolisiert und Succinat im Anschluss in den Citratzyklus eingeschleust. Auf einem alternativen Weg, an dem Succinat-Semialdehyd-Reduktasen/ γ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen beteiligt sind, wird GABA über SSA zu GHB abgebaut (Andriamampandry *et al.*, 1998; Breitzkreuz *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 1993; Gerhardt *et al.*, 2000; Hearl & Churchich, 1985; Schaller *et al.*, 1999).

Welche Bedeutung Gox1801 als Succinat-Semialdehyd-Reduktase für *G. oxydans* hat, ist bisher nicht genau geklärt. Eine Analyse der Transkriptabundanz des Gens *gox1801* in einem *G. oxydans* Δ *hsdR* Kontrollstamm, der lediglich das leere Plasmid pBBR1p452 trug, zeigte, dass dieses Gen 31-fach stärker exprimiert wurde als das Referenzgen, das das ribosomale Protein L23 kodiert. Das Referenzgen wird konstitutiv und mit hohen Raten exprimiert, da das Protein L23 als Bestandteil der Ribosomen in die Translation involviert ist. Die erhöhte Expressionsrate des Gens *gox1801* im Vergleich zu diesem Referenzgen zeigte dementsprechend, dass *gox1801* sehr stark exprimiert wurde. Folglich liegt das Protein Gox1801 in dem *G. oxydans*-Wildtyp wahrscheinlich in großen Mengen vor und muss deshalb eine wichtige Funktion haben. Es ist bekannt, dass *G. oxydans* keine Succinat-Dehydrogenase besitzt (Prust *et al.*, 2005) und daher Succinat, das bei der Oxidation von SSA durch die Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase entstehen würde, nicht über den Citratzyklus weiter oxidieren kann. Daher wäre es denkbar, dass die Reduktion von SSA zu GHB durch das Enzym Gox1801 als Weg zum Abbau von SSA bevorzugt wird. Wie entstandenes GHB in *G. oxydans* im Anschluss daran metabolisiert wird ist jedoch unklar. Die anaeroben Bakterien *Clostridium kluyveri* und *Clostridium aminobutyricum* können GABA

bekanntermaßen über GHB, γ -Aminobutyryl-CoA und Crotonyl-CoA zu Acetat und Butyrat abbauen. (Gerhardt *et al.*, 2000; Söhling & Gottschalk, 1996). In einigen Archaeen dient ein 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat- bzw. Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat-Zyklus, an dem SSARs beteiligt sind, der Assimilierung von Kohlenstoffdioxid (Berg *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2008; Kockelkorn & Fuchs, 2009; Ramos-Vera *et al.*, 2009, 2011). Zudem tritt GHB in vielen Bakterien, neben anderen Hydroxyalkansäuren, auch in sogenannten Polyhydroxyalkanoaten auf, die wichtige Speicherstoffe darstellen (Jendrossek, 2009; Kunioka *et al.*, 1989; Steinbüchel & Valentin, 1995). Für die Biosynthese von Polyhydroxyalkanoaten müssen die Komponenten zunächst zu Hydroxyacyl-CoA-Thioestern umgesetzt werden, die anschließend den Polyhydroxyalkanoat-Synthasen als Substrate dienen (Steinbüchel & Valentin, 1995). Diese stellen die Schlüsselenzyme der Polyhydroxyalkanoat-Synthese dar und katalysieren die Polymerisierung von Hydroxyacyl-CoA unter Freisetzung von Coenzym A (Jendrossek, 2009). Poly(3-Hydroxybutyrat-Co-4-Hydroxybutyrat) und Poly(4-Hydroxybutyrat) werden z.B. von *Cupriavidus necator* (früher *Ralstonia eutropha*) (Ishida *et al.*, 2001; Kimura *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1996), *Comamonas acidivorans* (Saito *et al.*, 1996; Sudesh *et al.*, 1999) und *Hydrogenophaga pseudoflava* (Choi *et al.*, 1999) synthetisiert. Da Polyhydroxyalkanoate aus erneuerbaren Ressourcen hergestellt werden und biologisch abbaubar sind (Jendrossek & Handrick, 2002; Jendrossek *et al.*, 1996), werden diese allgemein als umweltfreundliche Materialien angesehen, die mittlerweile nicht nur als Verpackungsmaterial, sondern auch als Hochtechnologie-Materialien im medizinischen Bereich Verwendung finden (Williams *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2009). Ob *G. oxydans* Polymere aus GHB bildet ist jedoch fraglich. Im Genom von *G. oxydans* 621H wurden keine Gene identifiziert, die entsprechende Polyhydroxyalkanoat-Synthasen kodieren. Somit kann die Bedeutung des Enzyms Gox1801, das SSA zu GHB reduziert, für den Metabolismus von *G. oxydans* nicht genau geklärt werden.

4.3 Die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase – das Schlüsselenzym im Glukose-Metabolismus von *G. oxydans*

Glukose-Dehydrogenasen katalysieren die Oxidation von Glukose zu δ -Glukonolakton, das dann chemisch oder enzymatisch durch eine Glucono- δ -Lactonase zu Glukonat hydrolysiert wird (Matsushita *et al.*, 1994; Shinagawa *et al.*, 2009). *G. oxydans* besitzt sowohl eine NADP-abhängige cytoplasmatische als auch eine PQQ-abhängige membrangebundene Glukose-Dehydrogenase (Buchert & Viikari, 1988; Rauch *et al.*, 2010). Die Produktion von Glukonat in *G. oxydans* resultiert jedoch überwiegend aus der Aktivität der PQQ-abhängigen Glukose-Dehydrogenase (mGDH), da die Aktivität des Chinoproteins 30-fach höher ist als die Aktivität der NADP-abhängigen Glukose-Dehydrogenase (Pronk *et al.*, 1989). Eine bioinformatische Analyse und der Vergleich von PQQ-Dehydrogenasen mit bekannter 3 D Struktur ergaben, dass die mGDH aus fünf N-terminalen Transmembranhelices sowie einer großen periplasmatischen Domäne besteht, in der das aktive Zentrum mit den Bindestellen für PQQ und Calcium-Ionen liegt. Die mGDH aus *G. oxydans* wurde in dieser Arbeit als Modell für membrangebundene Dehydrogenasen eingesetzt. Das Enzym wurde bereits von Ameyama *et al.* (1981) aus *G. suboxydans* durch konventionelle Säulenchromatographie aufgereinigt und charakterisiert. Da das Substrat des Enzyms schon bekannt war, konnte die Aktivität in dieser Arbeit leicht nachgewiesen und während der Aufreinigung verfolgt werden.

4.3.1 Solubilisierung und Aufreinigung von Membranproteinen über Affinitätschromatographie

Die Problematik bei der Aufreinigung von Membranproteinen liegt darin, dass die Proteine zunächst aus der Membran herausgelöst werden müssen, bevor die Isolierung erfolgen kann. Dazu werden die Membranen mit Detergenzien solubilisiert. Diese können jedoch einen Einfluss auf die Aktivität der Proteine haben. Detergenzien sind amphiphile Moleküle, die aus einer hydrophoben Kohlenwasserstoffgruppe und einer polaren oder geladenen Kopfgruppe bestehen. Je nach Kopfgruppe erfolgt die Einteilung der Detergenzien in nicht-ionisch, anionisch, kationisch oder zwitterionisch (Linke, 2009). Detergenzien können die Oberflächenspannung einer Flüssigkeit bzw. die Grenzflächenspannung zwischen zwei

Flüssigkeiten herabsetzen. In wässrigen Lösungen liegen Detergenzien als Monomere oder Mizellen vor, in denen die polaren Gruppen nach außen zeigen und die apolaren Gruppen sich im Zentrum zusammen lagern. Bei niedrigen Konzentrationen eines Detergenz liegen nur Monomere vor, während sich bei höheren Konzentrationen ein Gleichgewicht zwischen Monomeren und Mizellen einstellt (Helenius *et al.*, 1979). Entscheidend ist hier die kritische Mizellenbildungskonzentration (Critical Micelle Concentration, CMC), die temperaturabhängig die minimale Detergenzkonzentration angibt, bei der Mizellen gebildet werden (Linke, 2009). Erfolgt die Solubilisierung von Membranen mit Detergenzien, so werden die Proteine und Lipide in lösliche Mizellen überführt. Es ist jedoch nicht möglich vorherzusagen, ob die native Form der Proteine erhalten bleibt, denn diese kann von der Umgebung des Proteins abhängen. Detergenzien können mögliche notwendige Kontakte des Proteins zu Komponenten der Membran beeinflussen und so zu einem Verlust der Aktivität führen (Linke, 2009). Welches Detergenz sich für ein bestimmtes Membranprotein am besten eignet, muss experimentell bestimmt werden.

Da Ameyama *et al.* (1981) für die mGDH aus *G. suboxydans* gute Ergebnisse mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 erzielt hatten, wurde Triton X-100 auch in dieser Arbeit zur Solubilisierung der Membran eingesetzt, um die mGDH aus *G. oxydans* 621H aufzureinigen. Im Unterschied dazu sollte das Membranprotein jedoch nicht über konventionelle Säulenchromatographie, sondern durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie isoliert werden. Deshalb wurde das Protein homolog unter Verwendung des Plasmids pBBR1p452-*gox0265*-ST mit einem C-terminalen Strep-Tag überproduziert. In der Literatur wurde bisher schon über einige Fälle berichtet, in denen Membranproteinen mithilfe von Affinitätstags aufgereinigt wurden. Der vermutliche Formalinsäure-Kanal FocA aus *E. coli* konnte z. B. mit einem C- bzw. N-terminalen Strep-Tag überproduziert sowie funktional in die Membran integriert werden und das Protein wurde anhand des N-terminalen Tags über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt (Falke *et al.*, 2010). Die Transmembran-Untereinheit IIBC^{Glc} des Glukose-Transporters aus *E. coli* wurden mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag überproduziert und durch Metall-Affinitätschromatographie isoliert (Waeber *et al.*, 1993). Auch der Siderophor-Rezeptor für Ferrichrom-Eisen aus der äußeren Membran von *E. coli* wurde mit einem Hexahistidin-Tag über Metall-Chelat-Chromatographie aufgereinigt (Ferguson *et al.*, 1998). Dabei handelte es sich jedoch um einen internen Histidin-Tag, der in einer Oberflächen-exponierten Schleife des Proteins lokalisiert war. Rahman *et al.* (2007) testeten verschiedene N- und C-terminale

Affinitätstags aus konventionellen und rekombinatorischen Gateway Klonierungsvektoren an bakteriellen Transportern mit bekannter Topologie und untersuchten die Integration der Proteine in die Membran von *E. coli*. In allen bisher genannten Beispielen erfolgte die Expression der Membranproteine in *E. coli*. In dieser Arbeit sollte die membrangebundene Glukose-Dehydrogenase dagegen homolog in *G. oxydans* produziert und aufgereinigt werden. Für die Überproduktion und Aufreinigung eines Membranproteins aus *G. oxydans* mithilfe eines Affinitätstags ist bisher nur ein Beispiel bekannt. Die membrangebundene PQQ-abhängige Sorbitol-Dehydrogenase wurde sowohl mit einem C-terminalen Strep-Tag als auch mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag, der jeweils mit der SLDA-Untereinheit fusioniert war, funktional überproduziert (Kallnik, 2012). Die mit dem Strep-Tag versehene SLDA-Untereinheit konnte mithilfe des Affinitätstags aufgereinigt werden. Die gemessene Aktivität des gereinigten Enzyms war allerdings gering, da die zweite Untereinheit des Proteins, SLDB, offensichtlich nicht so stark mit der SLDA-Untereinheit wechselwirkte, dass sie mit dieser zusammen isoliert werden konnte (Kallnik, 2012).

4.3.2 Wechselwirkung von Affinitätstags und Detergenzien

Bei der Aufreinigung von Membranproteinen anhand von Affinitätstags ist generell zu bedenken, dass die zur Solubilisierung eingesetzten Detergenzien auch einen Einfluss auf die Bindung der Proteine an die Säulenmatrix haben können. Dies galt auch für die in dieser Arbeit aufzureinigende mGDH. Um an die Säule binden zu können, musste zum einen der C-Terminus, an dem der Strep-Tag in diesem Fall lokalisiert war, in den Mizellen nach außen zeigen und zum anderen musste der Affinitätstag weit genug aus den Mizellen herausragen. Auch wenn vom Hersteller für die Strep-Tag/Strep-Tactin Interaktion eine Kompatibilität mit bis zu 2 % Triton X-100 angegeben wird (IBA, Göttingen), schien das Detergenz die Ausbeute bei der Aufreinigung der mGDH mittels des Strep-Tag II wesentlich zu vermindern. Es wurde davon ausgegangen, dass die Bindung des Strep-Tag-Fusionsproteins an die Säulenmatrix ineffizient war, da die Proteinausbeute weit unter der Kapazität der Säule lag und ein großer Teil der Glukose-Dehydrogenase-Aktivität im Durchfluss detektiert wurde.

In der Vergangenheit gab es bereits Studien, die sich mit diesem Problem befassten. Unter anderem wurde gezeigt, dass eine verlängerte Linkersequenz zwischen Protein und Affinitätstag einen positiven Einfluss auf die Proteinausbeute haben kann. Ein Beispiel dafür ist der Mangan-Transporter MntH aus *E. coli*, bei dem nur wenige Aminosäuren des C-Terminus, der mit dem Affinitätstag fusioniert wurde, außerhalb der Transmembrandomäne

lagen (Rahman *et al.*, 2007). Erst eine verlängerte und flexiblere Linkerregion zwischen Protein und Strep-Tag ermöglichte eine Aufreinigung dieses Membranproteins. Auch bei der Aufreinigung der SLDA-Untereinheit der Sorbitol-Dehydrogenase befand sich eine längere Linkerregion von 16 Aminosäuren zwischen Protein und Strep-Tag (Kallnik, 2012). Von Zeiser *et al.* (2014) wurde ebenfalls ein Strep-Tag mit verlängerter Linkerregion, der als Streplong bezeichnete wurde, erfolgreich zur Aufreinigung eines periplasmatischen Chinoproteins eingesetzt. In dieser Arbeit wurde letzterer Strep-Tag mit verlängerter Linkersequenz (Linker mit 10 Aminosäuren, siehe Abb. 15 im Ergebnisteil) auch zur Aufreinigung der mGDH getestet. Die Aufreinigung der mGDH unter Verwendung dieses Affinitätstags verlief jedoch nicht erfolgreich. Ein weiterer Ansatz, um die Ausbeute bei der Aufreinigung von Proteinen über Affinitätschromatographie zu verbessern, ist die Verwendung von doppelten Strep-Tags. Schmidt & Skerra (2007) empfahlen z. B. Tandem-Strep-Tag-Sequenzen bei der Aufreinigung von Proteinkomplexen in Interaktionsstudien und bei Verwendung hoher Detergenzkonzentrationen einzusetzen. Ein solcher Strep-Tag wurde auch in dieser Arbeit für die Aufreinigung der mGDH verwendet. Dabei handelte es sich um den One-Strep-Tag, der aus dem Vektor pASG-IBA103 stammte und mittlerweile auch als Twin-Strep-Tag bekannt ist (IBA, Göttingen) (Schmidt *et al.*, 2013). Durch die Verwendung des doppelten Strep-Tags konnte die Proteinausbeute bei der Aufreinigung von 3 auf 27 % gesteigert werden.

4.3.3 Charakteristika der gereinigten mGDH

Sowohl nach der Aufreinigung der mGDH mit Hilfe des Strep-Tag II als auch unter Verwendung des One-Strep-Tags war für das Protein im SDS-Gel eine einzelne, deutliche Bande sichtbar, die dem errechneten Molekulargewicht der mGDH von 87 kDa zusätzlich des jeweiligen Strep-Tags entsprach. Auffällig war jedoch, dass sich die spezifische Aktivität der beiden Protein-Konstrukte unterschied. Während für die mGDH mit dem einfachen Strep-Tag bei einem pH-Wert von 6 eine spezifische Aktivität von 150 U/mg mit D-Glukose und den Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP gemessen wurde, war die spezifische Aktivität des Enzyms mit dem doppelten Strep-Tag unter den gleichen Bedingungen mit 706 U/mg fast fünffach höher. Anhand einer vergleichenden SDS-PAGE und eines Western-Blots wurde sichergestellt, dass diese Abweichung in der spezifischen Aktivität nicht auf einem Fehler bei der Proteinbestimmung beruhte. Es ist bekannt, dass selbst relativ kurze Affinitätstags, wie der Hexahistidin-Tag, einen Einfluss auf die Struktur oder die Bindungseigenschaften von manchen Proteinen in Immunoassays haben können (Chant *et al.*, 2005; Goel *et al.*, 2000).

Auch stabilisierende und destabilisierende Wirkungen von Affinitätstags wurden verzeichnet. Während für einen modifizierten C-LytA Affinitätstag eine stabilisierende Wirkung nachgewiesen werden konnte (Hernández-Rocamora *et al.*, 2008), wurde festgestellt, dass sich ein Strep-Tag destabilisierend auf die D-Arbitol-Dehydrogenase aus *Thermotoga maritima* auswirkt (Kallnik *et al.*, 2011). Hier wurde vermutet, dass der C-Terminus, der mit dem Strep-Tag fusioniert war, an der Oligomerisierung des Proteins beteiligt ist und die notwendigen hydrophoben oder elektrostatischen Interaktionen durch die Anwesenheit des Tags geschwächt wurden. Bei der Glukose-Dehydrogenase handelt es sich jedoch um ein vermutlich monomeres und membrangebundenes Enzym. Wie der doppelte Strep-Tag im Gegensatz zu dem einfachen Strep-Tag hier eine positive Wirkung auf die Aktivität haben kann, bleibt ungeklärt. Die im Weiteren diskutierten Eigenschaften der mGDH beziehen sich auf das Enzym mit dem einfachen Strep-Tag.

4.3.3.1 Vergleich mit mGDHs aus anderen Organismen

Bisher wurden homologe Glukose-Dehydrogenasen aus *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* und *Gluconobacter suboxydans* beschrieben, die ähnliche Eigenschaften wie die mGDH aus *G. oxydans* besitzen. Bei allen handelt es sich um monomere Chinoproteine mit molekularen Massen zwischen 80 und 88 kDa, deren kinetische Parameter allerdings variieren. Für die mGDH aus *A. calcoaceticus* wird ein V_{\max} -Wert zwischen 600 und 720 U/mg und ein K_M -Wert für Glukose von etwa 4 mM bei einem optimalen pH-Wert von 8,5 angegeben (Dewanti & Duine, 1998; Matsushita *et al.*, 1989b). Das entsprechende Enzym aus *P. fluorescens* besitzt ähnliche Eigenschaften mit einem V_{\max} -Wert von 307 U/mg und einem K_M -Wert für Glukose von 3,3 mM bei einem pH-Optimum von 8,75 (Matsushita *et al.*, 1980). Trotz der Tatsache, dass *E. coli* kein PQQ synthetisieren kann, besitzt auch dieser Organismus eine mGDH. Folglich muss die Apo-mGDH durch exogenes PQQ und Mg^{2+} oder Ca^{2+} , die für die Bindung von PQQ notwendig sind, in das Holoenzym umgewandelt werden. Für die mGDH aus *E. coli* werden V_{\max} -Werte von 150 bis 404 U/mg und ein K_M -Wert für Glukose zwischen 0,9 und 2,1 mM angegeben (Ameyama *et al.*, 1986; Cozier *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 1998). Gleichermäßen variierte auch der optimale pH-Wert für die *E. coli*-mGDH zwischen 6 und 8,75. Diese großen beobachteten Unterschiede sind vermutlich in der Effizienz der Bindung von exogenem PQQ begründet. Die einzige mGDH aus *Gluconobacter* spp., für die bisher eine Aufreinigung und Charakterisierung beschrieben wurde, ist die mGDH aus *G. suboxydans* IFO 12528. Dieses Enzym wurde mit Triton X-100 aus der Membranfraktion solubilisiert und

über konventionelle Säulenchromatographie bis zur Homogenität aufgereinigt (Ameyama *et al.*, 1981). Die mGDH aus *G. suboxydans* hatte einen V_{\max} von 435 U/mg und einen K_M -Wert für Glukose von 7,7 mM bei einem pH-Optimum von 6 wenn PMS und DCPIP als Elektronenakzeptoren verwendet wurden. Diese mGDH aus *G. suboxydans* wurde auch zur Rekonstitution der Atmungskette durch die Insertion in eine Phospholipiddoppelschicht, die Ubichinon-10 und die terminale Cytochrom-*o*-Oxidase enthielt, eingesetzt (Matsushita *et al.*, 1989c). Unter diesen Bedingungen hatte die mGDH aus *G. suboxydans* einen V_{\max} von 381 U/mg mit dem Substrat Glukose. Insgesamt lagen die für die mGDH aus *G. suboxydans* beschriebenen Ergebnisse in einem ähnlichen Bereich, wie die in dieser Arbeit gemessenen Werte für das Enzym aus *G. oxydans* mit einem V_{\max} von 216 U/mg und einem K_M für Glukose von 5,9 mM.

Die mGDH aus *G. oxydans* wies ein breites Substratspektrum auf. Neben D-Glukose wurden auch mit 2-Deoxy-D-Glukose, Allose, Fucose und Xylose relativ hohe Oxidationsraten bestimmt (> 10 % der Glukose-Oxidationsrate). Ähnlich wurde auch für die mGDHs aus *A. calcoaceticus* und *E. coli* eine Oxidation von 2-Deoxyglukose, Fucose, L-Arabinose, Xylose und Galaktose mit mindestens der Hälfte der Oxidationsrate von Glukose berichtet (Ameyama *et al.*, 1986; Cozier *et al.*, 1999; Dewanti & Duine, 1998). Dagegen oxidierten die mGDHs aus *G. suboxydans* und *P. fluorescens* nur Glukose in hohen Raten (Ameyama *et al.*, 1981; Matsushita *et al.*, 1980, 1989c). Diese signifikanten Unterschiede in dem Substratspektrum zwischen den einzelnen mGDHs beruhen vermutlich auf einer variierenden Aminosäurezusammensetzung des aktiven Zentrums. Es wurde gezeigt, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure bei der mGDH aus *G. oxydans* zu einer veränderten Substratspezifität führen kann. Ein Austausch des konservierten Histidins an Position 787 gegen ein Aparagin änderte die Substratspezifität von Glukose zu Maltose, da das aktive Zentrum besser zugänglich wurde (Cleton-Jansen *et al.*, 1991). Demnach haben nur kleine Änderungen im aktiven Zentrum des Enzyms offensichtlich drastische Effekte auf die Substraterkennung.

4.3.4 Überexpression des *mgdh*-Gens in *G. oxydans* und Auswirkungen auf die Atmungskette

Die Überexpression des *mgdh*-Gens mit Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-ST in *G. oxydans* Δ *hsdR* wurde durch RT-qPCR validiert. Die relative Transkriptabundanz des Gens war in dem Überexpressionsstamm im Vergleich zu dem Kontrollstamm, der das leere Plasmid

pBBR1p452 trug, neunfach erhöht. Diese vermehrte *mgdh*-Expression und die nachfolgende erhöhte Produktion der mGDH führte zu einer Steigerung der Glukonatproduktionsrate von 70 % im Vergleich zu dem Kontrollstamm. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass eine Überproduktion der mGDH in *G. oxydans* 621H zuvor bereits durchgeführt wurde, um die Akkumulation von Glukonat zu steigern und den vollständigen Oxidationsprozess von Glukose zu 5-Ketoglukonat zu beschleunigen (Merfort *et al.*, 2006a). In dieser Studie wurde das *mgdh*-Gen ebenfalls unter Verwendung des Vektors pBBR1MCS-2 exprimiert, wobei der Vektor allerdings keinen spezifischen Promotor für *G. oxydans* enthielt. Daher wurde mit dem modifizierten Stamm nur eine Steigerung der Glukonatproduktionsrate um etwa 11 % erzielt im Vergleich zu den 70 % in dieser Arbeit.

4.3.4.1 Auswirkungen der *mgdh*-Überexpression auf die Glukoseoxidationsraten von ganzen Zellen und Membranfraktionen

Die Auswirkungen der *mgdh*-Überexpression auf die Glukoseoxidationsraten wurden an ganzen Zellen sowie Membranfraktionen untersucht. Dabei zeigte sich, dass die spezifische Aktivität von ruhenden Zellen des Überexpressionsstamms gemessen mit den Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP 2,2-fach höher war im Vergleich zu Zellen des Kontrollstamms. Die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate beider Stämme lieferte ein ähnliches Ergebnis. Die Sauerstoffverbrauchsrate des mGDH-Überproduktionsstamms bei der Oxidation von Glukose war 1,6-fach höher als die des Kontrollstamms. Folglich war davon auszugehen, dass die beobachtete Steigerung der Glukonatproduktion wie erwartet auf einer erhöhten Produktion der mGDH beruhte. Auch mithilfe von entsprechenden Membranfraktionen wurde gezeigt, dass der *mgdh*-Überexpressionsstamm eine höhere mGDH-Aktivität besaß als der Kontrollstamm. Dagegen wiesen die Membranfraktionen des Kontroll- und Überexpressionsstamms gleiche Oxidationsraten mit den Substraten Ethanol und Mannitol auf. So wurde gezeigt, dass die Produktion und Funktion anderer membrangebundener Dehydrogenasen (hier die Alkohol- und die Sorbitol-Dehydrogenase) durch die Überproduktion der mGDH nicht beeinflusst wurde.

Die mGDH-Aktivität des Überproduktionsstamms war höher als die anderer Organismen, die mGDHs besitzen. Mit Membranfraktionen von *E. coli*, *P. fluorescens*, *A. calcoaceticus* und *G. suboxydans* wurden mGDH-Aktivitäten von 241 mU/mg (Matsushita *et al.*, 1987b), 4.100 mU/mg (Matsushita *et al.*, 1980), 10.700 mU/mg (Matsushita *et al.*, 1989b) und 2.860 mU/mg (Matsushita *et al.*, 1989c) gemessen, wenn PMS und DCPIP als

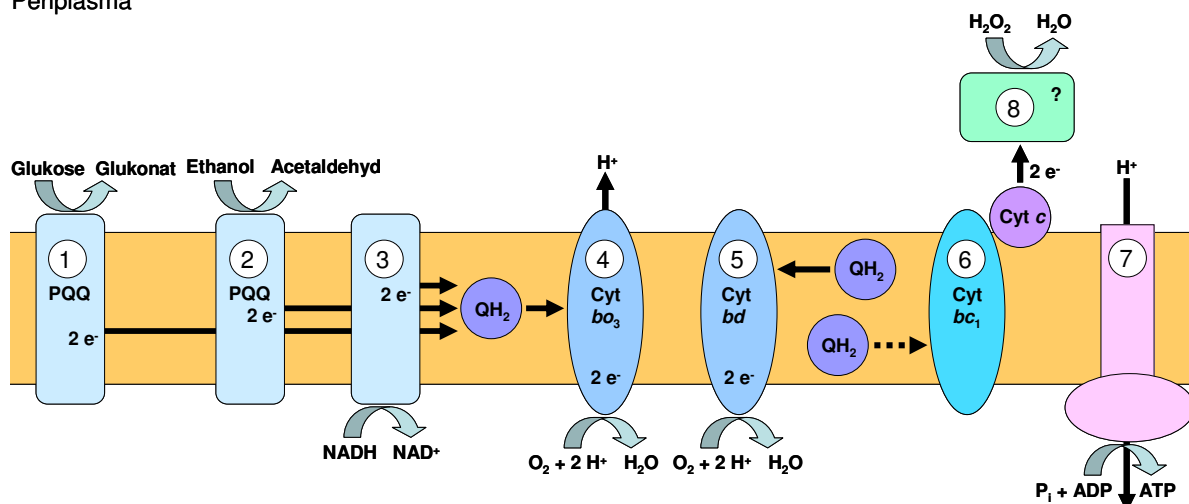
Elektronenakzeptoren verwendet wurden. Für die Membranfraktionen des Kontrollstamms in dieser Arbeit wurden mGDH Aktivitäten von 2500 mU/mg ermittelt, was dem Wildtyp von *G. suboxydans* entspricht (Matsushita *et al.*, 1989c). Dagegen zeigten die Membranfraktionen des *mgdh*-Überexpressionsstamms eine spezifische Aktivität mit Glukose von 13.300 mU/mg. Dies bedeutete eine über fünffache Erhöhung der mGDH-Produktion in diesem Stamm. Die Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktionen des Überexpressionsstamms mit Glukose lag bei $1075 \text{ nmol } \frac{1}{2}\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und war somit etwa dreifach höher als die Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktionen des Kontrollstamms mit $368 \text{ nmol } \frac{1}{2}\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Lediglich in einem Fall wird für *G. suboxydans* eine noch höhere Rate für den Sauerstoffverbrauch mit Glukose angegeben (Matsushita *et al.*, 1989c). Allerdings muss dabei bedacht werden, dass die Werte nicht direkt verglichen werden können, da es sich um unterschiedliche Stämme handelt. Bei Matsushita *et al.* (1989c) wurde Stamm *G. suboxydans* IFO 12528 und in dieser Arbeit wurde *G. oxydans* 621H bzw. dessen Derivat *G. oxydans* Δ *hsdR* analysiert. Dazu waren auch die Wachstumsbedingungen und die Präparation der Membranfraktionen unterschiedlich. Interessanterweise war die Respirationsrate des *G. oxydans* mGDH-Überproduktionsstamms der von *Azotobacter vinelandii* ähnlich, der die höchste bisher in Bakterien gefundene sauerstoffabhängige Respirationsrate aufweist und diese während des aeroben Wachstums zum Schutz der Nitrogenase vor Sauerstoff einsetzt (Ackrell & Jones, 1971).

Um zu überprüfen, ob die Respirationsrate von *G. oxydans* noch weiter gesteigert werden konnte, wurde die Sauerstoffverbrauchsrate von Membranfraktionen des *G. oxydans* mGDH-Überproduktionsstamms in Gegenwart von zwei Substraten, Glukose und Ethanol, gemessen. Dadurch lieferte sowohl die membrangebundene Glukose- als auch die Alkohol-Dehydrogenase Elektronen an die Atmungskette. Es zeigte sich jedoch, dass dies zu keiner weiteren Steigerung der Sauerstoffverbrauchsrate führte. Dagegen konnte die Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktionen des Kontrollstamms durch die Zugabe beider Substrate um den Faktor 2,1 erhöht werden. Dies deutete darauf hin, dass in dem mGDH-Überexpressionsstamm die maximale Elektronentransportkapazität der Atmungskette allein durch die Aktivität der mGDH erreicht war. Offensichtlich wurde der Chinonpool bereits durch die Elektronen, die bei der Oxidation von Glukose abgegeben wurden, gesättigt und die Aktivität der terminalen Chinoloxidasen stellte den limitierenden Faktor dar. Um dies zu veranschaulichen, wird im Folgenden genauer auf die Atmungskette von *G. oxydans* eingegangen.

4.3.4.2 Atmungskette von *G. oxydans*

Die Atmungskette von *G. oxydans* ist schematisch in Abb. 39 dargestellt. Elektronen, die bei der Oxidation von Substraten durch die membrangebundenen Dehydrogenasen frei werden, gelangen über Ubichinon zu den Endoxidasen, die diese auf Sauerstoff übertragen. *G. oxydans* besitzt sowohl eine *bo*₃-Typ Chinoloxidase (Matsushita *et al.*, 1987a) als auch eine Chinoloxidase vom Typ *bd*, die nur bei niedrigen pH-Werten produziert wird und keine Protonen transloziert (Ameyama *et al.*, 1987; Matsushita *et al.*, 1989a). Anhand von Deletionsmutanten wurde kürzlich gezeigt, dass ein Fehlen der *bd*-Typ Chinoloxidase, im Gegensatz zu einem Fehlen der Chinoloxidase vom *bo*₃-Typ, keinen Einfluss auf das Wachstum und die respiratorischen Aktivitäten hat (Richhardt *et al.*, 2013a). Neben den membrangebundenen Dehydrogenasen gibt auch eine Typ-II NADH-Dehydrogenase, die keine Protonen pumpt, Elektronen an die Atmungskette ab (Prust *et al.*, 2005). Zum Aufbau eines Protonengradienten könnte eine von Deppenmeier & Ehrenreich (2009) postulierte Protonen-translozierende NADPH-Transhydrogenase beitragen. Diese setzt das von vielen intrazellulären Dehydrogenasen gebildete NADPH zu NADH um, wobei Protonen gepumpt werden. Das NADH kann wiederum durch die NADH-Dehydrogenase oxidiert werden, die Elektronen an die Atmungskette liefert (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009; Rauch *et al.*, 2010). Der Protonengradient wird durch Komplex V der Atmungskette, eine F₁F_o-Typ ATP-Synthase, zur Generierung von ATP genutzt (Prust *et al.*, 2005). Während Gene, die Cytochrom *c* und eine Ubichinol-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (*bc*₁ Komplex) kodieren in *G. oxydans* vertreten sind, konnten keine Gene gefunden werden, die eine Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV) (Prust *et al.*, 2005) kodieren. Somit ist unklar, wie reduziertes Cytochrom *c* wieder oxidiert wird. Da *G. oxydans* das Gen für eine periplasmatische Cytochrom-*c*-Peroxidase besitzt, die reduziertes Cytochrom *c* nutzen könnte, um Wasserstoffperoxid zu Wasser umzusetzen (Hanke *et al.*, 2012), wäre es denkbar, dass der *bc*₁-Komplex an der Detoxifikation von Wasserstoffperoxid beteiligt ist. In anderen Bakterien handelt es sich bei den Cytochrom-*c*-Peroxidasen jedoch meistens nicht um den alleinigen terminalen Elektronenakzeptor für Cytochrom *c* (Atack & Kelly, 2006). Deshalb ist es möglich, dass *G. oxydans* auch noch einen weiteren, bisher nicht identifizierten Elektronenakzeptor für Cytochrom *c* besitzt. Hanke *et al.* (2012) zeigten, dass der *bc*₁-Komplex trotz Abwesenheit einer Cytochrom-*c*-Oxidase eine Rolle als Elektronentransferkomponente bei Sauerstofflimitierung und niedrigen pH-Werten spielt.

Periplasma



Cytoplasma

Abb. 39: Schematische Darstellung der Atmungskette von *G. oxydans*. Die membrangebundenen Dehydrogenasen, beispielhaft sind hier die PQQ-abhängige Glukose-Dehydrogenase (mGDH) und die PQQ-abhängige Alkohol-Dehydrogenase (ADH) dargestellt, sowie die NADH-Dehydrogenase übertragen Elektronen auf Ubichinon. So entstandenes Ubichinol (QH_2) dient im Anschluss den Chinoloxidasen als Elektronendonator. Die Protonentranslokation ist nicht stöchiometrisch, sondern symbolisch dargestellt. (1) mGDH; (2) ADH; (3) Typ-II NADH-Dehydrogenase; (4) bo_3 -Typ Chinoloxidase; (5) bd -Typ Chinoloxidase; (6) Ubichinol-Cytochrom- c -Oxidoreduktase (bc_1 -Komplex); (7) F_1F_0 -Typ ATP-Synthase; (8) putative Cytochrom- c -Peroxidase.

Aus dem Aufbau der Atmungskette von *G. oxydans* geht hervor, dass eine weitere Steigerung der Respirationsraten bei einer Überproduktion der mGDH nur durch eine zusätzliche Überproduktion der Endoxidasen erreicht werden könnte. Die Schlüsselkomponente stellt dabei vermutlich die Chinoloxidase vom Typ bo_3 dar, die für den Stoffwechsel wichtiger zu sein scheint, als die bd -Typ Chinoloxidase (Richardt *et al.*, 2013a). Außerdem müsste geprüft werden, ob Ubichinon in ausreichender Menge in der Membran von *G. oxydans* vorliegt, um einen gesteigerten Elektronentransport von den membrangebundenen Dehydrogenasen zu den Endoxidasen zu gewährleisten. Eventuell müssten eine Überexpression der Synthesegene für diesen Elektronenüberträger in Erwägung gezogen werden, um die Kapazität der Atmungskette insgesamt zu erhöhen.

4.3.5 Produktion von Glukonaten durch *G. oxydans* und deren Verwendung

Gluconobacter spp. werden häufig zur industriellen Produktion von D-Glukonsäure sowie 5- und 2-Ketoglukonsäure eingesetzt (Adachi *et al.*, 2003). Diese und andere Carbonsäuren werden in der Nahrungsmittel-, Textil- und Pharmaindustrie verwendet (Rabenhorst *et al.*,

2001). In den industriellen Prozessen wird dabei meist die von Glukonat und dessen Derivaten bekannte Fähigkeit, mit di- und trivalenten Metallionen Chelatkomplexe zu bilden, genutzt (Dvorkovitz & Hawley, 1952; Prescott *et al.*, 1953). Glukonate werden außerdem in der Produktion von wasserunlöslichen Farbstoffen, als Backtriebmittel in Backpulvern und als Katalysator in der Textilindustrie verwendet (Mattey, 1992; Prescott *et al.*, 1953; Sawyer, 1964). Für Anwendungen in der Nahrungsmittel- und Pharmaindustrie sind Glukonate aufgrund ihrer hohen Löslichkeit sowie der Tatsache, dass sie ungiftig und selbst bei der Sterilisierung stabil sind, besonders geeignet (siehe Sawyer 1964 für einen ausführlichen Überblick). In Anbetracht der weitreichenden industriellen Anwendungen von Glukonaten, ist die Produktion großer Glukonatmengen von besonderer biotechnologischer Bedeutung. Mit einer Produktion von etwa 100.000 Tonnen pro Jahr ist D-Glukonsäure eine der wichtigsten zehn organischen Chemikalien, die aus Zucker produziert werden (Lichtenthaler, 2006). Der in dieser Arbeit vorgestellte *G. oxydans*-Stamm produziert Glukonat mit einer 70 % höheren Rate als der Wildtyp und ist potentiell nützlich für die Produktion von Glukonat mit ganzen Zellen. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass PQQ-abhängige mGDHs als industrielle Biosensoren sehr attraktiv sind und momentan die Hauptenzyme in Glukose-Sensoren zur Selbstüberwachung des Glukosespiegels im Blut sind (D'Costa *et al.*, 1986; Igarashi *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 1993). Deshalb könnte ein mGDH-Überproduktionsstamm, wie er in dieser Arbeit beschrieben wurde, in der Zukunft eine geeignete Quelle zur Produktion der Biosensoren sein und die Sensitivität von Glukose-Erfassungssystemen verbessern.

4.4 Gox1857 aus *G. oxydans* – ein Enzym, das die Produktion von Vitamin C vereinfacht?

Nach der erfolgreichen Überproduktion und Aufreinigung der membrangebundenen Glukose-Dehydrogenase aus *G. oxydans*, sollte auch das Protein Gox1857 homolog als Strep-Tag-Fusionsprotein überproduziert werden. Das Protein wurde bereits anhand von Deletionsmutanten als membrangebundene PQQ-abhängige Inositol-Dehydrogenase identifiziert (Hölscher *et al.*, 2007). In der beschriebenen Studie wurde das Gen *gox1857* im Genom von *G. oxydans* ATCC 621H durch eine Antibiotika-Resistenzkassette unterbrochen und anschließend das Wachstum von Mutante und Wildtyp sowie die Dehydrogenase-Aktivität in entsprechenden Rohextrakten mit verschiedenen Zuckern und Zuckeralkoholen verglichen. Dabei wurde für die beiden Stämme mit allen getesteten Substraten mit der

Ausnahme von *myo*-Inositol kein Unterschied im Wachstum festgestellt. Während der Wildtyp ein schwaches Wachstum auf *myo*-Inositol zeigte, wuchs die Mutante auf diesem Substrat nicht. Untersuchungen der Dehydrogenase-Aktivität in Rohextrakten zeigten ähnliches. Auch hier konnte nur mit dem Wildtypstamm eine Aktivität mit *myo*-Inositol sowie auch mit *allo*- und *muco*-Inositol gemessen werden, während die Dehydrogenase-Aktivitäten mit anderen Substraten bei Wildtyp und Mutante gleich waren. Da der größte Teil der *myo*-Inositol Dehydrogenase-Aktivität in der Membran zu finden war, wurde außerdem gezeigt, dass es sich bei Gox1857 um ein Membranprotein handelt. Die partielle Aufreinigung einer membrangebundenen *myo*-Inositol-Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621 über Säulenchromatographie wurde in der Vergangenheit beschrieben (Criddle *et al.*, 1974, 1977). Daneben existieren allerdings auch Patente, die Hinweise darauf geben, dass es sich bei Gox1857 um eine besondere Sorboson-Dehydrogenase handeln könnte, die L-Sorboson direkt zu Vitamin C umsetzen kann (Berry *et al.*, 2010, 2012; Beuzelin-Ollivier *et al.*, 2012). Bei der Herstellung von Vitamin C aus Sorbitol mithilfe von Mikroorganismen wie *G. oxydans* sind mehrere Enzyme involviert (Saito *et al.*, 1997). In einem ersten Schritt muss D-Sorbitol durch eine Sorbitol-Dehydrogenase zu L-Sorbose umgesetzt werden, die dann wiederum durch eine Sorbose-Dehydrogenase zu L-Sorboson oxidiert wird. Eine Sorboson-Dehydrogenase setzt dann L-Sorboson zu 2-Keto-L-Gulonsäure um, aus der durch chemische Reaktionen L-Ascorbinsäure (Vitamin C) hergestellt wird (siehe Abb. 40 A). Die Sorboson-Dehydrogenase aus *Gluconobacter melanogenus* UV10 (auch als *Gluconobacter oxydans* UV10 bezeichnet) wurde bereits isoliert und charakterisiert (Hoshino *et al.*, 1991). Es handelt sich um ein cytosolisches, NAD(P)-abhängiges Enzym mit einer breiten Substratspezifität für verschiedene Aldehyde, wobei die höchste spezifische Aktivität mit L-Sorboson gefunden wurde. Saito *et al.* (1997) transformierten *G. oxydans* G624, einen Stamm, der L-Sorbose akkumuliert, mit einem Vektor, der die Gene für die L-Sorbose- und L-Sorboson-Dehydrogenase aus *G. oxydans* T100 trug. Mit dem rekombinanten Stamm konnten durch einfache Fermentation große Mengen 2-Keto-L-Gulonsäure hergestellt werden. Eine lösliche, PQQ-abhängige L-Sorboson-Dehydrogenase (SNDH1), sowie zwei Isoformen des Enzyms (SNDH2 und SNDH3) aus *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025 (früher irrtümlicherweise als *Gluconobacter oxydans* bezeichnet), die L-Sorboson sowohl zu 2-Keto-L-Gulonsäure als auch zu L-Ascorbinsäure umsetzen können, wurden bereits isoliert und charakterisiert (Miyazaki *et al.*, 2006). Die Autoren erklärten die Entstehung der beiden unterschiedlichen Produkte mit der Tautomerisierung von L-Sorboson und vermuteten, dass 2-Keto-L-Gulonsäure entsteht, wenn L-Sorboson in der Pyranoseform (2,6-Lactonform) vorliegt und

L-Ascorbinsäure produziert wird, wenn L-Sorboson die Furanoseform (1,4-Lactonform) einnimmt.

Durch eine Sorboson-Dehydrogenase, die in der Lage ist, L-Sorboson direkt in einem Schritt zu Vitamin C umzusetzen, könnte in Zukunft eine Synthesestufe in der Herstellung von Vitamin C eingespart und der aufwändige Prozess vereinfacht werden (siehe Abb. 40 B). Entsprechend groß ist das Interesse daran, die Funktion von Gox1857 als eine für diesen Zweck potentiell geeignete Sorboson-Dehydrogenase aufzuklären. Die vollständige Aufreinigung des Enzyms aus *G. oxydans* stellt dabei einen wichtigen Schritt dar.

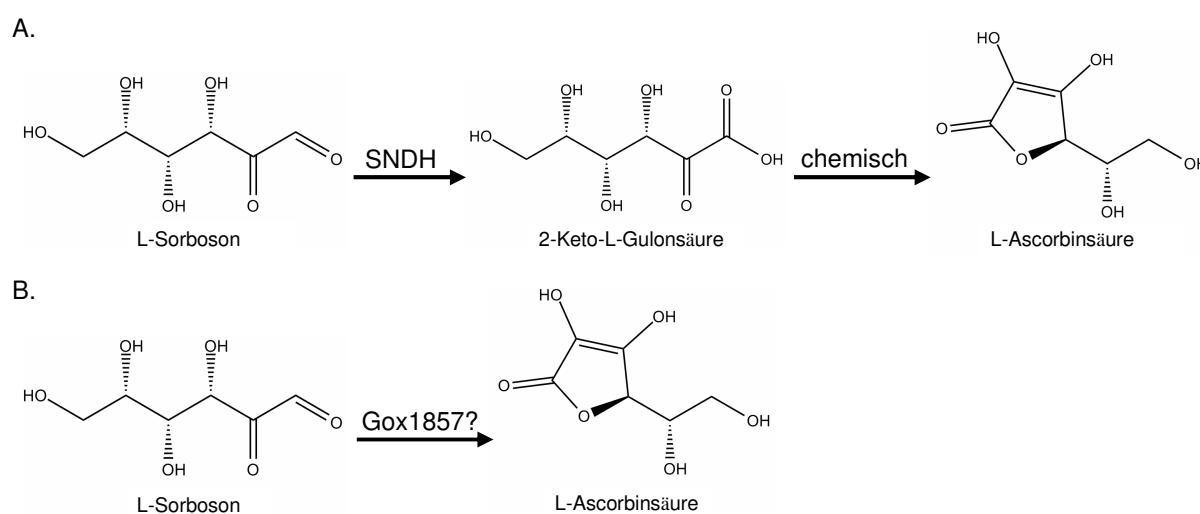


Abb. 40: Umsetzung von L-Sorboson zu L-Ascorbinsäure (Vitamin C). (A) Umsetzung von L-Sorboson zu 2-Keto-L-Gulonsäure durch eine Sorboson-Dehydrogenase (SNDH) und anschließende chemische Umsetzung von 2-Keto-L-Gulonsäure zu L-Ascorbinsäure. (B) Mögliche direkte Umsetzung von L-Sorboson zu L-Ascorbinsäure durch Gox1857.

4.4.1 Überproduktion von Gox1857 in *G. oxydans*

In dieser Arbeit sollte das Gen *gox1857* unter Verwendung des Vektors pBBR1p452-ST in *G. oxydans* Δ *hsdR* überexprimiert und das Strep-Tag-Fusionsprotein über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Zunächst wurde die spezifische Aktivität von Membranfraktionen des Überexpressionsstamms und eines Kontrollstamms, der das leere Plasmid pBBR1p452 trug, mit *myo*-Inositol und Sorboson gemessen. Wie auch bei Hölscher *et al.* (2007) wurde die höchste Dehydrogenase-Aktivität mit *myo*-Inositol unter Verwendung der Elektronenakzeptoren PMS und DCPIP bei einem pH-Wert von 8,75 ermittelt. Die spezifische Aktivität der Membranfraktionen des Überexpressionsstamms lag dabei allerdings mit 528 mU/mg nur leicht über der der Membranfraktionen des Kontrollstamms mit

415 mU/mg und beide Werte lagen im Bereich der spezifischen Aktivität, die von Hölscher *et al.* (2007) für die Membranfraktionen des Wildtyps *G. oxydans* 621H angegeben wurde (600 mU/mg). In derselben Studie wurde auch beschrieben, dass die Expression der Inositol-Dehydrogenase offenbar reguliert wird. Die in Rohextrakten des *G. oxydans* 621H Wildtypstamms messbare *myo*-Inositol-Dehydrogenase-Aktivität war von dem Substrat abhängig, mit dem die Kultur angezogen wurde (Hölscher *et al.*, 2007). Dabei war die Aktivität am höchsten, wenn die Kultur in einem Komplexmedium mit D-Sorbitol angezogen wurde. Bei dem Wachstum mit D-Mannitol betrug die Aktivität im Vergleich nur 27 % und bei dem Wachstum mit D-Glukose war kaum eine Aktivität messbar. Das Wachstum auf *myo*-Inositol allein war gering, jedoch war die *myo*-Inositol-Dehydrogenase-Aktivität in diesem Fall noch höher, als bei dem Wachstum auf D-Sorbitol. Wurde *myo*-Inositol zusätzlich zu den anderen Substraten in das Medium gegeben, konnte kein Effekt auf die *myo*-Inositol-Dehydrogenase-Aktivität festgestellt werden. Eine Abhängigkeit der Expression des Gens *gox1857* von der Kohlenstoffquelle, auf der *G. oxydans* angezogen wurde, wurde auch anhand von Transkriptionsstudien nachgewiesen (Hoffmeister, 2006). Bei dem Wachstum auf Mannitol und Sorbitol wurde das Gen 5,6-fach bzw. 3,2-fach stärker transkribiert als bei dem Wachstum auf Glukose. Es wurde außerdem gezeigt, dass die Expression des Gens bei einem pH-Wert von 5,5, stärker war als bei einem pH-Wert von 3,5 (11,3-fach erhöht). In dieser Arbeit wurde *G. oxydans* in Hefe-Mannitol-Medium angezogen. Es war jedoch nicht davon auszugehen, dass dies einen Einfluss auf die Überproduktion des rekombinanten Proteins Gox1857 hatte, da die Expression des Gens *gox1857* hier Plasmid-basiert unter einem konstitutiven Promotor erfolgte. Die Produktion des Strep-Tag-Fusionsproteins wurde dadurch bestätigt, dass Gox1857 über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie isoliert werden konnte. Unklar ist noch, warum die spezifische Aktivität der Membranfraktionen des Überexpressionsstamms mit *myo*-Inositol nicht viel höher war, als die der Membranfraktionen des Kontrollstamms.

Die Messungen mit Sorboson waren aufgrund der Reaktion des Substrats ohne die Zugabe von Enzym als relativ ungenau einzustufen und es konnte keine Abnahme der Absorption des Elektronenakzeptors Ferricyanid gemessen werden, die über die Basisabnahme hinausging. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in den Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktionen wieder. Während die Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktion von *G. oxydans* Δ *hsdR* mit Plasmid pBBR1p452-*gox1857*-ST mit dem Substrat *myo*-Inositol (225 nmol $\frac{1}{2}$ O₂ min⁻¹ mg⁻¹) leicht erhöht war im Vergleich zum Kontrollstamm

(191 nmol $\frac{1}{2}$ O₂ min⁻¹ mg⁻¹), konnte mit dem Substrat L-Sorboson kein Sauerstoffverbrauch durch die Membranfraktionen gemessen werden. Da eine mögliche Aktivität des Enzyms mit Sorboson durch die chemische Reaktivität des Substrats überdeckt worden sein könnte, sollte die Aufreinigung von Gox1857 eine genauere Untersuchung des Enzyms erlauben.

4.4.2 Aufreinigung von Gox1857

Da sich für unterschiedliche Membranproteine auch unterschiedliche Detergenzien zu deren Solubilisierung eignen, wurden für Gox1857 verschiedene, nicht-ionische Detergenzien getestet. Triton X-100, n-Dodecyl- β -D-Maltosid (DDM), n-Octyl- β -D-Glukopyranosid (OG) und Brij-35 wurden jeweils in einer Konzentration von 1 % eingesetzt. Das Detergenz musste einerseits stark genug sein, um das Protein aus der Membran zu lösen, andererseits aber auch mild genug sein, um die native Faltung und Aktivität dabei zu erhalten. Eine wichtige Rolle bei der Detergenzienwahl spielten auch die kritische Mizellenbildungskonzentration (CMC) und die Mizellengröße, die mit der Größe des apolaren Teils des Detergenz ab- bzw. zunehmen. (Helenius *et al.*, 1979). Detergenzien mit einem hohen CMC-Wert können durch Verdünnung leichter wieder entfernt werden, als Detergenzien mit einem niedrigen CMC-Wert. Während die CMC-Werte für Brij-35 (0,09 mM), DDM (0,15 – 0,19 mM) und Triton X-100 (0,3 mM), sehr niedrig sind, ist der CMC-Wert für OG (25 - 30 mM) eher hoch. Es stellte sich heraus, dass Brij-35 gänzlich ungeeignet war, um Gox1857 zu solubilisieren und auch unter Verwendung von OG konnte das Protein nicht gereinigt werden. Eine Aufreinigung von Gox1857 war dagegen mit Triton X-100 und DDM möglich. Die Gesamtausbeute an Protein war mit 20 – 45 μ g aus 400 mL Kultur jedoch gering und konnte durch den Einsatz eines höheren Kulturvolumens von 2,5 L auf 180 μ g gesteigert werden. Die Reinheit des Proteins wurde durch eine SDS-PAGE und einen Western-Blot bestätigt. Es war jeweils eine klare Bande auf der zu erwartenden Höhe (87 kDa) in dem Gel und auf dem Blot sichtbar. Die ermittelte spezifische Aktivität des gereinigten Proteins mit *myo*-Inositol betrug je nach Präparation zwischen 500 und 5.000 mU/mg. Die spezifische Aktivität der von Criddle *et al.* (1977) partiell gereinigten membrangebundenen Inositol-Dehydrogenase aus *G. oxydans* 621 lag mit 524 mU/mg in einem ähnlichen Bereich. Da das Protein in diesem Fall nicht bis zur Homogenität gereinigt vorlag und auch die Bedingungen, unter denen die Aktivität gemessen wurde, nicht identisch waren, ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Aber dennoch zeigt dies, dass es sich bei Gox1857 der Aktivität entsprechend vermutlich um eine *myo*-Inositol-Dehydrogenase handelt. Mit verschiedenen Zuckern, Zuckeralkoholen und zyklischen Diolen konnte keine gesteigerte Aktivität des gereinigten Proteins Gox1857

festgestellt werden. Auch mit Sorbosen, das ein vermutetes Substrat von Gox1857 war, konnte keine Aktivität gemessen werden.

4.4.3 Auswirkungen des eingesetzten Detergenz und Rekonstitutionsversuche zur Steigerung der Aktivität von Gox1857

Hölscher *et al.* (2007) stellten fest, dass die Inositol-Dehydrogenase durch die Zugabe von EDTA inaktiviert wurde und gingen deshalb davon aus, dass es sich um ein PQQ-abhängiges Enzym handelt. PQQ-abhängige Enzyme benötigen divalente Metallionen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} , die an der Bindung von PQQ im aktiven Zentrum beteiligt sind (Goodwin & Anthony, 1998). Eine Behandlung dieser Enzyme mit EDTA, das Komplexe mit Kationen bildet, kann durch den Entzug der Ionen zu einem Verlust der prosthetischen Gruppe führen. Dies hängt jedoch von der Stärke der Bindung zwischen PQQ und dem Enzym ab. So kann PQQ beispielsweise aus der Glukose-Dehydrogenase von *Pseudomonas aeruginosa* durch Dialyse gegen EDTA-haltige Puffer herausgelöst werden (Duine *et al.*, 1983), während die prosthetische Gruppe aus der Glukose-Dehydrogenase von *Acinetobacter calcoaceticus* nicht durch eine Behandlung mit EDTA entfernt werden kann (Hauge, 1964). In diesem Fall konnte die Apoform des Enzyms nur durch einen niedrigen pH-Wert, hohe Salzkonzentrationen oder Hitzebehandlung erhalten werden (Duine *et al.*, 1979; Geiger & Görisch, 1989; Hauge, 1964). Um sicher zu stellen, dass die relativ geringe Aktivität von Gox1857 in dieser Arbeit nicht auf einen Verlust des PQQs infolge des Aufreinigungsprozesses zurückzuführen war, wurde eine Rekonstitution des Enzyms mit PQQ unter Zugabe von CaCl_2 oder MgSO_4 versucht. Die spezifische Aktivität des Enzyms Gox1857 mit dem Substrat *myo*-Inositol konnte durch die Zugabe von PQQ allerdings nicht gesteigert werden. Deshalb enthielt das gereinigte Enzym die prosthetische Gruppe entweder bereits, oder aber es gab möglicherweise noch einen anderen Faktor, der für die Aktivität von Gox1857 eine wichtige Rolle spielte.

Tests an Membranfraktionen zeigten, dass die zuvor gemessene Aktivität mit *myo*-Inositol nach der Zugabe von Detergenz (Triton X-100 oder DDM) bereits nach kurzer Zeit stark abnahm. Entsprechend war davon auszugehen, dass das für die Oxidation von *myo*-Inositol verantwortliche Enzym in der Membran durch die Detergenzien inaktiviert wurde. Detergenzien können Membranproteine bekanntermaßen destabilisieren, indem notwendige Kontakte des Proteins zu Komponenten in der nativen Membranumgebung gestört werden. Dies könnte die recht geringe Aktivität des gereinigten Proteins Gox1857 erklären. Deshalb wurde versucht, das Protein während der Solubilisierung durch die Zugabe von 1 – 2 %

Asolectin zu stabilisieren. Asolectin besteht aus einer Mischung von Phospholipiden aus Sojabohnen und wurde in verschiedenen Studien zur Rekonstitution von Membranproteinen eingesetzt (Cao *et al.*, 2001; Hicks & Krulwich, 1990; Sukharev *et al.*, 1993). Die Zugabe von Asolectin führte jedoch nicht zu einer Steigerung der Aktivität. Möglich wäre, dass das Asolectin nicht die für ein bakterielles Protein notwendigen Lipide enthielt. Daher wurde im Weiteren getestet, ob das gereinigte Membranprotein mit dem Extrakt von polaren Lipiden aus *E. coli* rekonstituiert werden konnte. Doch auch die Zugabe dieser Lipide führte zu keiner Steigerung der Aktivität von Gox1857 mit *myo*-Inositol oder Sorboson. Hierfür kommen verschiedene Erklärungen in Frage. Entweder enthielt auch der Lipidextrakt aus *E. coli* nicht die von Gox1857 benötigten Komponenten, oder aber eine Rekonstitution durch die einfache Zugabe der Lipide war nicht möglich und es müsste stattdessen eine Integration des Proteins in vollständige, künstliche Liposomen erfolgen (Geertsma *et al.*, 2008). Andere Möglichkeiten sind, dass die Aktivität der Dehydrogenase generell niedrig ist oder dass *myo*-Inositol nicht das Hauptsubstrat des Enzyms ist und die Aktivität mit einem anderen, hier nicht identifizierten Substrat, höher wäre. Eventuell setzt Gox1857 sogar Sorboson in niedrigen Raten um, was in den Tests aber durch die Eigenreaktivität von Sorboson überdeckt wurde. Die spezifische Aktivität von Sorboson-Dehydrogenasen fällt zum Teil relativ gering aus. Für die NAD(P)-abhängige L-Sorboson-Dehydrogenase aus *Gluconobacter melanogenus* UV10 (*Gluconobacter oxydans* UV10) wird z. B. eine spezifische Aktivität von 1,7 U/mg angegeben (Hoshino *et al.*, 1991).

Die Ergebnisse zeigen, dass die membrangebundene Dehydrogenase Gox1857 unter Verwendung des in dieser Arbeit hergestellten Expressionsvektors pBBR1p452-ST in *G. oxydans* Δ hdsR überproduziert und über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie bis zur Homogenität aufgereinigt werden konnte. Das gereinigte Protein wies eine relativ geringe Dehydrogenase-Aktivität mit *myo*-Inositol auf, wogegen keine Aktivität mit dem Substrat L-Sorboson nachzuweisen war. Unterschiedliche Gründe für die niedrige Aktivität wurden diskutiert. Da an Membranfraktionen ein negativer Effekt von Detergenzien auf die Oxidation von *myo*-Inositol nachgewiesen wurde und die einfache Zugabe von Lipiden diesen nicht wieder aufheben konnte, wäre die Integration des gereinigten Proteins Gox1857 in künstliche Liposomen ein möglicher Schritt, um höhere Aktivitäten des Enzyms zu erreichen und eine weitere Charakterisierung zu ermöglichen. Die Vermutung, dass es sich bei Gox1857 um eine L-Sorboson-Dehydrogenase handelt, die L-Sorboson direkt zu Vitamin C umsetzen kann, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Aufgrund der genannten Probleme bei der

Messung der Aktivität mit diesem Substrat konnte diese Möglichkeit jedoch auch nicht ganz ausgeschlossen werden. Während L-Sorbose-Dehydrogenasen in der Produktion von Vitamin C eingesetzt werden, werden Inositol-Dehydrogenasen z. B. in enzymatischen Tests zur Diagnose von Diabetes in frühen Stadien verwendet (Yamakoshi *et al.*, 2003). Außerdem sind Inositol-Dehydrogenasen an der Synthese von D-*chiro*-Inositol, das als Medikament zur Behandlung von Diabetes Typ 2 und dem polyzystischen Ovarialsyndrom in Frage kommt (Yoshida *et al.*, 2006), sowie an der Herstellung von Aminoglykosid-Antibiotika (Walker, 1995) beteiligt.

4.5 *Gluconacetobacter diazotrophicus* als Organismus der Biotechnologie

4.5.1 *Ga. diazotrophicus* - ein Endophyt, der das Pflanzenwachstum fördert

Gluconacetobacter diazotrophicus wurde erstmals aus Zuckerrohr isoliert (Cavalcante & Dobreiner, 1988) und tritt in einer Reihe weiterer Nutzpflanzen wie Ananas (Tapia-Hernández *et al.*, 2000), Kaffee (Jimenez-Salgado *et al.*, 1997), Reis (Muthukumarasamy *et al.*, 2005) und Fingerhirse (Loganathan *et al.*, 1999) auf. Auch aus Karotten, Rote Beeten und Rettich konnte *Ga. diazotrophicus* isoliert werden (Madhaiyan *et al.*, 2004). Aufgrund seiner Fähigkeit zur Fixierung von molekularem Stickstoff besitzt der Endophyt eine besondere Bedeutung für biotechnologische Anwendungen in der Landwirtschaft. Dabei spielen auch weitere wichtige Eigenschaften von *Ga. diazotrophicus*, die das Wachstum von Pflanzen fördern, eine wichtige Rolle. Der Organismus produziert die Phytohormone Indol-3-Essigsäure, Gibberellin A₁ und A₃ (Bastián *et al.*, 1998; Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993), sowie ein Bacteriocin, das das Wachstum des Zuckerrohr-pathogenen Bakteriums *Xanthomonas albilineans* inhibiert (Blanco *et al.*, 2005; Piñón *et al.*, 2002). Außerdem fördert *Ga. diazotrophicus* die Löslichkeit von Nährstoffen wie Phosphat und Zink-Ionen (Maheshkumar *et al.*, 1999; Saravanan *et al.*, 2007). Eine Kolonisierung von Nutzpflanzen mit pflanzenwachstumsfördernden Bakterien wie *Ga. diazotrophicus* wird als Maßnahme in Betracht gezogen, um den Einsatz künstlicher Stickstoff-Dünger zu vermeiden oder zu reduzieren (Cocking *et al.*, 2005; Muthukumarasamy *et al.*, 2006; Pedraza, 2008). Untersuchungen zur Inokulierung und Kolonisierung verschiedener Nutzpflanzen wie

Zuckerrohr, Reis, Sorghumhirse, Weizen und Tomaten mit *Ga. diazotrophicus* wurden bereits durchgeführt (Botta *et al.*, 2013; James *et al.*, 1994, 2001; Luna *et al.*, 2010; Muñoz-Rojas & Caballero-Mellado, 2003; Rouws *et al.*, 2010). Die Interaktionen zwischen Pflanze und Bakterium sind dabei komplex. Zur Aufklärung von biologischen Prozessen, die bei der Interaktion eine Rolle spielen, wurden in einem proteomischen Ansatz Proteine gesucht, die in *Ga. diazotrophicus* differenziell in der An- oder Abwesenheit von Zuckerrohrpflanzen synthetisiert werden (dos Santos *et al.*, 2010). Die in dieser Studie identifizierten Proteine waren in den Kohlenhydrat- und Energiemetabolismus, in Faltungs-, Sortierungs- und Abbauprozesse sowie in die Regulation von Transkription und Translation involviert. In einer anderen Studie wurden im Rahmen einer quantitative Proteomanalyse weitere Proteine in *Ga. diazotrophicus* und besiedelten Zuckerrohrpflanzen identifiziert, die einen Einblick in die aktivierten Signalkaskaden im frühen Stadium der Interaktion von *Ga. diazotrophicus* und Zuckerrohr geben (Lery *et al.*, 2011). Außerdem wurde gezeigt, dass offensichtlich die Produktion von Exopolysacchariden wichtig für die Bildung von Biofilmen und die Kolonisierung von Pflanzen durch *Ga. diazotrophicus* ist (Meneses *et al.*, 2011).

4.5.2 Produktion und Charakterisierung von Proteinen aus

Ga. diazotrophicus

Die Charakterisierung von Enzymen, die z.B. an dem positiven Effekt von *Ga. diazotrophicus* auf das Pflanzenwachstum beteiligt sind, wäre ein wichtiger Schritt, um diesen Organismus biotechnologisch besser nutzen zu können. Dazu werden geeignete Systeme für die homologe Produktion und Aufreinigung von Proteinen aus *Ga. diazotrophicus* benötigt. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, das in *G. oxydans* etablierte Expressionssystem auch auf *Ga. diazotrophicus* zu übertragen. Bisher erfolgte die funktionale Analyse von Genen aus *Ga. diazotrophicus* häufig über entsprechende Insertionsmutanten, ohne dass die Proteine isoliert wurden (Alquéres *et al.*, 2013; Intorne *et al.*, 2009; Meneses *et al.*, 2011; Perlova *et al.*, 2002, 2003; Rouws *et al.*, 2008). Es sind nur wenige Fälle bekannt, in denen *Ga. diazotrophicus* Enzyme aus dem Organismus selbst isoliert und charakterisiert wurden. Dazu gehören die membrangebundene PQQ-abhängige Alkohol-Dehydrogenase (Gómez-Manzo *et al.*, 2008, 2010b, 2012) und die ebenfalls membrangebundene und PQQ-abhängige Aldehyd-Dehydrogenase (Gómez-Manzo *et al.*, 2010a), die über konventionelle Säulenchromatographie aus den Membranfraktionen aufgereinigt wurden. Die Levan-Sucrase (LsdA) konnte durch nicht-denaturierende Umkehrphasen-HPLC aus dem Überstand von *Ga. diazotrophicus* SRT4 Kulturen gereinigt

und nach der Kristallisierung durch Röntgenstrukturanalyse untersucht werden (Martínez-Fleites *et al.*, 2004, 2005). Dabei wurde auch überprüft, welchen Einfluss der Austausch konservierter Aminosäurereste auf die Aktivität hat (Martínez-Fleites *et al.*, 2005). Das Gen für die Exo-Levanase (LsdB) aus *Ga. diazotrophicus* wurde unter dem T7 RNA-Polymerase-Promotor des Vektors pET3d in *E. coli* exprimiert und die Freisetzung von Fruktose bei Inkubation des Zellextrakts mit Saccharose wurde beobachtet (Menéndez *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurde das Gen *gdi_3764*, das eine putative L-Sorbose-Dehydrogenase kodiert, ausgewählt und homolog in *Ga. diazotrophicus* exprimiert. Da für das Protein Gdi_3764 bioinformatisch eine Transmembrandomäne vorhergesagt wurde, wurde der Vektor pBBR1p452-ST mit dem moderaten Promotor, der zuvor erfolgreich für die Produktion von Strep-Tag-fusionierten Membranproteinen in *G. oxydans* eingesetzt wurde, für die Expression des Gens verwendet. Zusätzlich wurde auch der einfache Strep-Tag II für die Aufreinigung des Fusionsproteins über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie durch den doppelten Strep-Tag (One-Strep-Tag/Twin-Strep-Tag) ausgetauscht, um die Ausbeute an gereinigtem Protein zu verbessern.

4.5.3 Verwendung von *Ga. diazotrophicus* und seinen Enzymen

Einige Enzyme aus *Ga. diazotrophicus* wurden in eukaryotischen Organismen überproduziert, um das biotechnologische Potential zu nutzen. So wurden die Levansucrase und die Exo-Levanase eingesetzt, um aus Saccharose industriell wichtiges Levan, Fruktooligosaccharide und Fruktose zu produzieren. Das die Levansucrase (LsdA) kodierende Gen aus *Ga. diazotrophicus* wurde in Tabakpflanzen konstitutiv exprimiert und die transgenen Pflanzen akkumulierten größere Mengen von Levan (Banguela *et al.*, 2011). Der Teil des reifen Proteins (ohne Signalpeptid) wurde dazu mit dem N-terminalen Pre-Pro-Peptid der Sucrose-Sucrose-1-Fruktosyltransferase aus der Zwiebel fusioniert, das die vakuoläre Lokalisierung bewirkte, und zur Isolierung des Proteins aus Blattextrakten diente ein C-terminaler Hexahistidin-Tag. Auch eine Expression des *Ga. diazotrophicus* SRT4 Levansucrase-Gens in der Hefe *Pichia pastoris* war möglich und führte zur Produktion von Fruktooligosacchariden (Trujillo *et al.*, 2001). Die DNA-Sequenz, die den Vorläufer von LsdA ohne die ersten 57 Aminosäuren kodiert, wurde hier mit der *pho 1*-Signalsequenz fusioniert und Plasmid-basiert unter dem induzierbaren Promotor der Alkohol-Oxidase 1 (*AOX1*) aus *Pichia pastoris* exprimiert. Die Glykosylierung des rekombinanten Proteins in *Pichia pastoris* hatte dabei keinen Einfluss auf die Aktivität. Ähnlich erfolgte auch die

Produktion der Exo-Levanase (LsdB) aus *Ga. diazotrophicus* SRT4 in *Pichia pastoris* (Menéndez *et al.*, 2004). Das Gen wurde unter dem Methanol-induzierbaren *AOXI*-Promotor oder dem konstitutiven Promotor der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAP*) exprimiert und die effiziente Sekretion des Proteins in das Medium wurde durch das Alpha-Faktor Signalpeptid aus *Saccharomyces cerevisiae* bewirkt. Eine Aufreinigung der aktiven Exo-Levanase aus dem Kulturüberstand wurde durch einen C-terminalen Hexahistidin-Tag möglich und es zeigte sich, dass das Protein nicht durch Glykosylierung posttranslational modifiziert wurde. Dennoch wäre die homologe Produktion der biotechnologisch interessanten Enzyme aus *Ga. diazotrophicus* von Vorteil, da so ein Austausch von Signalpeptiden unnötig würde und ausgeschlossen wird, dass es zu unvorhergesehenen posttranslationalen Modifikationen kommt. Hierzu könnte das für *G. oxydans* entwickelte Expressionssystem verwendet werden.

Die Vektor-basierte heterologe Expression eines Gens in *Ga. diazotrophicus* erfolgte bereits in einem Versuch, den Organismus durch genetische Modifikation für die Anwendung in der Landwirtschaft zu optimieren. Durch das Einbringen des Gens für das Toxin Cry1Ac aus *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* unter Verwendung des Shuttle-Vektors pKT230 in *Ga. diazotrophicus* sollten mit dem Bakterium besiedelte Zuckerrohrpflanzen vor dem Fraß durch Insektenlarven aus der Ordnung Lepidoptera geschützt werden (Subashini *et al.*, 2011). Das entsprechende Protein wurde in dem rekombinanten *Ga. diazotrophicus*-Stamm produziert, ohne die Aktivität der für die Stickstofffixierung wichtigen Nitrogenase zu beeinflussen und die Toxizität auf Larven von *Eldana saccharina* im ersten Raupenstadium wurde bestätigt.

4.6 Die putative L-Sorboson-Dehydrogenase Gdi_3764 aus *Ga. diazotrophicus*

4.6.1 Transkriptabundanz des Gens *gdi_3764* in *Ga. diazotrophicus*

Zunächst wurde durch RT-qPCR überprüft, ob das Gen *gdi_3764* in *Ga. diazotrophicus* mit dem Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-ST und dem Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-OneST wie erwartet überexprimiert wurde. Dabei zeigte sich, dass die Transkriptabundanz dieses Gens in *Ga. diazotrophicus* mit den *gdi_3764*-Überexpressionsvektoren 91- bis 97-fach höher war als

die des Referenzgens *gdi_2968*, das das ribosomale Protein L23 kodiert. In dem Wildtyp-Stamm war dagegen der Expressionslevel des Referenzgens höher als der des Gens *gdi_3764*. Die relative Menge an mRNA des Gens *gdi_3764* (bezogen auf das Referenzgen) in den beiden Überexpressionsstämmen war im Vergleich zu dem Wildtyp entsprechend 8230- bis 8820-fach erhöht. Somit wurden durch den Promotor p452 in *Ga. diazotrophicus* hohe Transkriptionsraten des in den Vektor eingebrachten Gens erreicht. Daher war von einer ausreichenden Produktion des Proteins Gdi_3764 auszugehen, die eine Aufreinigung möglich machen sollte.

4.6.2 Produktion, Lokalisierung und Aufreinigung des Proteins Gdi_3764

Die Produktion des Strep-Tag-fusionierten Proteins in *Ga. diazotrophicus* mit Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-ST konnte durch einen Western-Blot bestätigt werden. Das Protein wurde in dem Zelllysat des Überexpressionsstamms detektiert. Da die bioinformatische Analyse der Proteinsequenz keine eindeutigen Ergebnisse in Bezug auf die Lokalisierung des Proteins lieferte, musste experimentell geklärt werden, ob Gdi_3764 membrangebunden war oder in löslicher Form vorlag. Dazu wurde die Membranfraktion durch Ultrazentrifugation von den löslichen Zellbestandteilen getrennt und die beiden Fraktionen anschließend ebenfalls in einem Western-Blot analysiert. Die entsprechende detektierte Bande auf dem Western-Blot war für die Membranfraktion wesentlich stärker ausgeprägt, als für die lösliche Fraktion. Deshalb war davon auszugehen, dass das Protein Gdi_3764 mit der Membran assoziiert ist und somit mindestens eine Transmembrandomäne besitzen muss, wie sie mithilfe des TMHMM Servers auch bioinformatisch vorhergesagt wurde.

Für die Produktion des Proteins zur Aufreinigung aus der Membranfraktion von *Ga. diazotrophicus* über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie wurde das Plasmid pBBR1p452-*gdi3764*-OneST gewählt. Mit dem doppelten Strep-Tag wurden bereits verbesserte Ausbeuten bei der Aufreinigung der membrangebundenen Glukose-Dehydrogenase aus *G. oxydans* erzielt. Die aus 500 mL Kultur erhaltene Gesamtausbeute des gereinigten Proteins Gdi_3764 war mit 90 µg jedoch gering und erst nach dem Einengen des Proteins in den vereinigten Elutionsfraktionen konnte dieses auf einem Western-Blot detektiert werden. Das ermittelte Molekulargewicht von Gdi_3764 betrug etwa 50 kDa. Dadurch, dass das Genom von *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 durch zwei unabhängige Gruppen sequenziert wurde, bestehen für die die putative L-Sorbose-Dehydrogenase kodierende Gensequenz zwei mögliche Varianten. Gemäß der Sequenz, die

Bertalan *et al.* (2009) angeben, umfasst das durch das Gen *gdi_3764* kodierte Protein 468 Aminosäuren. Bei Lucas *et al.* (2008) beginnt das entsprechende Gen *gdia_2640* an einem alternativen Startcodon, wodurch das kodierte Protein um 17 Aminosäuren kürzer ist. In dieser Arbeit wurde die längere Gensequenz verwendet, um sicher zu gehen, dass das vollständige Protein produziert wird. Das theoretische Molekulargewicht des One-Strep-Tag-Fusionsproteins lag bei 53,4 kDa (*Gdi_3764*) bzw. 51,6 kDa (*Gdia_2640*) und aufgrund dieses geringen Unterschieds, konnte anhand des Western-Blots nicht entschieden werden, ob das Protein in der längeren oder kürzeren Version vorlag. Um zu klären, mit welchem der beiden möglichen Startcodons das Gen tatsächlich beginnt und wie groß das Protein dementsprechend ist, müsste eine N-terminale Sequenzierung des gereinigten Proteins vorgenommen werden. In einer BLAST-Analyse zeigte *Gdi_3764* eine große Homologie zu der membrangebundenen L-Sorboson-Dehydrogenase aus *Gluconacetobacter liquefaciens* (Shinjoh *et al.*, 1995). Die Tatsache, dass diese Homologie erst ab Aminosäure 18 auftrat, könnte einen Hinweis darauf sein, dass vermutlich die kürzere, durch das Gen *gdia_2640* kodierte Proteinvariante in *Ga. diazotrophicus* vorliegt. Auch zu putativen L-Sorboson-Dehydrogenasen aus anderen Organismen wurden bei der BLAST-Analyse relativ große Homologien gefunden. Mit dem isolierten und aufkonzentrierten Protein *Gdi_3764* konnte in dieser Arbeit jedoch keine Aktivität mit dem Substrat L-Sorboson gemessen werden. Bereits im Zusammenhang mit dem Protein *Gox1857* aus *G. oxydans* wurde das Problem beschrieben, dass der artifizielle Elektronenakzeptor durch das Substrat L-Sorboson auch nicht-enzymatisch reduziert wurde und da das gereinigte Protein nur in geringen Konzentrationen vorlag, wurden geringfügige Aktivitäten so möglicherweise überdeckt. Die Bedeutung von Sorboson-Dehydrogenasen in der Produktion von Vitamin C wurde in Abschnitt 4.4 diskutiert und einige dieser Enzyme wurden in der Vergangenheit charakterisiert. Eine lösliche, PQQ-abhängige L-Sorboson-Dehydrogenase (*SNDH1*) sowie zwei Isoformen des Enzyms (*SNDH2* und *SNDH3*), die aus *Ketogulonicigenium vulgare* DSM 4025 (früher als *Gluconobacter oxydans* bezeichnet) isoliert wurden, konnten L-Sorboson sowohl zu 2-Keto-L-Gulonsäure als auch zu L-Ascorbinsäure umsetzen (Miyazaki *et al.*, 2006). Für die Umsetzung von L-Sorboson zu L-Ascorbinsäure betragen die spezifischen Aktivitäten der Isoenzyme zwischen 3,01 und 4,63 U/mg und für die Umsetzung von L-Sorboson zu 2-Keto-L-Gulonsäure lagen die spezifischen Aktivitäten zwischen 0,60 und 1,16 U/mg. Asakura & Hoshino (1999) isolierten aus dem gleichen Organismus eine lösliche PQQ-abhängige L-Sorbose-/L-Sorboson-Dehydrogenase, die L-Sorbose zu L-Sorboson und L-Sorboson zu 2-Keto-L-Gulonsäure mit spezifischen Aktivitäten von

6,73 U/mg und 9,69 U/mg oxidierte. Das Enzym wies allerdings ein breites Substratspektrum auf. Es setzte primäre und sekundäre Alkohole, Aldehyde, Aldosen, Ketosen und andere Zuckeralkohole, aber nicht Methanol oder Formaldehyd um. Da die Aktivitäten mit diesen Substraten dabei größtenteils höher waren als mit L-Sorbose oder L-Sorboson, handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Alkohol-Dehydrogenase. Auch für die cytosolische NAD(P)-abhängige L-Sorboson-Dehydrogenase aus *Gluconobacter melanogenus* UV10 (*Gluconobacter oxydans* UV10) wurde ein breites Substratspektrum mit verschiedenen Aldehyden angegeben, wobei die spezifische Aktivität in diesem Fall jedoch mit Sorboson (1,7 U/mg) am höchsten war (Hoshino *et al.*, 1991). Die membrangebundene L-Sorboson-Dehydrogenase aus *Acetobacter liquefaciens* IFO12258 wurde heterolog in *G. oxydans* OX4, einer Mutante von *G. oxydans* IFO3293, die L-Sorboson in Gegenwart von L-Sorbose akkumuliert, produziert (Shinjoh *et al.*, 1995). Das Protein wurde dabei funktional in die Membran von *G. oxydans* integriert und konnte nach der Solubilisierung aus den Membranfraktionen aufgereinigt werden. Die spezifische Aktivität für das partiell gereinigte Enzym wurde mit 36,1 U/mg angegeben. Dass es sich bei Gdi_3764 aus *Ga. diazotrophicus* um eine Sorboson-Dehydrogenase handelt, konnte in dieser Arbeit nicht experimentell bestätigt werden, da mit diesem Substrat keine Aktivität messbar war. Allerdings lag das gereinigte Protein nur in sehr geringen Mengen vor. Niedrige Aktivitäten konnten so eventuell nicht nachgewiesen werden. Deshalb wäre es notwendig, die Ausbeute bei der Aufreinigung des Enzyms aus der Membran von *Ga. diazotrophicus* zu erhöhen. Dazu könnten z.B. größere Kulturvolumina eingesetzt werden und auch das Testen anderer Detergenzien zur Solubilisierung der Membranfraktionen könnte zu einer Verbesserung beitragen.

In dieser Arbeit wurden Grundlagen für die homologe Produktion und Aufreinigung von Membranproteinen aus *Ga. diazotrophicus* geschaffen. Mit dem in *G. oxydans* etablierten Expressionsvektor pBBR1p542-ST wurden in *Ga. diazotrophicus* hohe Transkriptionsraten des eingebrachten Gens *gdi_3764* nachgewiesen und eine Aufreinigung des produzierten One-Strep-Tag-Fusionsproteins war in geringen Mengen möglich. Dies zeigte, dass das Expressionssystem aus *G. oxydans* prinzipiell in *Ga. diazotrophicus* anwendbar ist und in Zukunft die Charakterisierung von Dehydrogenasen mit bisher unbekannter Funktion aus diesem Organismus ermöglicht. Durch die Charakterisierung wichtiger Enzyme könnte das biotechnologische Potential von *Ga. diazotrophicus* besser ausgeschöpft werden. Die Übertragbarkeit des Expressionssystems auf *Ga. diazotrophicus* liefert außerdem Hinweise

darauf, dass die in dieser Arbeit eingesetzten und weiterentwickelten Expressionsvektoren auch zur Genexpression in anderen Essigsäurebakterien geeignet sind.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Expressionssystem für die homologe Produktion und Aufreinigung von Membranproteinen aus Essigsäurebakterien weiterentwickelt. Dazu wurden die bereits in *G. oxydans* etablierten Expressionsvektoren pBBR1p264 und pBBR1p452, mit einem starken bzw. moderaten Promotor, durch die Integration der Sequenz für einen Strep-Tag optimiert.

Das optimierte Expressionssystem wurde zunächst anhand des cytoplasmatischen Proteins Gox1801 aus *G. oxydans* getestet. Das Enzym wurde unter Verwendung des Expressionsvektors pBBR1p264-ST überproduziert und das rekombinante Protein konnte durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Es zeigte sich, dass es sich bei Gox1801 um eine NAD(P)H-abhängige Succinat-Semialdehyd-Reduktase handelt. Die spezifische Aktivität des Enzyms mit dem Substrat Succinat-Semialdehyd und dem Cofaktor NADH betrug 225 ± 36 U/mg und das Enzym wies eine vergleichbare spezifische Aktivität von 230 ± 19 U/mg auf, wenn der Cofaktor NADPH eingesetzt wurde. Für das denaturierte Protein Gox1801 wurde ein Molekulargewicht von 32 kDa ermittelt und in der nativen Form lag das Protein als Tetramer vor. Der optimale pH-Wert des Enzyms für die Reduktion von Succinat-Semialdehyd lag bei 6,5 und die optimale Temperatur betrug 30 °C. Bei Verwendung des Cofaktors NADH wies Gox1801 einen K_M -Wert von $5,1 \pm 0,6$ mM für Succinat-Semialdehyd auf, die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) betrug 298 ± 40 U/mg und die katalytische Effizienz, k_{cat}/K_M , lag bei $3,1 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Die K_M -Werte für NADH und NADPH betragen $59 \pm 5,5$ bzw. 13 ± 4 μM . Die Rückreaktion, die Oxidation von γ -Hydroxybutyrat, wurde durch das Enzym lediglich mit einer geringen spezifischen Aktivität von 4 U/mg katalysiert. Eine Transkriptionsanalyse ergab, dass das Gen *gox1801* in dem *G. oxydans*-Wildtyp-Stamm stark exprimiert wurde und das Protein folglich eine wichtige Funktion haben muss.

Im nächsten Schritt wurde die durch das Gen *gox0265* kodierte membrangebundene PQQ-abhängige Glukose-Dehydrogenase (mGDH) aus *G. oxydans* als Modellprotein für die homologe Produktion und Aufreinigung von Membranproteinen eingesetzt. Die relative Expressionsrate des *mgdh*-Gens in dem Überexpressionsstamm, der das Plasmid pBBR1p452-*gox0265*-ST trug, war im Vergleich zu einem Kontrollstamm neunfach erhöht.

Entsprechend waren auch die mGDH-Aktivität und die Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktionen des Überexpressionsstamms dreifach bzw. fünffach höher als die des Kontrollstamms. Anders als bei dem Kontrollstamm, konnte die Sauerstoffverbrauchsrate der Membranfraktionen des mGDH-Überproduktionsstamms durch die Zugabe von Ethanol zusätzlich zu Glukose als Substrat nicht weiter gesteigert werden. Dies zeigte, dass die terminalen Chinoloxidasen hier den limitierenden Faktor darstellten und die Atmungskette allein durch die Oxidation von Glukose gesättigt wurde. Die mit den Membranfraktionen des Überproduktionsstamms gemessenen erhöhten Glukose-Oxidationsraten korrelierten mit einer um 70 % gesteigerten Glukonatproduktionsrate dieses Stamms. Nach der Solubilisierung der Membranfraktionen mit dem Detergenz Triton X-100 konnte die rekombinante mGDH über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Der K_M -Wert für Glukose lag bei $5,9 \pm 0,34$ mM mit einem V_{max} -Wert von $216 \pm 5,4$ U/mg. Zudem zeigte das Enzym geringere Aktivitäten mit weiteren D-Aldosen und Aldosederivaten. Durch die Verwendung eines doppelten Strep-Tags (One-Strep-Tag) wurde die Proteinausbeute bei der Aufreinigung des Membranproteins verbessert. Die spezifische Aktivität der mGDH mit dem doppelten Strep-Tag war im Vergleich zu dem Enzym mit dem einfachen Strep-Tag erhöht. Dies könnte auf einen Effekt des Affinitätstags zurückzuführen sein.

Nach der erfolgreichen Überproduktion und Aufreinigung der mGDH als Modell-Membranprotein, wurde der Vektor pBBR1p452-ST eingesetzt, um das Gen *gox1857* aus *G. oxydans* homolog zu exprimieren. Dieses Gen kodierte eine bisher noch nicht eingehend charakterisierte membrangebundene *myo*-Inositol- oder L-Sorboson-Dehydrogenase. Das rekombinante Protein konnte nach der Solubilisierung der Membranfraktion über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie bis zur Homogenität gereinigt werden. Für das denaturierte Protein wurde ein Molekulargewicht von 87 kDa ermittelt. Das gereinigte Enzym wies eine relativ geringe spezifische Aktivität mit dem Substrat *myo*-Inositol (0,5 - 5 U/mg) auf und zeigte keine Aktivität mit L-Sorboson. Auch mit weiteren Zuckern, Zuckeralkoholen und zyklischen Diolen wurde keine signifikante Aktivität des Enzyms nachgewiesen. Dementsprechend handelt es sich bei Gox1857 vermutlich um eine *myo*-Inositol-Dehydrogenase mit geringer Aktivität.

Im letzten Schritt wurde das in dieser Arbeit optimierte und für *G. oxydans* etablierte System zur homologen Überproduktion und Aufreinigung von Membranproteinen für die Produktion eines Proteins in *Gluconacetobacter diazotrophicus* eingesetzt. Dazu wurde die putative

L-Sorbose-Dehydrogenase Gdi_3764 ausgewählt. Das Gen *gdi_3764* wurde unter Verwendung des Vektors pBBR1p452-ST überexprimiert und die relative Transkriptionsrate dieses Gens war in dem Überexpressionsstamm im Vergleich zu dem *Ga. diazotrophicus*-Wildtyp 8230-fach erhöht. Zur Aufreinigung des Proteins über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie wurde der One-Strep-Tag verwendet. Das Protein konnte so, wenn auch in eher geringen Mengen, nach der Solubilisierung der Membranfraktion aufgereinigt werden. Dies zeigte, dass das Expressionssystem aus *G. oxydans* prinzipiell in *Ga. diazotrophicus* anwendbar ist. Die Übertragbarkeit des Expressionssystems auf *Ga. diazotrophicus* lieferte außerdem Hinweise darauf, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Expressionsvektoren auch zur Genexpression in anderen Essigsäurebakterien geeignet sind.

6 Literaturverzeichnis

- Abergel, C., Bouveret, E., Claverie, J. M., Brown, K., Rigal, A., Lazdunski, C. & Bénédicti, H. (1999). Structure of the *Escherichia coli* TolB protein determined by MAD methods at 1.95 Å resolution. *Structure* **7**, 1291–1300.
- Ackrell, B. A. C. & Jones, C. W. (1971). The Respiratory System of *Azotobacter vinelandii* 2. Oxygen effects. *Eur J Biochem* **20**, 29–35.
- Adachi, O., Tayama, K., Shinagawa, E., Matsushita, K. & Ameyama, M. (1980). Purification and Characterization of Membrane-bound Aldehyde Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Agric Biol Chem* **44**, 503–515.
- Adachi, O., Fujii, Y., Ghaly, M. F., Toyama, H., Shinagawa, E. & Matsushita, K. (2001). Membrane-bound Quinoprotein D-Arabitol Dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* IFO 3257: A Versatile Enzyme for the Oxidative Fermentation of Various Ketoses. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 2755–2762.
- Adachi, O., Moonmangmee, D., Shinagawa, E., Toyama, H., Yamada, M. & Matsushita, K. (2003). New quinoproteins in oxidative fermentation. *Biochim Biophys Acta* **1647**, 10–17.
- Allan, W. L., Clark, S. M., Hoover, G. J. & Shelp, B. J. (2009). Role of plant glyoxylate reductases during stress: a hypothesis. *Biochem J* **423**, 15–22.
- Alquères, S., Meneses, C., Rouws, L., Rothballer, M., Baldani, I., Schmid, M. & Hartmann, A. (2013). The Bacterial Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase Are Crucial for Endophytic Colonization of Rice Roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 937–945.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402.
- Ameyama, M., Shinagawa, E., Matsushita, K. & Adachi, O. (1981). D-Glucose Dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*: Solubilization, Purification and Characterization. *Agric Biol Chem* **45**, 851–861.
- Ameyama, M., Nonobe, M., Shinagawa, E., Matsushita, K., Takimoto, K. & Adachi, O. (1986). Purification and Characterization of the Quinoprotein D-Glucose Dehydrogenase Apoenzyme from *Escherichia coli*. *Agric Biol Chem* **50**, 49–57.
- Ameyama, M., Matsushita, K., Shinagawa, E. & Adachi, O. (1987). Sugar-oxidizing Respiratory Chain of *Gluconobacter suboxydans*. Evidence for a Branched Respiratory Chain and Characterization of Respiratory Chain-Linked Cytochromes. *Agric Biol Chem* **51**, 2943–2950.
- Andriamampandry, C., Siffert, J. C., Schmitt, M., Garnier, J. M., Staub, A., Muller, C., Gobaille, S., Mark, J. & Maitre, M. (1998). Cloning of a rat brain succinic semialdehyde reductase involved in the synthesis of the neuromodulator γ -hydroxybutyrate. *Biochem J* **334**, 43–50.

- Anthony, C. & Ghosh, M. (1998).** The structure and function of the PQQ-containing quinoprotein dehydrogenases. *Prog Biophys Mol Biol* **69**, 1–21.
- Armstrong, J. M. (1964).** The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. *Biochim Biophys Acta* **86**, 194–197.
- Asakura, A. & Hoshino, T. (1999).** Isolation and Characterization of a New Quinoprotein Dehydrogenase, L-Sorbose/L-Sorbose Dehydrogenase. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 46–53.
- Atack, J. M. & Kelly, D. J. (2006).** Structure, Mechanism and Physiological Roles of Bacterial Cytochrome *c* Peroxidases. *Adv Microb Physiol* **52**, 73–106.
- Attwood, M. M., van Dijken, J. P. & Pronk, J. T. (1991).** Glucose Metabolism and Gluconic Acid Production by *Acetobacter diazotrophicus*. *J Ferment Bioeng* **72**, 101–105.
- Banguela, A., Arrieta, J. G., Rodríguez, R., Trujillo, L. E., Menéndez, C. & Hernández, L. (2011).** High levan accumulation in transgenic tobacco plants expressing the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase gene. *J Biotechnol* **154**, 93–98.
- Barbe, V., Vallenet, D., Fonknechten, N., Kreimeyer, A., Oztas, S., Labarre, L., Cruveiller, S., Robert, C., Duprat, S. & andere Autoren. (2004).** Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res* **32**, 5766–5779.
- Bartsch, K., von Johnn-Marteville, A. & Schulz, A. (1990).** Molecular Analysis of Two Genes of the *Escherichia coli* *gab* Cluster: Nucleotide Sequence of the Glutamate:Succinic Semialdehyde Transaminase Gene (*gabT*) and Characterization of the Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Gene (*gabD*). *J Bacteriol* **172**, 7035–7042.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Bottini, R., Baraldi, R. & Bottini, R. (1998).** Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ and A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* **24**, 7–11.
- Battey, A. S. & Schaffner, D. W. (2001).** Modelling bacterial spoilage in cold-filled ready to drink beverages by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Gluconobacter oxydans*. *J Appl Microbiol* **91**, 237–247.
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Buckel, W. & Fuchs, G. (2007).** A 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate Autotrophic Carbon Dioxide Assimilation Pathway in Archaea. *Science* **318**, 1782–1786.
- Berry, A., Lee, C., Mayer, A. F. & Shinjoh, M. (2010).** Polypeptides and encoding polynucleotides for microbial production of L-ascorbic acid and associated methods. United States Patent 7700723.
- Berry, A., Lee, C., Mayer, A. F. & Shinjoh, M. (2012).** Microbial production of L-ascorbic acid. United States Patent 8338144.
- Bertalan, M., Albano, R., de Pádua, V., Rouws, L., Rojas, C., Hemerly, A., Teixeira, K., Schwab, S., Araujo, J. & andere Autoren. (2009).** Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* **10**, 450.
- Beuzelin-Ollivier, M. G., Chevreux, B., Dalluege, M., Van Gelder, M., Goese, M. G., Hauk, C., Koekman, B. P., Lee, C., Mayer, A. F. & andere Autoren. (2012).** Fermentative vitamin C production. United States Patent 8318462.

- Blanco, Y., Blanch, M., Piñón, D., Legaz, M. E. & Vicente, C. (2005).** Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a Sugarcane Endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (Pathogen) Studied in Alginate-Immobilized Sugarcane Stalk Tissues. *J Biosci Bioeng* **99**, 366–371.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. (1987).** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99.
- Bormann, J. (1988).** Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *Trends Neurosci* **11**, 112–116.
- Botta, A. L., Santacecilia, A., Ercole, C., Cacchio, P. & Del Gallo, M. (2013).** *In vitro* and *in vivo* inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. *New Biotechnol* **30**, 666–674.
- Bradford, M. M. (1976).** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Breitkreuz, K. E., Allan, W. L., Van Cauwenberghe, O. R., Jakobs, C., Talibi, D., André, B. & Shelp, B. J. (2003).** A Novel γ -Hydroxybutyrate Dehydrogenase: identification and expression of an *Arabidopsis* cDNA and potential role under oxygen deficiency. *J Biol Chem* **278**, 41552–41556.
- Buchan, D. W. A., Minneci, F., Nugent, T. C. O., Bryson, K. & Jones, D. T. (2013).** Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res* **41**, W349–W357.
- Buchert, J. & Viikari, L. (1988).** Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **29**, 375–379.
- Cao, N. J., Brusilow, W. S. A., Tomashek, J. J. & Woodbury, D. J. (2001).** Characterization of Reconstituted F_o from Wild-Type *Escherichia coli* and Identification of Two Other Fluxes Co-Purifying with F_o. *Cell Biochem Biophys* **34**, 305–320.
- Cash, C. D., Maitre, M. & Mandel, P. (1979).** Purification from Human Brain and Some Properties of Two NADPH-Linked Aldehyde Reductases Which Reduce Succinic Semialdehyde to 4-Hydroxybutyrate. *J Neurochem* **33**, 1169–1175.
- Cavalcante, V. A. & Dobereiner, J. (1988).** A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* **108**, 23–31.
- Chant, A., Kraemer-Pecore, C. M., Watkin, R. & Kneale, G. G. (2005).** Attachment of a histidine tag to the minimal zinc finger protein of the *Aspergillus nidulans* gene regulatory protein AreA causes a conformational change at the DNA-binding site. *Protein Expr Purif* **39**, 152–159.
- Chebib, M. & Johnston, G. A. R. (1999).** The ‘ABC’ of GABA Receptors: A Brief Review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**, 937–940.
- Chen, M., Lin, J., Ma, Y. & Wei, D. (2010).** Characterization of a Novel NADPH-Dependent Oxidoreductase from *Gluconobacter oxydans*. *Mol Biotechnol* **46**, 176–181.
- Chen, Z. W., Matsushita, K., Yamashita, T., Fujii, T. A., Toyama, H., Adachi, O., Bellamy, H. D. & Mathews, F. S. (2002).** Structure at 1.9 Å Resolution of a Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Pseudomonas putida* HK5. *Structure* **10**, 837–849.

- Cheng, H., Jiang, N., Shen, A. & Feng, Y. (2005).** Molecular cloning and functional expression of D-arabitol dehydrogenase gene from *Gluconobacter oxydans* in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **252**, 35–42.
- Cho, S. W., Song, M. S., Kim, G. Y., Kang, W. D., Choi, E. Y. & Choi, S. Y. (1993).** Kinetics and mechanism of an NADPH-dependent succinic semialdehyde reductase from bovine brain. *Eur J Biochem* **211**, 757–762.
- Choi, M. H., Yoon, S. C. & Lenz, R. W. (1999).** Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid-Co-4-Hydroxybutyric Acid) and Poly(4-Hydroxybutyric Acid) without Subsequent Degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Appl Environ Microbiol* **65**, 1570–1577.
- Claret, C., Salmon, J. M., Romieu, C. & Bories, A. (1994).** Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Appl Microbiol Biotechnol* **41**, 359–365.
- Cleenwerck, I. & De Vos, P. (2008).** Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology. *Int J Food Microbiol* **125**, 2–14.
- Cleton-Jansen, A. M., Goosen, N., Fayet, O. & van de Putte, P. (1990).** Cloning, Mapping, and Sequencing of the Gene Encoding *Escherichia coli* Quinoprotein Glucose Dehydrogenase. *J Bacteriol* **172**, 6308–6315.
- Cleton-Jansen, A. M., Dekker, S., van de Putte, P. & Goosen, N. (1991).** A single amino acid substitution changes the substrate specificity of quinoprotein glucose dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans*. *Mol Gen Genet* **229**, 206–212.
- Cocking, E. C., Stone, P. J. & Davey, M. R. (2005).** Symbiosome-like intracellular colonization of cereals and other crop plants by nitrogen-fixing bacteria for reduced inputs of synthetic nitrogen fertilizers. *Sci China C Life Sci* **48**, 888–896.
- Condon, C., FitzGerald, R. J. & O’Gara, F. (1991).** Conjugation and heterologous gene expression in *Gluconobacter oxydans* ssp. *suboxydans*. *FEMS Microbiol Lett* **80**, 173–177.
- Cozier, G. E. & Anthony, C. (1995).** Structure of the quinoprotein glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* modelled on that of methanol dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens*. *Biochem J* **312**, 679–685.
- Cozier, G. E., Salleh, R. A. & Anthony, C. (1999).** Characterization of the membrane quinoprotein glucose dehydrogenase from *Escherichia coli* and characterization of a site-directed mutant in which histidine-262 has been changed to tyrosine. *Biochem J* **340**, 639–647.
- Creaven, M., FitzGerald, R. J. & O’Gara, F. (1994).** Transformation of *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* by electroporation. *Can J Microbiol* **40**, 491–494.
- Criddle, W. J., Fry, J. C. & Keaney, M. M. (1974).** *myo*-Inositol Dehydrogenase(s) from *Acetomonas oxydans*. Optimization of Conditions for Solubilization of Membrane-Bound Enzyme. *Biochem J* **137**, 449–452.
- Criddle, W. J., Fry, J. C., Keaney, M. M., Lucas, C. M. & Tovey, J. A. (1977).** *Myo*-Inositol Dehydrogenase(s) from *Acetomonas oxydans*. *Mol Cell Biochem* **16**, 3–8.
- Cromlish, J. A. & Flynn, T. G. (1985).** Identification of Pig Brain Aldehyde Reductases with the High- K_m Aldehyde Reductase, the Low- K_m Aldehyde Reductase and Aldose Reductase, Carbonyl Reductase, and Succinic Semialdehyde Reductase. *J Neurochem* **44**, 1485–1493.

- D'Costa, E. J., Higgins, I. J. & Turner, A. P. F. (1986).** Quinoprotein Glucose Dehydrogenase and its Application in an Amperometric Glucose Sensor. *Biosensors* **2**, 71–87.
- De Biase, D., Tramonti, A., Bossa, F. & Visca, P. (1999).** The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Mol Microbiol* **32**, 1198–1211.
- De Ley, J., Gillis, M. & Swings, J. (1984).** The genus *Gluconobacter*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Bd. 1, SS. 267-278. Herausgegeben von N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Del Signore, A. G., McGregor, M. & Cho, B. P. (2005).** ¹H NMR Analysis of GHB and GBL: Further Findings on the Interconversion and a Preliminary Report on the Analysis of GHB in Serum and Urine. *J Forensic Sci* **50**, 81–86.
- De Muynck, C., Pereira, C., Soetaert, W. & Vandamme, E. (2006).** Dehydrogenation of ribitol with *Gluconobacter oxydans*: Production and stability of L-ribulose. *J Biotechnol* **125**, 408–415.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M. & Prust, C. (2002).** Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**, 233–242.
- Deppenmeier, U. & Ehrenreich, A. (2009).** Physiology of Acetic Acid Bacteria in Light of the Genome Sequence of *Gluconobacter oxydans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **16**, 69–80.
- Dewanti, A. R. & Duine, J. A. (1998).** Reconstitution of Membrane-Integrated Quinoprotein Glucose Dehydrogenase Apoenzyme with PQQ and the Holoenzyme's Mechanism of Action. *Biochemistry (Mosc)* **37**, 6810–6818.
- Donnelly, M. I. & Cooper, R. A. (1981).** Two Succinic Semialdehyde Dehydrogenases Are Induced when *Escherichia coli* K-12 Is Grown on γ -Aminobutyrate. *J Bacteriol* **145**, 1425–1427.
- Dos Santos, M. F., de Pádua, V. L. M., de Matos Nogueira, E., Hemerly, A. S. & Domont, G. B. (2010).** Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *J Proteomics* **73**, 917–931.
- Duine, J. A. (1991).** Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *Eur J Biochem* **200**, 271–284.
- Duine, J. A., Frank Jzn., J. F. & Van Zeeland, J. K. (1979).** Glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*: A 'quinoprotein'. *FEBS Lett* **108**, 443–446.
- Duine, J. A., Frank Jzn., J. & Jongejan, J. A. (1983).** Detection and Determination of Pyrroloquinoline Quinone, the Coenzyme of Quinoproteins. *Anal Biochem* **133**, 239–243.
- Duine, J. A., Frank Jzn., J. & Jongejan, J. A. (1986).** PQQ and quinoprotein enzymes in microbial oxidations. *FEMS Microbiol Lett* **32**, 165–178.
- Dvorkovitz, V. & Hawley, T. G. (1952).** Washing Composition. United States Patent 2584017.
- Falke, D., Schulz, K., Doberenz, C., Beyer, L., Lilie, H., Thiemer, B. & Sawers, R. G. (2010).** Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of *Escherichia coli*: a paradigm for the formate–nitrite transporter family of integral membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* **303**, 69–75.

- Felder, M., Gupta, A., Verma, V., Kumar, A., Qazi, G. N. & Cullum, J. (2000). The pyrroloquinoline quinone synthesis genes of *Gluconobacter oxydans*. *FEMS Microbiol Lett* **193**, 231–236.
- Ferguson, A. D., Breed, J., Diederichs, K., Welte, W. & Coulton, J. W. (1998). An internal affinity-tag for purification and crystallization of the siderophore receptor FhuA, integral outer membrane protein from *Escherichia coli* K-12. *Protein Sci* **7**, 1636–1638.
- Fuentes-Ramirez, L. E., Jimenez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I. R. & Caballero-Mellado, J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant Soil* **154**, 145–150.
- Fukaya, M., Okumura, H., Masai, H., Uozumi, T. & Beppu, T. (1985a). Development of a Host-vector System for *Gluconobacter suboxydans*. *Agric Biol Chem* **49**, 2407–2411.
- Fukaya, M., Okumura, H., Masai, H., Uozumi, T. & Beppu, T. (1985b). Construction of New Shuttle Vectors for *Acetobacter*. *Agric Biol Chem* **49**, 2083–2090.
- Fukaya, M., Iwata, T., Entani, E., Masai, H., Uozumi, T. & Beppu, T. (1985c). Distribution and Characterization of Plasmids in Acetic Acid Bacteria. *Agric Biol Chem* **49**, 1349–1355.
- Geertsma, E. R., Mahmood, N. A. B. N., Schuurman-Wolters, G. K. & Poolman, B. (2008). Membrane reconstitution of ABC transporters and assays of translocator function. *Nat Protoc* **3**, 256–266.
- Geiger, O. & Görisch, H. (1989). Reversible thermal inactivation of the quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. Ca^{2+} ions are necessary for re-activation. **261**, 415–421.
- Gerhardt, A., Çinkaya, I., Linder, D., Huisman, G. & Buckel, W. (2000). Fermentation of 4-aminobutyrate by *Clostridium aminobutyricum*: cloning of two genes involved in the formation and dehydration of 4-hydroxybutyryl-CoA. *Arch Microbiol* **174**, 189–199.
- Gibson, K. M., Hoffmann, G. F., Hodson, A. K., Bottiglieri, T. & Jakobs, C. (1998). 4-Hydroxybutyric Acid and the Clinical Phenotype of Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency, an Inborn Error of GABA Metabolism. *Neuropediatrics* **29**, 14–22.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P., Teixeira, K. R. S., Döbereiner, J. & Ley, J. D. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 361–364.
- Gliese, N., Khodaverdi, V. & Görisch, H. (2009). The PQQ biosynthetic operons and their transcriptional regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol* **192**, 1–14.
- Goel, A., Colcher, D., Koo, J. S., Booth, B. J. M., Pavlinkova, G. & Batra, S. K. (2000). Relative position of the hexahistidine tag effects binding properties of a tumor-associated single-chain Fv construct. *Biochim Biophys Acta* **1523**, 13–20.
- Gómez-Manzo, S., Contreras-Zentella, M., González-Valdez, A., Sosa-Torres, M., Arreguín-Espinoza, R. & Escamilla-Marván, E. (2008). The PQQ-alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Int J Food Microbiol* **125**, 71–78.

- Gómez-Manzo, S., Chavez-Pacheco, J. L., Contreras-Zentella, M., Sosa-Torres, M. E., Arreguín-Espinosa, R., de la Mora, M. P. de la, Membrillo-Hernández, J. & Escamilla, J. E. (2010a). Molecular and Catalytic Properties of the Aldehyde Dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a Quinoheme Protein Containing Pyrroloquinoline Quinone, Cytochrome *b*, and Cytochrome *c*. *J Bacteriol* **192**, 5718–5724.
- Gómez-Manzo, S., Solano-Peralta, A., Saucedo-Vázquez, J. P., Escamilla-Marván, J. E., Kroneck, P. M. H. & Sosa-Torres, M. E. (2010b). The Membrane-Bound Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Carries a [2Fe-2S] Cluster. *Biochemistry (Mosc)* **49**, 2409–2415.
- Gómez-Manzo, S., González-Valdez, A. A., Oria-Hernández, J., Reyes-Vivas, H., Arreguín-Espinosa, R., Kroneck, P. M. H., Sosa-Torres, M. E. & Escamilla, J. E. (2012). The active (ADHa) and inactive (ADHi) forms of the PQQ-alcohol dehydrogenase from *Gluconacetobacter diazotrophicus* differ in their respective oligomeric structures and redox state of their corresponding prosthetic groups. *FEMS Microbiol Lett* **328**, 106–113.
- González, B., Martínez, S., Chávez, J. L., Lee, S., Castro, N. A., Domínguez, M. A., Gómez, S., Contreras, M. L., Kennedy, C. & Escamilla, J. E. (2006). Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Evidence for a cyanide-sensitive cytochrome *bb* and cyanide-resistant cytochrome *ba* quinol oxidases. *Biochim Biophys Acta* **1757**, 1614–1622.
- Goodwin, P. M. & Anthony, C. (1998). The Biochemistry, Physiology and Genetics of PQQ and PQQ-containing Enzymes. *Adv Microb Physiol* **40**, 1–80.
- Goosen, N., Horsman, H. P., Huinen, R. G. M. & van de Putte, P. (1989). *Acinetobacter calcoaceticus* Genes Involved in Biosynthesis of the Coenzyme Pyrrolo-Quinoline-Quinone: Nucleotide Sequence and Expression in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **171**, 447–455.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* **177**, 751–766.
- Greenfield, S. & Claus, G. W. (1972). Nonfunctional Tricarboxylic Acid Cycle and the Mechanism of Glutamate Biosynthesis in *Acetobacter suboxydans*. *J Bacteriol* **112**, 1295–1301.
- Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L. & Giudici, P. (2006). Characterization of acetic acid bacteria in ‘traditional balsamic vinegar’. *Int J Food Microbiol* **106**, 209–212.
- Gupta, A., Singh, V. K., Qazi, G. N. & Kumar, A. (2001). *Gluconobacter oxydans*: Its Biotechnological Applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**, 445–456.
- Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580.
- Hancock, R. D. & Viola, R. (2002). Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *Trends Biotechnol* **20**, 299–305.
- Hanke, T., Richhardt, J., Polen, T., Sahm, H., Bringer, S. & Bott, M. (2012). Influence of oxygen limitation, absence of the cytochrome *bc*₁ complex and low pH on global gene expression in *Gluconobacter oxydans* 621H using DNA microarray technology. *J Biotechnol* **157**, 359–372.
- Hardman, J. K. (1962). γ -Hydroxybutyrate dehydrogenase from *Clostridium aminobutyricum*. *Methods Enzymol* **5**, 778–783.

- Hauge, J. G. (1964).** Glucose Dehydrogenase of *Bacterium anitratum*: an Enzyme with a Novel Prosthetic Group. *J Biol Chem* **239**, 3630–3639.
- Hearl, W. G. & Churchich, J. E. (1985).** A Mitochondrial NADP⁺-dependent reductase related to the 4-aminobutyrate shunt. Purification, characterization, and mechanism. *J Biol Chem* **260**, 16361–16366.
- Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E. & Tanford, C. (1979).** Properties of detergents. *Methods Enzymol* **56**, 734–749.
- Hernández-Rocamora, V. M., Maestro, B., Mollá-Morales, A. & Sanz, J. M. (2008).** Rational stabilization of the C-LytA affinity tag by protein engineering. *Protein Eng Des Sel* **21**, 709–720.
- Hicks, D. B. & Krulwich, T. A. (1990).** Purification and Reconstitution of the F₁F₀-ATP Synthase from Alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4. Evidence that the enzyme translocates H⁺ but not Na⁺. *J Biol Chem* **265**, 20547–20554.
- Hikuma, M., Takeda, M., Matsuoka, H. & Karube, I. (1995).** Reagentless enzyme-based sensor using a gas-permeable membrane for determination of alcohols. *Anal Chim Acta* **306**, 209–215.
- Hoffmeister, M. (2006).** Untersuchungen zur Physiologie des Essigsäurebakteriums *Gluconobacter oxydans* 621H. Dissertation. Göttingen: Georg-August-Universität.
- Hölscher, T. & Görisch, H. (2006).** Knockout and Overexpression of Pyrroloquinoline Quinone Biosynthetic Genes in *Gluconobacter oxydans* 621H. *J Bacteriol* **188**, 7668–7676.
- Hölscher, T., Weinert-Sepalage, D. & Görisch, H. (2007).** Identification of membrane-bound quinoprotein inositol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Microbiology* **153**, 499–506.
- Hoshino, T., Sugisawa, T. & Fujiwara, A. (1991).** Isolation and Characterization of NAD(P)-Dependent L-Sorbose Dehydrogenase from *Gluconobacter melanogenus* UV10. *Agric Biol Chem* **55**, 665–670.
- Huber, H., Gallenberger, M., Jahn, U., Eylert, E., Berg, I. A., Kockelkorn, D., Eisenreich, W. & Fuchs, G. (2008).** A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7851–7856.
- Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bateman, A., Bernard, T., Binns, D., Bork, P. & andere Autoren. (2012).** InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res* **40**, D306–D312.
- Igarashi, S., Okuda, J., Ikebukuro, K. & Sode, K. (2004).** Molecular engineering of PQQGDH and its applications. *Arch Biochem Biophys* **428**, 52–63.
- Intorne, A. C., de Oliveira, M. V. V., Lima, M. L., da Silva, J. F., Olivares, F. L. & de Souza Filho, G. A. (2009).** Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch Microbiol* **191**, 477–483.
- Ireland, L. S., Harrison, D. J., Neal, G. E. & Hayes, D. (1998).** Molecular cloning, expression and catalytic activity of a human AKR7 member of the aldo–keto reductase superfamily: evidence that the major 2-carboxybenzaldehyde reductase from human liver is a homologue of rat aflatoxin B₁-aldehyde reductase. *Biochem J* **332**, 21–34.

- Ishida, K., Wang, Y. & Inoue, Y. (2001).** Comonomer Unit Composition and Thermal Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)s Biosynthesized by *Ralstonia eutropha*. *Biomacromolecules* **2**, 1285–1293.
- James, E. K., Reis, V. M., Olivares, F. L., Baldani, J. I. & Döbereiner, J. (1994).** Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J Exp Bot* **45**, 757–766.
- James, E. K., Olivares, F. L., de Oliveira, A. L. M., dos Reis, F. B. J., da Silva, L. G. & Reis, V. M. (2001).** Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *J Exp Bot* **52**, 747–760.
- Jendrossek, D. (2009).** Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *J Bacteriol* **191**, 3195–3202.
- Jendrossek, D. & Handrick, R. (2002).** Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol* **56**, 403–432.
- Jendrossek, D., Schirmer, A. & Schlegel, H. G. (1996).** Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**, 451–463.
- Jimenez-Salgado, T., Fuentes-Ramirez, L. E., Tapia-Hernandez, A., Mascarua-Esparza, M. A., Martinez-Romero, E. & Caballero-Mellado, J. (1997).** *Coffea arabica* L., a New Host Plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and Isolation of other Nitrogen-Fixing Acetobacteria. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3676–3683.
- Jones, D. T. (1999).** Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-specific Scoring Matrices. *J Mol Biol* **292**, 195–202.
- Kallnik, V. (2012).** Untersuchungen zur Polyoxoxidation in *Gluconobacter oxydans* und *Thermotoga maritima*. Dissertation. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität.
- Kallnik, V., Meyer, M., Deppenmeier, U. & Schweiger, P. (2010).** Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. *J Biotechnol* **150**, 460–465.
- Kallnik, V., Schultz, C., Schweiger, P. & Deppenmeier, U. (2011).** Properties of recombinant *Strep*-tagged and untagged hyperthermophilic D-arabitol dehydrogenase from *Thermotoga maritima*. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**, 1285–1293.
- Kasahara, T. & Kato, T. (2003).** Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature* **422**, 832.
- Keitel, T., Diehl, A., Knaute, T., Stezowski, J. J., Höhne, W. & Görisch, H. (2000).** X-ray structure of the quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: basis of substrate specificity. *J Mol Biol* **297**, 961–974.
- Killgore, J., Smidt, C., Duich, L., Romero-Chapman, N., Tinker, D., Reiser, K., Melko, M., Hyde, D. & Rucker, R. B. (1989).** Nutritional Importance of Pyrroloquinoline Quinone. *Science* **245**, 850–852.
- Kimura, H., Ohura, T., Takeishi, M., Nakamura, S. & Doi, Y. (1999).** Effective microbial production of poly(4-hydroxybutyrate) homopolymer by *Ralstonia eutropha* H16. *Polym Int* **48**, 1073–1079.
- Klasen, R., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. (1992).** Incapability of *Gluconobacter oxydans* to Produce Tartaric Acid. *Biotechnol Bioeng* **40**, 183–186.

- Kockelkorn, D. & Fuchs, G. (2009).** Malonic Semialdehyde Reductase, Succinic Semialdehyde Reductase, and Succinyl-Coenzyme A Reductase from *Metallosphaera sedula*: Enzymes of the Autotrophic 3-Hydroxypropionate/4-Hydroxybutyrate Cycle in *Sulfolobales*. *J Bacteriol* **191**, 6352–6362.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop II, R. M. & Peterson, K. M. (1995).** Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176.
- Kumazawa, T., Seno, H., Urakami, T., Matsumoto, T. & Suzuki, O. (1992).** Trace levels of pyrroloquinoline quinone in human and rat samples detected by gas chromatography/mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* **1156**, 62–66.
- Kumazawa, T., Sato, K., Seno, H., Ishii, A. & Suzuki, O. (1995).** Levels of pyrroloquinoline quinone in various foods. *Biochem J* **307**, 331–333.
- Kunioka, M., Kawaguchi, Y. & Doi, Y. (1989).** Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **30**, 569–573.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lapenaite, I., Kurtinaitiene, B., Razumiene, J., Laurinavicius, V., Marcinkeviciene, L., Bachmatova, I., Meskys, R. & Ramanavicius, A. (2005).** Properties and analytical application of PQQ-dependent glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter* sp. 33. *Anal Chim Acta* **549**, 140–150.
- Lery, L. M. S., Hemerly, A. S., Nogueira, E. M., von Krüger, W. M. A. & Bisch, P. M. (2011).** Quantitative Proteomic Analysis of the Interaction Between the Endophytic Plant-Growth-Promoting Bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Sugarcane. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 562–576.
- Li, R. P. & Macrae, I. C. (1991).** Specific Association of Diazotrophic Acetobacters with Sugarcane. *Soil Biol Biochem* **23**, 999–1002.
- Lichtenthaler, F. W. (2006).** The key sugars of Biomass: Availability, present non-food applications and potential industrial development lines. In *Biorefineries, Biobased Industrial Processes and Products*, SS. 3–59. Herausgegeben von B. Kamm, P. Gruber & M. Kamm. Weinheim: Wiley-VCH.
- Linke, D. (2009).** Detergents: An Overview. *Methods Enzymol* **463**, 603–617.
- Loganathan, P., Sunita, R., Parida, A. K. & Nair, S. (1999).** Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. *J Appl Microbiol* **87**, 167–172.
- Lokanath, N. K., Ohshima, N., Takio, K., Shiromizu, I., Kuroishi, C., Okazaki, N., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Miyano, M. & Kunishima, N. (2005).** Crystal Structure of Novel NADP-dependent 3-Hydroxyisobutyrate Dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8. *J Mol Biol* **352**, 905–917.
- Lucas, S., Copeland, A., Glavina del Rio, T., Dalin, E., Tice, H., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Chertkov, O. & andere Autoren (2008).** Complete sequence of chromosome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. US DOE Joint Genome Institute.

- Luna, M. F., Mignone, C. F. & Boiardi, J. L. (2000). The carbon source influences the energetic efficiency of the respiratory chain of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**, 564–569.
- Luna, M. F., Bernardelli, C. E., Galar, M. L. & Boiardi, J. L. (2006). Glucose Metabolism in Batch and Continuous Cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3. *Curr Microbiol* **52**, 163–168.
- Luna, M. F., Galar, M. L., Aprea, J., Molinari, M. L. & Boiardi, J. L. (2010). Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnol Lett* **32**, 1071–1076.
- Macauley, S., McNeil, B. & Harvey, L. M. (2001). The Genus *Gluconobacter* and Its Applications in Biotechnology. *Crit Rev Biotechnol* **21**, 1–25.
- Madhaiyan, M., Saravanan, V. S., Jovi, D. B. S. S., Lee, H., Thenmozhi, R., Hari, K. & Sa, T. (2004). Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiol Res* **159**, 233–243.
- Maheshkumar, K. S., Krishnaraj, P. U. & Alagawadi, A. R. (1999). Mineral phosphate solubilizing activity of *Acetobacter diazotrophicus*: A bacterium associated with sugarcane. *Curr Sci* **76**, 874–875.
- Marchler-Bauer, A. & Bryant, S. H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res* **32**, W327–W331.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C., Gonzales, N. R. & andere Autoren. (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* **37**, D205–D210.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Fong, J. H., Geer, L. Y., Geer, R. C. & andere Autoren. (2011). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* **39**, D225–D229.
- Marek, L. E. & Henson, J. M. (1988). Cloning and Expression of the *Escherichia coli* K-12 *sad* gene. *J Bacteriol* **170**, 991–994.
- Martínez-Fleites, C., Tarbouriech, N., Ortiz-Lombardia, M., Taylor, E., Rodríguez, A., Ramírez, R., Hernández, L. & Davies, G. J. (2004). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of levansucrase (LsdA) from *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 181–183.
- Martínez-Fleites, C., Ortíz-Lombardía, M., Pons, T., Tarbouriech, N., Taylor, E. J., Arrieta, J. G., Hernández, L. & Davies, G. J. (2005). Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J* **390**, 19–27.
- Marvel, C. S. & Birkhimer, E. R. (1929). The preparation of the sodium salts of omega-hydroxybutyric, -valeric and -caproic acids. *J Am Chem Soc* **51**, 260–262.
- Matsushita, K., Ohno, Y., Shinagawa, E., Adachi, O. & Ameyama, M. (1980). Membrane-bound D-Glucose Dehydrogenase from *Pseudomonas* sp.: Solubilization, Purification and Characterization. *Agric Biol Chem* **44**, 1505–1512.
- Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O. & Ameyama, M. (1987a). Purification, characterization and reconstitution of cytochrome *o*-type oxidase from *Gluconobacter suboxydans*. *Biochim Biophys Acta* **894**, 304–312.

- Matsushita, K., Nonobe, M., Shinagawa, E., Adachi, O. & Ameyama, M. (1987b).** Reconstitution of Pyrroloquinoline Quinone-Dependent D-Glucose Oxidase Respiratory Chain of *Escherichia coli* with Cytochrome *o* Oxidase. *J Bacteriol* **169**, 205–209.
- Matsushita, K., Nagatani, Y., Shinagawa, E., Adachi, O. & Ameyama, M. (1989a).** Effect of Extracellular pH on the Respiratory Chain and Energetics of *Gluconobacter suboxydans*. *Agric Biol Chem* **53**, 2895–2902.
- Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O. & Ameyama, M. (1989b).** Quinoprotein D-glucose dehydrogenases in *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79. 41: Purification and characterization of the membrane-bound enzyme distinct from the soluble enzyme. *Antonie Van Leeuwenhoek* **56**, 63–72.
- Matsushita, K., Shinagawa, E., Adachi, O. & Ameyama, M. (1989c).** Reactivity with Ubiquinone of Quinoprotein D-Glucose Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *J Biochem (Tokyo)* **105**, 633–637.
- Matsushita, K., Toyama, H. & Adachi, O. (1994).** Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Adv Microb Physiol* **36**, 247–301.
- Matsushita, K., Arents, J. C., Bader, R., Yamada, M., Adachi, O. & Postma, P. W. (1997).** *Escherichia coli* is unable to produce pyrroloquinoline quinone (PQQ). *Microbiology* **143**, 3149–3156.
- Matsushita, K., Fujii, Y., Ano, Y., Toyama, H., Shinjoh, M., Tomiyama, N., Miyazaki, T., Sugisawa, T., Hoshino, T. & Adachi, O. (2003).** 5-Keto-D-Gluconate Production Is Catalyzed by a Quinoprotein Glycerol Dehydrogenase, Major Polyol Dehydrogenase, in *Gluconobacter* Species. *Appl Environ Microbiol* **69**, 1959–1966.
- Mattey, M. (1992).** The Production of Organic Acids. *Crit Rev Biotechnol* **12**, 87–132.
- McIlvaine, T. C. (1921).** A Buffer Solution for Colorimetric Comparison. *J Biol Chem* **49**, 183–186.
- Menéndez, C., Hernández, L., Selman, G., Mendoza, M. F., Hevia, P., Sotolongo, M. & Arrieta, J. G. (2002).** Molecular Cloning and Expression in *Escherichia coli* of an Exo-Levanase Gene from the Endophytic Bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4. *Curr Microbiol* **45**, 5–12.
- Menéndez, C., Hernández, L., Banguela, A. & País, J. (2004).** Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* **34**, 446–452.
- Meneses, C. H. S. G., Rouws, L. F. M., Simões-Araújo, J. L., Vidal, M. S. & Baldani, J. I. (2011).** Exopolysaccharide Production Is Required for Biofilm Formation and Plant Colonization by the Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 1448–1458.
- Merfort, M., Herrmann, U., Ha, S. W., Elfari, M., Bringer-Meyer, S., Görisch, H. & Sahm, H. (2006a).** Modification of the membrane-bound glucose oxidation system in *Gluconobacter oxydans* significantly increases gluconate and 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *Biotechnol J* **1**, 556–563.
- Merfort, M., Herrmann, U., Bringer-Meyer, S. & Sahm, H. (2006b).** High-yield 5-keto-D-gluconic acid formation is mediated by soluble and membrane-bound gluconate-5-dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 443–451.

- Metzer, E. & Halpern, Y. S. (1990).** In Vivo Cloning and Characterization of the *gabCTDP* Gene Cluster of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **172**, 3250–3256.
- Metzner, M., Germer, J. & Hengge, R. (2004).** Multiple stress signal integration in the regulation of the complex σ^S -dependent *csiD-ygaF-gabDTP* operon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **51**, 799–811.
- Meulenbergh, J. J. M., Sellink, E., Riegman, N. H. & Postma, P. W. (1992).** Nucleotide sequence and structure of the *Klebsiella pneumoniae pqq* operon. *Mol Gen Genet* **232**, 284–294.
- Meyer, M., Schweiger, P. & Deppenmeier, U. (2013).** Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 3457–3466.
- Michaelis, L. & Menten, M. L. (1913).** Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* **49**, 333–369.
- Miller, J. V., Estell, D. A. & Lazarus, R. A. (1987).** Purification and Characterization of 2,5-Diketo-D-gluconate Reductase from *Corynebacterium* Sp. *J Biol Chem* **262**, 9016–9020.
- Miller, J. H. (1972).** *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Misra, H. S., Rajpurohit, Y. S. & Khairnar, N. P. (2012).** Pyrroloquinoline-quinone and its versatile roles in biological processes. *J Biosci* **37**, 313–325.
- Miyazaki, T., Sugisawa, T. & Hoshino, T. (2006).** Pyrroloquinoline Quinone-Dependent Dehydrogenases from *Ketogulonicigenium vulgare* Catalyze the Direct Conversion of L-Sorbosone to L-Ascorbic Acid. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1487–1495.
- Morris, C. J., Biville, F., Turlin, E., Lee, E., Ellermann, K., Fan, W. H., Ramamoorthi, R., Springer, A. L. & Lidstrom, M. E. (1994).** Isolation, Phenotypic Characterization, and Complementation Analysis of Mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 Unable to Synthesize Pyrroloquinoline Quinone and Sequences of *pqqD*, *pqqG*, and *pqqC*. *J Bacteriol* **176**, 1746–1755.
- Mostafa, H. E., Heller, K. J. & Geis, A. (2002).** Cloning of *Escherichia coli lacZ* and *lacY* Genes and Their Expression in *Gluconobacter oxydans* and *Acetobacter liquefaciens*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 2619–2623.
- Mullins, E. A., Francois, J. A. & Kappock, T. J. (2008).** A Specialized Citric Acid Cycle Requiring Succinyl-Coenzyme A (CoA):Acetate CoA-Transferase (AarC) Confers Acetic Acid Resistance on the Acidophile *Acetobacter aceti*. *J Bacteriol* **190**, 4933–4940.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986).** Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**, 263–273.
- Muñoz-Rojas, J. & Caballero-Mellado, J. (2003).** Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. *Microb Ecol* **46**, 454–464.
- Muthukumarasamy, R., Cleenwerck, I., Revathi, G., Vadivelu, M., Janssens, D., Hoste, B., Gum, K. U., Park, K. D., Son, Y. C. & andere Autoren. (2005).** Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Syst Appl Microbiol* **28**, 277–286.

- Muthukumarasamy, R., Govindarajan, M., Vadivelu, M. & Revathi, G. (2006).** N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. *Microbiol Res* **161**, 238–245.
- Noji, N., Nakamura, T., Kitahata, N., Taguchi, K., Kudo, T., Yoshida, S., Tsujimoto, M., Sugiyama, T. & Asami, T. (2007).** Simple and Sensitive Method for Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) Analysis in Various Foods Using Liquid Chromatography/Electrospray-Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* **55**, 7258–7263.
- Ohmori, S., Uozumi, T. & Beppu, T. (1982).** Loss of Acetic Acid Resistance and Ethanol Oxidizing Ability in an *Acetobacter* Strain. *Agric Biol Chem* **46**, 381–389.
- Okumura, H., Uozumi, T. & Beppu, T. (1985).** Construction of Plasmid Vectors and a Genetic Transformation System for *Acetobacter aceti*. *Agric Biol Chem* **49**, 1011–1017.
- Olijve, W. & Kok, J. J. (1979).** Analysis of Growth of *Gluconobacter oxydans* in Glucose Containing Media. *Arch Microbiol* **121**, 283–290.
- Park, Y. M., Choi, E. S. & Rhee, S. K. (1994).** Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells immobilized in calcium alginate. *Biotechnol Lett* **16**, 345–348.
- Pedraza, R. O. (2008).** Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **125**, 25–35.
- Perlova, O., Nawroth, R., Zellermann, E. M. & Meletzus, D. (2002).** Isolation and characterization of the *glnD* gene of *Gluconacetobacter diazotrophicus*, encoding a putative uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme. *Gene* **297**, 159–168.
- Perlova, O., Ureta, A., Nordlund, S. & Meletzus, D. (2003).** Identification of Three Genes Encoding P_{II}-Like Proteins in *Gluconacetobacter diazotrophicus*: Studies of Their Role(s) in the Control of Nitrogen Fixation. *J Bacteriol* **185**, 5854–5861.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011).** SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* **785–786**.
- Piñón, D., Casas, M., Blanch, M., Fontaniella, B., Blanco, Y., Vicente, C., Solas, M. T. & Legaz, M. E. (2002).** *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Res Microbiol* **153**, 345–351.
- Porter, T. G., Spink, D. C., Martin, S. B. & Martin, D. L. (1985).** Transaminations catalysed by brain glutamate decarboxylase. *Biochem J* **231**, 705–712.
- Prescott, F. J., Shaw, J. K., Bilello, J. P. & Cragwall, G. O. (1953).** Gluconic Acid and Its Derivatives. *Ind Eng Chem* **45**, 338–342.
- Pronk, J. T., Levering, P. R., Olijve, W. & van Dijken, J. P. (1989).** Role of NADP-dependent and quinoprotein glucose dehydrogenases in gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb Technol* **11**, 160–164.
- Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W. F., Ehrenreich, A., Gottschalk, G. & Deppenmeier, U. (2005).** Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nat Biotechnol* **23**, 195–200.
- Punta, M., Coghill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G. & andere Autoren. (2012).** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **40**, D290–D301.

- Rabenhorst, J., Gatfield, I. & Hilmer, J. M. (2001).** Fermentatives Verfahren zur Gewinnung natürlicher, aliphatischer und Thiocarbonsäuren und Mikroorganismus dafür. EP 1078990 A1.
- Rahman, M., Ismat, F., McPherson, M. J. J. & Baldwin, S. A. (2007).** Topology-informed strategies for the overexpression and purification of membrane proteins. *Mol Membr Biol* **24**, 407–418.
- Ramos-Vera, W. H., Berg, I. A. & Fuchs, G. (2009).** Autotrophic Carbon Dioxide Assimilation in *Thermoproteales* Revisited. *J Bacteriol* **191**, 4286–4297.
- Ramos-Vera, W. H., Weiss, M., Strittmatter, E., Kockelkorn, D. & Fuchs, G. (2011).** Identification of Missing Genes and Enzymes for Autotrophic Carbon Fixation in *Crenarchaeota*. *J Bacteriol* **193**, 1201–1211.
- Raspor, P. & Goranovič, D. (2008).** Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Crit Rev Biotechnol* **28**, 101–124.
- Rauch, B., Pahlke, J., Schweiger, P. & Deppenmeier, U. (2010).** Characterization of enzymes involved in the central metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**, 711–718.
- Reichstein, T. & Grüssner, A. (1934).** Eine ergiebige Synthese der l-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helv Chim Acta* **17**, 311–328.
- Reitz, S., Alhapel, A., Essen, L. O. & Pierik, A. J. (2008).** Structural and Kinetic Properties of a β -Hydroxyacid Dehydrogenase Involved in Nicotinate Fermentation. *J Mol Biol* **382**, 802–811.
- Reshetilov, A. N., Iliasov, P. V., Donova, M. V., Dovbnaya, D. V., Boronin, A. M., Leathers, T. D. & Greene, R. V. (1997).** Evaluation of a *Gluconobacter oxydans* whole cell biosensor for amperometric detection of xylose. *Biosens Bioelectron* **12**, 241–247.
- Richhardt, J., Luchterhand, B., Bringer, S., Büchs, J. & Bott, M. (2013a).** Evidence for a Key Role of Cytochrome *bo*₃ Oxidase in Respiratory Energy Metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *J Bacteriol* **195**, 4210–4220.
- Richhardt, J., Bringer, S. & Bott, M. (2013b).** Role of the pentose phosphate pathway and the Entner–Doudoroff pathway in glucose metabolism of *Gluconobacter oxydans* 621H. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 4315–4323.
- Rollini, M. & Manzoni, M. (2005).** Bioconversion of D-galactitol to tagatose and dehydrogenase activity induction in *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem* **40**, 437–444.
- Rossmann, M. G., Moras, D. & Olsen, K. W. (1974).** Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* **250**, 194–199.
- Rouws, L. F. M., Simões-Araújo, J. L., Hemerly, A. S. & Baldani, J. I. (2008).** Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. *Arch Microbiol* **189**, 397–405.
- Rouws, L. F. M., Meneses, C. H. S. G., Guedes, H. V., Vidal, M. S., Baldani, J. I. & Schwab, S. (2010).** Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. *Lett Appl Microbiol* **51**, 325–330.

- Rumigny, J. F., Maitre, M., Cash, C. & Mandel, P. (1980).** Specific and non-specific succinic semialdehyde reductases from rat brain: Isolation and properties. *FEBS Lett* **117**, 111–116.
- Saichana, I., Ano, Y., Adachi, O., Matsushita, K. & Toyama, H. (2007).** Preparation of Enzymes Required for Enzymatic Quantification of 5-Keto-D-gluconate and 2-Keto-D-gluconate. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2478–2486.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**, 487–491.
- Saito, N., Robert, M., Kochi, H., Matsuo, G., Kakazu, Y., Soga, T. & Tomita, M. (2009).** Metabolite Profiling Reveals YihU as a Novel Hydroxybutyrate Dehydrogenase for Alternative Succinic Semialdehyde Metabolism in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **284**, 16442–16451.
- Saito, Y., Ishii, Y., Hayashi, H., Imao, Y., Akashi, T., Yoshikawa, K., Noguchi, Y., Soeda, S., Yoshida, M. & Niwa, M. (1997).** Cloning of Genes Coding for L-Sorbose and L-Sorbosone Dehydrogenases from *Gluconobacter oxydans* and Microbial Production of 2-Keto-L-Gulonate, a Precursor of L-Ascorbic Acid, in a Recombinant *G. oxydans* Strain. *Appl Environ Microbiol* **63**, 454–460.
- Saito, Y., Nakamura, S., Hiramitsu, M. & Doi, Y. (1996).** Microbial Synthesis and Properties of Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polym Int* **39**, 169–174.
- Salusjärvi, T., Povelainen, M., Hvorslev, N., Eneyskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Shabalin, K. A., Neustroev, K. N., Kalkkinen, N. & Miasnikov, A. N. (2004).** Cloning of a gluconate/polyol dehydrogenase gene from *Gluconobacter suboxydans* IFO 12528, characterisation of the enzyme and its use for the production of 5-ketogluconate in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl Microbiol Biotechnol* **65**, 306–314.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3. Aufl. Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, 2. Aufl. Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saravanan, V. S., Kalaiarasan, P., Madhaiyan, M. & Thangaraju, M. (2007).** Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion (Zn^{2+}) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Lett Appl Microbiol* **44**, 235–241.
- Sawyer, D. T. (1964).** Metal-gluconate complexes. *Chem Rev* **64**, 633–643.
- Schaller, M., Schaffhauser, M., Sans, N. & Wermuth, B. (1999).** Cloning and expression of succinic semialdehyde reductase from human brain. Identity with aflatoxin B₁ aldehyde reductase. *Eur J Biochem* **265**, 1056–1060.
- Schedel, M. (2000).** Regioselective Oxidation of Aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, Key Reaction in the Industrial 1-Deoxynojirimycin Synthesis. In *Biotechnology*, Bd. 8b, SS. 295–308. Herausgegeben von D. R. Kelly. Weinheim: Wiley-VCH.
- Schleyer, U., Bringer-Meyer, S. & Sahn, H. (2008).** An easy cloning and expression vector system for *Gluconobacter oxydans*. *Int J Food Microbiol* **125**, 91–95.

- Schmidt, K., Jensen, S. L. & Schlegel, H. G. (1963).** Die Carotinoide der Thiorhodaceae. I. Okenon als Hauptcarotinoid von *Chromatium okenii* Perty. *Arch Für Mikrobiol* **46**, 117–126.
- Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. (2007).** The *Strep*-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* **2**, 1528–1535.
- Schmidt, T. G. M., Batz, L., Bonet, L., Carl, U., Holzapfel, G., Kiem, K., Matulewicz, K., Niermeier, D., Schuchardt, I. & Stanar, K. (2013).** Development of the Twin-Strep-tag[®] and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expr Purif* **92**, 54–61.
- Schneider, B. L., Ruback, S., Kiupakis, A. K., Kasbarian, H., Pybus, C. & Reitzer, L. (2002).** The *Escherichia coli* *gabDTPC* Operon: Specific γ -Aminobutyrate Catabolism and Nonspecific Induction. *J Bacteriol* **184**, 6976–6986.
- Schweiger, P., Volland, S. & Deppenmeier, U. (2007).** Overproduction and Characterization of Two Distinct Aldehyde-Oxidizing Enzymes from *Gluconobacter oxydans* 621H. *J Mol Microbiol Biotechnol* **13**, 147–155.
- Schweiger, P., Gross, H., Wesener, S. & Deppenmeier, U. (2008).** Vinyl ketone reduction by three distinct *Gluconobacter oxydans* 621H enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**, 995–1006.
- Schweiger, P., Gross, H. & Deppenmeier, U. (2010).** Characterization of two aldo-keto reductases from *Gluconobacter oxydans* 621H capable of regio- and stereoselective α -ketocarbonyl reduction. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**, 1415–1426.
- Sevilla, M., Burris, R. H., Gunapala, N. & Kennedy, C. (2001).** Comparison of Benefit to Sugarcane Plant Growth and ¹⁵N₂ Incorporation Following Inoculation of Sterile Plants with *Acetobacter diazotrophicus* Wild-Type and Nif⁻ Mutant Strains. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 358–366.
- Shinagawa, E., Ano, Y., Yakushi, T., Adachi, O. & Matsushita, K. (2009).** Solubilization, Purification, and Properties of Membrane-Bound D-Glucono- δ -lactone Hydrolase from *Gluconobacter oxydans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 241–244.
- Shinjoh, M. & Hoshino, T. (1995).** Development of a Stable Shuttle Vector and a Conjugative Transfer System for *Gluconobacter oxydans*. *J Ferment Bioeng* **79**, 95–99.
- Shinjoh, M., Tomiyama, N., Asakura, A. & Hoshino, T. (1995).** Cloning and Nucleotide Sequencing of the Membrane-Bound L-Sorbose Dehydrogenase Gene of *Acetobacter liquefaciens* IFO 12258 and Its Expression in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Environ Microbiol* **61**, 413–420.
- Sievers, M. & Swings, J. (2005).** Family II *Acetobacteriaceae*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Bd. 2c, SS. 41–95. Herausgegeben von G. Garrity, D. J. Brenner, N. R. Krieg & J. T. Staley. New York: Springer.
- Smeenck, L. E. J., Dailly, N., Hiemstra, H., van Maarseveen, J. H. & Timmerman, P. (2012).** Synthesis of Water-Soluble Scaffolds for Peptide Cyclization, Labeling, and Ligation. *Org Lett* **14**, 1194–1197.
- Söhling, B. & Gottschalk, G. (1996).** Molecular Analysis of the Anaerobic Succinate Degradation Pathway in *Clostridium kluyveri*. *J Bacteriol* **178**, 871–880.

- Springer, A. L., Ramamoorthi, R. & Lidstrom, M. E. (1996).** Characterization and Nucleotide Sequence of *pqqE* and *pqqF* in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol* **178**, 2154–2157.
- Steinberg, F. M., Gershwin, M. E. & Rucker, R. B. (1994).** Dietary Pyrroloquinoline Quinone: Growth and Immune Response in BALB/c Mice. *J Nutr* **124**, 744–753.
- Steinbüchel, A. & Valentin, H. E. (1995).** Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiol Lett* **128**, 219–228.
- Subashini, M., Moushumi Priya, A. M., Sundarakrishnan, B. & Jayachandran, S. (2011).** Recombinant *Gluconacetobacter diazotrophicus* Containing *CryIAC* Gene Codes for 130-kDa Toxin Protein. *J Mol Microbiol Biotechnol* **20**, 236–242.
- Sudesh, K., Fukui, T., Taguchi, K., Iwata, T. & Doi, Y. (1999).** Improved production of poly(4-hydroxybutyrate) by *Comamonas acidovorans* and its freeze-fracture morphology. *Int J Biol Macromol* **25**, 79–85.
- Sugisawa, T. & Hoshino, T. (2002).** Purification and Properties of Membrane-bound D-Sorbitol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* IFO 3255. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**, 57–64.
- Sukharev, S. I., Martinac, B., Arshavsky, V. Y. & Kung, C. (1993).** Two Types of Mechanosensitive Channels in the *Escherichia coli* Cell Envelope: Solubilization and Functional Reconstitution. *Biophys J* **65**, 177–183.
- Švitel, J., Curilla, O. & Tkáč, J. (1998).** Microbial cell-based biosensor for sensing glucose, sucrose or lactose. *Biotechnol Appl Biochem* **27**, 153–158.
- Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M. R., Jiménez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J. & Fuentes-Ramírez, L. E. (2000).** Natural Endophytic Occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in Pineapple Plants. *Microb Ecol* **39**, 49–55.
- Tejera, N. A., Ortega, E., González-López, J. & Lluch, C. (2003).** Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J Appl Microbiol* **95**, 528–535.
- Tkáč, J., Voštiar, I., Šturdík, E., Gemeiner, P., Mastihuba, V. & Annus, J. (2001).** Fructose biosensor based on D-fructose dehydrogenase immobilised on a ferrocene-embedded cellulose acetate membrane. *Anal Chim Acta* **439**, 39–46.
- Tkáč, J., Voštiar, I., Gorton, L., Gemeiner, P. & Šturdík, E. (2003).** Improved selectivity of microbial biosensor using membrane coating. Application to the analysis of ethanol during fermentation. *Biosens Bioelectron* **18**, 1125–1134.
- Tkáč, J., Švitel, J., Voštiar, I., Navratil, M. & Gemeiner, P. (2009).** Membrane-bound dehydrogenases from *Gluconobacter* sp.: Interfacial electrochemistry and direct bioelectrocatalysis. *Bioelectrochemistry* **76**, 53–62.
- Tonouchi, N., Tsuchida, T., Yoshinaga, F., Horinouchi, S. & Beppu, T. (1994).** A Host-Vector System for a Cellulose-Producing *Acetobacter* Strain. *Biosci Biotechnol Biochem* **58**, 1899–1901.
- Tonouchi, N., Sugiyama, M. & Yokozeki, K. (2003).** Construction of a Vector Plasmid for Use in *Gluconobacter oxydans*. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 211–213.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350–4354.

- Toyama, H., Chen, Z. W., Fukumoto, M., Adachi, O., Matsushita, K. & Mathews, F. S. (2005).** Molecular Cloning and Structural Analysis of Quinohemoprotein Alcohol Dehydrogenase ADH-IIG from *Pseudomonas putida* HK5. *J Mol Biol* **352**, 91–104.
- Trček, J., Raspor, P. & Teuber, M. (2000).** Molecular identification of *Acetobacter* isolates from submerged vinegar production, sequence analysis of plasmid pJK2-1 and application in the development of a cloning vector. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 289–295.
- Trujillo, L. E., Arrieta, J. G., Dafhnis, F., García, J., Valdés, J., Tambara, Y., Pérez, M. & Hernández, L. (2001).** Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* **28**, 139–144.
- Van Schie, B. J., van Dijken, J. P. & Kuenen, J. G. (1984).** Non-coordinated synthesis of glucose dehydrogenase and its prosthetic group PQQ in *Acinetobacter* and *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiol Lett* **24**, 133–138.
- Waeber, U., Buhr, A., Schunk, T. & Erni, B. (1993).** The glucose transporter of *Escherichia coli*: Purification and characterization by Ni⁺ chelate affinity chromatography of the IIBC^{Glc} subunit. *FEBS Lett* **324**, 109–112.
- Walker, J. B. (1995).** Enzymatic Synthesis of Aminocyclitol Moieties of Aminoglycoside Antibiotics from Inositol by *Streptomyces* spp.: Detection of Glutamine-Aminocyclitol Aminotransferase and Diaminocyclitol Aminotransferase Activities in a Spectinomycin Producer. *J Bacteriol* **177**, 818–822.
- Wang, C., Zhang, H. B., Wang, L. H. & Zhang, L. H. (2006).** Succinic semialdehyde couples stress response to quorum-sensing signal decay in *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* **62**, 45–56.
- Wang, Y., Geer, L. Y., Chappay, C., Kans, J. A. & Bryant, S. H. (2000).** Cn3D: sequence and structure views for Entrez. *Trends Biochem Sci* **25**, 300–302.
- Williams, S. F., Rizk, S. & Martin, D. P. (2013).** Poly-4-hydroxybutyrate (P4HB): a new generation of resorbable medical devices for tissue repair and regeneration. *Biomed Tech Eng* **58**, 439–452.
- Wolff, R. A. & Kenealy, W. R. (1995).** Purification and Characterization of the Oxygen-Sensitive 4-Hydroxybutanoate Dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *Protein Expr Purif* **6**, 206–212.
- Wolff, R. A., Urben, G. W., O'Herrin, S. M. & Kenealy, W. R. (1993).** Dehydrogenases Involved in the Conversion of Succinate to 4-Hydroxybutanoate by *Clostridium kluyveri*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 1876–1882.
- Wu, Q., Wang, Y. & Chen, G. Q. (2009).** Medical Application of Microbial Biopolyesters Polyhydroxyalkanoates. *Artif Cells Blood Substit Biotechnol* **37**, 1–12.
- Xia, Z. X., Dai, W. W., He, Y. N., White, S. A., Mathews, F. S. & Davidson, V. L. (2003).** X-ray structure of methanol dehydrogenase from *Paracoccus denitrificans* and molecular modeling of its interactions with cytochrome *c-551i*. *J Biol Inorg Chem* **8**, 843–854.
- Yamada, M., Sumi, K., Matsushita, K., Adachi, O. & Yamada, Y. (1993).** Topological Analysis of Quinoprotein Glucose Dehydrogenase in *Escherichia coli* and Its Ubiquinone-binding Site. *J Biol Chem* **268**, 12812–12817.

- Yamada, M., Inbe, H., Tanaka, M., Sumi, K., Matsushita, K. & Adachi, O. (1998).** Mutant Isolation of the *Escherichia coli* Quinoprotein Glucose Dehydrogenase and Analysis of Crucial Residues Asp-730 and His-775 for Its Function. *J Biol Chem* **273**, 22021–22027.
- Yamada, Y. (2000).** Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek *et al.* 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch *et al.* 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 2225–2227.
- Yamada, Y., Hoshino, K. & Ishikawa, T. (1997).** The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S Ribosomal RNA: The Elevation of the Subgenus *Gluconoacetobacter* to the Generic Level. *Biosci Biotechnol Biochem* **61**, 1244–1251.
- Yamakoshi, M., Takahashi, M., Kouzuma, T., Imamura, S., Tsuboi, I., Kawazu, S., Yamagata, F., Tominaga, M. & Noritake, M. (2003).** Determination of urinary *myo*-inositol concentration by an improved enzymatic cycling method using *myo*-inositol dehydrogenase from *Flavobacterium* sp. *Clin Chim Acta* **328**, 163–171.
- Ye, L., Hämmerle, M., Olsthoorn, A. J., Schuhmann, W., Schmidt, H. L., Duine, J. A. & Heller, A. (1993).** High Current Density ‘Wired’ Quinoprotein Glucose Dehydrogenase Electrode. *Anal Chem* **65**, 238–241.
- Yoshida, K., Yamaguchi, M., Morinaga, T., Ikeuchi, M., Kinehara, M. & Ashida, H. (2006).** Genetic Modification of *Bacillus subtilis* for Production of D-*chiro*-Inositol, an Investigational Drug Candidate for Treatment of Type 2 Diabetes and Polycystic Ovary Syndrome. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1310–1315.
- Yuan, R. & Hamilton, D. L. (1984).** Type I and Type III Restriction-Modification Enzymes. In *DNA Methylation: Biochemistry and Biological Significance*, SS. 11–37. Herausgegeben von A. Razin, H. Cedar & A. D. Riggs. New York: Springer.
- Zeiser, J., Mühlenbeck, L. H., Schweiger, P. & Deppenmeier, U. (2014).** Characterization of a periplasmic quinoprotein from *Sphingomonas wittichii* that functions as aldehyde dehydrogenase. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**, 2067–2079.
- Zhang, L., Lin, J., Ma, Y., Wei, D. & Sun, M. (2010).** Construction of a Novel Shuttle Vector for Use in *Gluconobacter oxydans*. *Mol Biotechnol* **46**, 227–233.
- Zhang, Y., Gao, X., Zheng, Y. & Garavito, R. M. (2011).** Identification of succinic semialdehyde reductases from *Geobacter*: expression, purification, crystallization, preliminary functional, and crystallographic analysis. *Acta Biochim Biophys Sin* **43**, 996–1002.

7 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Uwe Deppenmeier bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas, die engagierte Betreuung und viele hilfreiche Diskussionen.

Frau apl. Prof. Dr. Christiane Dahl danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Hanna Hong aus dem Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie habe ich für die Unterstützung bei der NMR-Spektroskopie zu danken.

Ein riesiger Dank geht auch an alle Mitglieder und ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Deppenmeier, ganz besonders an Dr. Paul Schweiger, Dr. Verena Kallnik, Jessica Zeiser, Dr. Cornelia Welte, Elisabeth Schwab, Stefanie Berger, Sarah Refai, Dr. Kati Waßmann und Konrad Kosciow, für ihre Hilfe und Unterstützung, die vielen Ratschläge und nicht zuletzt für die unterhaltsamen Pausen und Aufmunterungen, wenn es im Labor mal nicht ganz so lief wie es sollte.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während des gesamten Studiums, für ihr Verständnis und ihre Geduld mit mir, die in stressigen Zeiten manchmal sicher auf eine harte Probe gestellt wurde.

8 Publikationsliste

Veröffentlichungen

Kallnik, V., Meyer, M., Deppenmeier, U. & Schweiger P. (2010). Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. *J Biotechnol* **150**, 460-465.

Meyer, M., Schweiger, P. & Deppenmeier, U. (2013). Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 3457-3466.

Poster

Meyer, M., Kallnik, V., Deppenmeier, U. & Schweiger, P. (2011). Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. ProkaGENOMICS Tagung, 2011 in Göttingen.

Meyer, M., Deppenmeier, U. & Schweiger, P. (2012). Overexpression and purification of membrane proteins from *Gluconobacter oxydans*. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), 2012 in Tübingen.